



Caractérisation des risques induits par les activités agricoles sur les écosystèmes aquatiques

Aurélie Devez

► **To cite this version:**

Aurélie Devez. Caractérisation des risques induits par les activités agricoles sur les écosystèmes aquatiques. Other. ENGREF (AgroParisTech), 2004. French. <tel-00006497>

HAL Id: tel-00006497

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00006497>

Submitted on 23 Jul 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HydroSciences
Montpellier

Unité Mixte de Recherche n° 5569
(UM1-UM2-CNRS- IRD)

UM1- DEPARTEMENT SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT ET SANTE PUBLIQUE



ECOLE NATIONALE DU GENIE RURAL, DES EAUX ET DES FORÊTS

N° attribué par la bibliothèque
/ / / / / / / / / / / / / / / /

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'ENGREF
Spécialité : Sciences de l'EAU

Présentée et soutenue publiquement le 30 avril 2004
par **Aurélie DEVEZ**

À l'ENGREF, Centre de Montpellier

intitulée
**CARACTÉRISATION DES RISQUES INDUITS
PAR LES ACTIVITES AGRICOLES
SUR LES ECOSYSTEMES AQUATIQUES**

devant le jury suivant :

M. Millier Claude	Directeur de recherche	Président
Mme Potin-Gautier Martine	Professeur	Rapporteur
M. Baccou Jean-Claude	Maitre de conférences	Rapporteur
Mme Casellas Claude	Professeur	Directeur de thèse
Mme Persin Françoise	Professeur	Examineur
M. Hinsinger Philippe	Chargé de recherche	Examineur

A mes parents

A mon frère Julien

A Nicolas

REMERCIEMENTS

Ces quelques lignes vont me permettre de remercier toutes les personnes qui m'ont beaucoup apporté au niveau scientifique mais aussi personnel, et sans qui, mon travail n'aurait pu aboutir: les initiateurs de ce projet interdisciplinaire, les responsables des différents laboratoires au sein desquels j'ai pu réaliser quelques 'manip' et tout le personnel qui m'a toujours très vite intégré dans leurs équipes de recherche respectives, les collègues et amis du « labo », les divers lecteurs qui ne sont relayés pour corriger, améliorer et juger mon rapport de thèse et bien attendu mon entourage et ma famille qui m'ont accompagné et encouragé tout au long de mon travail, sans oublier 'mes victimes', mes 'petites' algues qui se sont sacrifiées pour que mon étude progresse.

Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice de thèse, Madame Claude Casellas qui m'a fait confiance en me proposant un sujet de thèse dans la continuité du travail amorcé lors de mon stage de DEA au sein du Département Sciences de l'Environnement et Santé Publique (DSESP, Faculté de Pharmacie) et qui a mis à ma disposition tous les moyens et les ressources nécessaires à sa réalisation. Ce travail de DEA m'avait permis de découvrir l'électrochimie et tout particulièrement la voltampérométrie qui ne m'a plus quittée durant toute ma thèse. Je tiens à remercier tout particulièrement Christophe Innocent (Institut Européen des Membranes –IEM-, Montpellier) qui m'a initiée à la '*Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry*' et qui m'a permis de décrypter le langage *Metrohm*. J'en profite pour exprimer sa sincère reconnaissance à Madame Françoise Persin (UMR Cirad-16 Laboratoire Génie des Procédés d'élaboration de bioproduits, Faculté des Sciences et Techniques, Montpellier II) qui m'a consacré énormément de temps pour me faire partager et me transmettre une partie de son savoir de chimiste en particulier ses connaissances de la spéciation chimique des métaux et de l'électrochimie.

Ce travail n'aurait pas été possible si Messieurs les professeurs, Jean Bontoux et André Rambaud qui se sont succédés à la direction du DSESP (Faculté de Pharmacie, Montpellier I) ne m'avaient pas accueilli au sein de leur équipe et je les en remercie.

Le volet écotoxicologique de mon travail de thèse m'a permis d'aller acquérir ce savoir auprès de collègues suisses et français qui m'ont très chaleureusement accueilli au sein de leur 'maison située au bord du Lac de Genève' (Institut Forel à Versoix, Suisse). Merci à eux pour leur gentillesse et leur aide précieuse et tout particulièrement au professeur Walter Wildi, directeur de cet Institut, à Rodolphe Gilbin sans qui cette collaboration n'aurait pas été envisageable et à Michel Pardos pour ses conseils avertis. Je m'oublierai jamais la virée sur le lac déchaîné, le goût inoubliable de la 'fondue forellienne' et des chocolats suisses de Versoix. Merci à vous Céline, Brahim, Pascale, Davide, Hélène, Capt'ain *et al.*. Cette expérience très enrichissante m'a permis de mettre en place des biotests sur algues au laboratoire dès mon retour à Montpellier et d'embarquer toute l'équipe dans cette nouvelle 'aventure scientifique'.

J'adresse également mes remerciements à Claude Millier pour avoir encouragé mon inscription au sein de l'École Nationale du Génie Rural des Eaux et Forêts et pour avoir accepté d'être présent dans le jury de ma thèse ainsi qu'à Monsieur Alain Delacourt, son représentant à Montpellier. Je remercie par ailleurs l'ensemble des membres du jury de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail et d'assister à la soutenance de ma thèse et tout particulièrement Madame Martine Potin-Gautier (Laboratoire de Chimie Organique, Bio-Inorganique et Environnement, UFR des

Sciences et Technique, Université de Pau et des Pays de l'Adour) et Monsieur Jean-Claude Baccou (Laboratoire Génie des Procédés d'élaboration de bioproduits, UFR des Sciences et Techniques, Université Montpellier II) pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Ma reconnaissance va à Messieurs Voltz et Hinsinger (INRA de Montpellier) et à Madame Fenet qui ont été les coordinateurs et coordinatrice des différents projets auxquels j'ai participé et apporté ma contribution ainsi que tous les membres, des équipes de recherche impliquées, qui ont mis à ma disposition leur équipement et m'ont permis 'd'investir' leur labo. Un grand merci aux personnes qui ont, soit participé aux prélèvements sur le terrain, soit conduit des analyses particulières et qui ont surtout su me faire partager leurs connaissances et passions. Des remerciements particuliers à Patrick Andrieux, Sandrine Negro, Michael Clairotte (INRA, Montpellier), Françoise Elbaz-Poulichet, Jean-Luc Seidel, Corinne Casiot, Sandra Van Exter et Karine Parra (MSE, Laboratoire d'Hydrosciences), Simone Pourtales (ISTEEM, Montpellier), Guy Olivier (ISIM, Montpellier), Pascal Peu et José Martinez (CEMAGREF de Rennes), Cyril Thomas (Centre Français du Riz) et François Mesléard (Tour du Valat) et à tout ceux que j'oublie, qu'il m'en excuse....

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui animent le DSESP et qui contribuent à faire de ce labo un vivier d'idées, de techniques mais aussi d'astuces et de bonne humeur. Je remercie donc André, Bernadette, Claude, Claudine (pour sa bonne humeur), le duo- David / Dominique (pour la résolution de problèmes techniques et tous les services rendus. Tu vois Dominique, j'ai enfin fini cette thèse avant que tu n'aies eu le temps de repeindre le couloir !), Elena (sincères remerciements pour toutes tes critiques constructives et tes conseils avisés et surtout ta patience !), Hélène (merci de m'avoir impliqué dans ton programme riziculture et pour tes conseils avisés lors de la rédaction finale de la thèse), Suzanne *et al.* ainsi que tous les doctorants qui ont partagé le bureau commun des stagiaires. Cette promiscuité a été le catalyseur d'intenses discussions mais aussi de franches rigolades qui ont contribué à rendre ces années inoubliables. Bonne chance à vous, Laurent, Stéphane et Hewa, et plein de réussite pour Joëlle, Laurence et Rodolphe et l'ensemble des stagiaires qui se sont succédés et plus particulièrement Cindy qui complète actuellement une partie des résultats acquis durant ma thèse.

Enfin un grand merci tout spécial à ma famille, à mes parents qui m'ont permis de poursuivre mes études, à mon frère Julien à qui je souhaite un prompt rétablissement, à mes amis (tout particulièrement Erwann et Sandrine), à mon tendre Nicolas et à ma petite panthère noire qui n'ont cessé de me soutenir et de m'encourager au cours de mes années de recherche et pour m'avoir plus d'une fois remonté le moral. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance et le témoignage de mon amour.

Résumé :

L'utilisation de produits phytosanitaires est à l'origine d'un problème majeur à l'interface de l'agriculture et de la préservation des ressources en eau. Dans ce contexte, les effets de différents métaux (Cu, Zn), métalloïdes (As) et pesticides (Azimsulfuron, Oxadiazon, Prétalachlore, Fipronil et Alphacyperméthrine) ont été étudiés en terme de biodisponibilité voire de toxicité sur des algues d'eaux douces (*Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlorella sp.*) sensibles aux pollutions diffuses d'origine agricole, en prenant en compte l'influence des ligands naturels et l'impact d'une multipollution. L'étude de la relation potentielle entre spéciation, biodisponibilité et toxicité a été menée, sur trois sites d'étude associés à une pollution d'origine agricole. Des échantillons d'eaux, collectés dans des canaux de drainage et des rizières (pollution organique), de drainage prélevés sur des parcelles soumises ou non à des épandages de lisiers de porcs (Cu, Zn) et de ruissellement issus de parcelles viticoles (multipollution) ont été caractérisés et analysés. Les résultats de toxicité ont été confrontés avec ceux mesurés sur des solutions standards en conditions contrôlées et les résultats analytiques ; dosage de résidus de pesticides et des métaux et métalloïdes traces. L'analyse d'échantillons non toxiques menée conjointement, après additions de Cu, par biotests et DPASV a permis d'approfondir les relations entre la toxicité et les espèces électrochimiquement labiles détectées. Elle a souligné la présence de complexes labiles du cuivre (CuL), responsables de la toxicité. Les études de laboratoire et de terrain illustrent de la complexité de l'évaluation de l'exposition dans des contextes de multipollution, chaque molécule nécessitant une évaluation spécifique de son comportement et de ses effets dans un milieu donné. Par ailleurs, les divers produits phytosanitaires présents sont susceptibles d'interagir entre-eux (toxicité de mélanges complexes) et avec les ligands naturels (complexation).

Mots-clés : Pollution diffuse d'origine agricole, Toxicité, Biodisponibilité, Spéciation, DPASV et Capacité de Complexation, Biotests, Zn, Cu, As, Pesticides.

Abstract :

The use of pesticides seems to be at the origin of a major problem at the interface of agricultural activities and water resources preservation. In this context, the effects of some trace metals and metalloids and pesticides were studied in term of bioavailability even of toxicity, on fresh water algae sensitive to agricultural diffuse pollution, by taking into account the influence of natural ligands and the impact of multipollution. The study of the potential relationship between speciation, bioavailability and toxicity was undertaken using three sites representing contrasting agricultural pollution contexts. Water collected in drainage channels and paddy field (organic pollution essentially), drainage water sampled in plots with or without pig slurry applications (Cu and Zn) and vineyard runoff waters (multipollution) were characterised and analysed. The natural samples toxicity results were confronted with those obtained on studied compounds in controlled conditions and with analytical results; pesticides residues and trace metals and metalloids quantification. Water samples initially non toxic were jointly analysed, after copper additions, by biotests and voltammetry, to study relationships between toxicity and electrochemically labile species detected. This study underlines the presence of labile copper complexes (CuL) associated with toxicity emergence. In conclusion, laboratory studies and fieldwork, show that the exposure evaluation is very complex in agricultural multipollution contexts; for each context, molecule requiring a specific evaluation of its behaviour and effects. In addition, pesticides are likely to interact (mixture toxicity) and with natural ligands (complexation).

Keywords: Agricultural diffuse pollution, Toxicity, Bioavailability, Speciation, DPASV et Complexation Capacity, Bioassays, Zn, Cu, As, Pesticides.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Table des matières :

- Liste des tableaux
- Liste des figures
- Liste des abréviations

Introduction.....	1
--------------------------	----------

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION.....	1.....	6
--------------------------	---------------	----------

I- COMPORTEMENT DES PRINCIPAUX CONTAMINANTS ASSOCIÉS AUX ACTIVITÉS AGRICOLES SÉLECTIONNÉES.....	2
--	----------

I-1 LES PESTICIDES APPORTÉS PAR LA PRODUCTION RIZICOLE EN CAMARGUE.....	2
I-1-1 Propriétés physico-chimiques des pesticides.....	2
I-1-2 Toxicité des herbicides.....	3
I-1-3 L'Azimsulfuron.....	5
I-1-3-1 Propriétés physico-chimiques.....	5
I-1-3-2 Dégradabilité et devenir environnemental.....	5
I-1-3-3 Mode d'action et Toxicité.....	6
I-1-4 L'Oxadiazon.....	7
I-1-4-1 Propriétés physico-chimiques.....	7
I-1-4-2 Dégradabilité et devenir environnemental.....	7
I-1-4-3 Mode d'action et Toxicité.....	8
I-1-5 Le Prétalachlore.....	9
I-1-5-1 Propriétés physico-chimiques.....	9
I-1-5-2 Dégradabilité et devenir environnemental.....	9
I-1-5-3 Mode d'action et Toxicité.....	9
I-1-6 le Fipronil.....	10
I-1-6-1 Propriétés physico-chimiques.....	10
I-1-6-2 Dégradabilité et devenir environnemental.....	11
I-1-6-3 Mode d'action et Toxicité.....	11
I-1-7 L'Alphacyperméthrine.....	13
I-1-7-1 Propriétés physico-chimiques.....	13
I-1-7-2 Dégradabilité et devenir environnemental.....	13
I-1-7-3 Mode d'action et Toxicité.....	13
I-2- LE CUIVRE, LE ZINC ET L'ARSENIC: APPORTS PAR LES ÉPANDAGES DE LISIERS DE PORCS ET LA VITICULTURE.....	15
I-2-1 Comportement du cuivre et du zinc dans l'environnement.....	15
I-2-2 Toxicité et mode d'action du cuivre.....	16
I-2-3 Toxicité et mode d'action du zinc.....	17
I-2-4 Comportement de l'arsenic dans l'environnement.....	17
I-2-5 Toxicité et mode d'action de l'arsenic.....	17

II- OUTILS D'ÉVALUATION DE LA SPÉCIATION ET DE LA BIODISPONIBILITÉ.....	18
--	-----------

II-1 APPROCHE CHIMIQUE.....	18
II-1-1 Méthodes d'analyses des pesticides.....	18
II-1-2 Méthodes d'analyses des métaux.....	19
II-1-3 Introduction à la spéciation.....	19
II-1-3-1 Adsorption, Absorption et Échange d'ions.....	20
II-1-3-2 Précipitation et co-précipitation avec les hydroxydes de fer et les oxydes de manganèse.....	20
II-1-3-3 Complexation.....	21
II-1-3-4 Mobilisation des métaux à partir des sédiments.....	21
II-1-3-5 Interaction des éléments traces métalliques avec la matière organique naturelle.....	21

II-1-3-6 Capacité de complexation (CC) et constante de stabilité conditionnelle (K)	22
II-1-4 Méthodes expérimentales « d'évaluation » de la spéciation des métaux traces.....	22
II-1-4-1 Approche non électrochimique.....	22
II-1-4-2 Approche électrochimique.....	24
II-1-5 Principe de la redissolution anodique (Stripping Voltammetry)	26
II-2 APPROCHE BIOLOGIQUE.....	29
II-2-1 Évaluation de la biodisponibilité	29
II-2-1-1 Mécanismes d'assimilation des métaux dans les organismes – Modèle de l'ion libre (Free Ion Model) et ses limites d'application	29
II-2-1-2 Exceptions au modèle de l'ion libre.....	31
II-2-1-3 Mécanismes de défense vis à vis des concentrations métalliques.....	31
II-2-2 Les tests écotoxicologiques: généralités.....	34
II-2-2-1 Tests de toxicité aiguë et chronique.....	35
II-2-2-2 Interprétation des tests, valeurs remarquables.....	35
II-2-2-3 Choix de la cible biologique étudiée: les algues.....	36
II-2-2-4 Mesure de la toxicité.....	37
II-2-3 Interactions entre polluants	38
II-2-3-1 Présence d'interactions: La formule d'Abbott.....	38
II-2-3-2 Absence d'interaction: Concepts de prédiction de la toxicité des mélanges complexes.....	39
II-2-4 De l'intérêt de coupler l'approche biologique et l'approche chimique.....	40
I- MÉTHODOLOGIE DE PRÉLÈVEMENT, DE FILTRATION ET DE CONSERVATION DES ÉCHANTILLON.....	44
I-1 FLACONNAGE DE PRÉLÈVEMENTS.....	44
I-2 PRÉLÈVEMENTS MANUELS SUR LE TERRAIN	44
I-3 FILTRATION ET CONDITIONNEMENT DÉFINITIF DES ÉCHANTILLONS.....	44
I-3-1 Éléments Majeurs	44
I-3-2 COD.....	44
I-3-3 Métaux Traces.....	45
I-3-4 Pesticides	45
I-3-5 Biotests.....	45
II- CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE.....	45
II-1 PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES GÉNÉRAUX.....	45
II-2 CARBONE ORGANIQUE DISSOUS (COD).....	46
II-3 ANALYSE DES ÉLÉMENTS MAJEURS.....	46
II-3-1 Dosage des éléments majeurs par l'électrophorèse capillaire	46
II-3-1-1 Principe de l'électrophorèse capillaire.....	46
II-3-1-2 Analyse des anions.....	47
II-3-1-3 Analyse des cations.....	47
II-3-2 Dosage des anions par chromatographie ionique.....	48
II-3-3 Dosage des cations par absorption atomique four et émission de flamme.....	48
II-4 ANALYSE DES ÉLÉMENTS TRACES.....	48
II-4-1 Principe de fonctionnement de l'ICP-MS.....	49
II-4-2 Préparation des échantillons, des standards et des blancs.....	49
II-5 ANALYSE DE SPÉCIATION PAR VOLTAMPÉROMÉTRIE: MESURE DES FRACTIONS LABILES.....	50
II-5-1 Appareillage.....	50
II-5-1-1 Électrode de travail.....	51
II-5-1-2 Électrode de référence.....	51
II-5-2 Principe de la redissolution anodique (Stripping Voltammetry).....	51
II-5-3 Procédure analytique	53
II-5-4 Détermination de la Capacité de Complexation des eaux.....	54
II-5-4-1 Modèle à 1 ligand.....	55
II-5-4-2 Modèle à plusieurs ligands.....	56
II-5-5 Modèle de calcul de la spéciation chimique.....	57
II-6 QUANTIFICATION DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES.....	57
II-6-1 Analyse de l'Azimsulfuron.....	57
II-6-2 Analyses de l'Oxadiazon, du Prétilachlore, de l'Alphacyperméthrine et du Fipronil.....	58
II-6-3 Rendements d'extraction et Seuils de quantification.....	58
III- BIOTEST ALGAL.....	59

III-1 CHOIX DES ESPÈCES D'ALGUES.....	59
III-2 MILIEU DE CULTURE	60
III-2-1 Culture souche des algues en milieu solide	61
III-2-2 Maintien de la culture en milieu liquide	61
III-3 TEST DE TOXICITÉ CHRONIQUE	62
III-3-1 Préparation de l'inoculum	62
III-3-2 Incubation.....	62
III-4 PARAMÈTRES DE SUIVI DE L'EFFET	63
III-4-1 Effets chroniques: inhibition de la croissance algale.....	63
III-4-2 Analyse par ajout de fluorochromes: exemple de l'activité estérasique.....	63
III-5 EXPRESSION DES RÉSULTATS DE TOXICITÉ.....	64
I- SUIVI EXPÉRIMENTAL EN CAMARGUE.....	67
I-1 ÉCHANTILLONNAGE	67
I-2 PRODUITS PHYTOSANITAIRES RECHERCHÉS.....	68
I-3 ANALYSES DES MÉTAUX ET BIOTESTS SUR ALGUES.....	69
II- SUIVI EXPÉRIMENTAL DU DISPOSITIF SOLEPUR.....	70
II-1 ÉCHANTILLONNAGE.....	70
II-2 DÉTERMINATION DES CONDITIONS D'EXTRACTION DES SOLUTIONS DE SOL.....	72
II-3 ANALYSES DES ÉCHANTILLONS	72
III- SUIVI EXPÉRIMENTAL DU BASSIN VERSANT VITICOLE DE ROUJAN.....	73
III-1 CHOIX DES PARCELLES ET CARACTÉRISTIQUES DU SOL.....	73
III-2 ÉCHANTILLONNAGE	74
III-3 CONDITIONNEMENT ET ANALYSES DES ÉCHANTILLONS	75
IV- SUIVI EXPÉRIMENTAL DU BASSIN DE LA PEYNE.....	77
IV-1 ÉCHANTILLONNAGE,	77
IV-2 ANALYSES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES.....	77
I- MESURE DE L'INHIBITION DE LA CROISSANCE PAR FLUORESCENCE.....	81
I-1 ÉTUDE DE L'INHIBITION DE LA CROISSANCE DE PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA À PARTIR DE SOLUTIONS STANDARDS DE MÉTAUX ET MÉTALLOÏDES.....	81
I-1-1 Effet du cuivre	81
I-1-1-1 Variabilités intra et inter-laboratoires: exemple de l'estimation de la 72h-CE50 de référence du cuivre	81
I-1-1-2 Obtention d'une courbe dose-réponse: exemple du cuivre.....	83
I-1-2 Effet du zinc	84
I-1-3 Effet de l'arsenic	86
I-2 ÉTUDE DE L'INHIBITION DE LA CROISSANCE DE CHLORELLA SP. À PARTIR DE SOLUTIONS STANDARDS DE MÉTAUX ET MÉTALLOÏDES.....	87
I-2-1 Effet du cuivre.....	87
I-2-2 Effet du zinc.....	88
I-2-3 Effet de l'arsenic.....	88
I-3 ÉTUDE DE L'INHIBITION DE LA CROISSANCE DE PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA À PARTIR DES SUBSTANCES ACTIVES DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES	89
I-3-1 Choix du solvant.....	89
I-3-2 Effet du solvant	90
I-3-3 Effet des produits phytosanitaires	90
I-3-3-1 Effet des trois herbicides	90
I-3-3-2 Effet des deux insecticides	91
I-3-4 Courbes doses-réponses des produits phytosanitaires étudiés.....	91
II- MESURE DE L'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ ESTÉRASIQUE.....	93
II-1 ÉTUDE DE L'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ ESTÉRASIQUE SUR PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA À PARTIR DE SOLUTIONS STANDARDS DE MÉTAUX ET MÉTALLOÏDES.....	93
II-1-1 Effet du cuivre	93
II-1-2 Effet du zinc	94
II-1-3 Effet de l'arsenic	95

II-2 ÉTUDE DE L'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ ESTÉRASIQUE SUR CHLORELLA SP. À PARTIR DE SOLUTIONS STANDARDS DE MÉTAUX ET MÉTALLOÏDES.....	95
II-2-1 Effet des métaux et des métalloïdes.....	95
II-2-1-1 Effets du cuivre et du zinc	95
II-2-1-2 Effet de l'arsenic.....	96
II-2-2 Effet des produits phytosanitaires.....	96
II-3 ÉTUDE DE L'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ ESTÉRASIQUE SUR PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA À PARTIR DES SUBSTANCES ACTIVES DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES.....	97
II-3-1 Modes d'actions des produits phytosanitaires étudiés.....	97
II-3-2 Effet des herbicides.....	97
II-3-3 Effet des insecticides.....	98
II-4 CONCLUSIONS.....	98
I- RÉSULTATS DE LA CAMPAGNE 2001.....	102
I-1 ANALYSE DE RÉSIDUS DE PRODUITS PHYTOSANITAIRES.....	103
I-2 ANALYSE DES MÉTAUX.....	104
I-3 ÉTUDE DE LA RÉPONSE DES EAUX APRÈS APPLICATION SUR BIOESSAIS.....	104
I-3-1 Étude de l'inhibition de la croissance de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> par fluorescence	104
I-3-2 Autres paramètres d'effet	105
II- RÉSULTATS DE LA CAMPAGNE 2002.....	106
II-1 ANALYSE DE RÉSIDUS DE PRODUITS PHYTOSANITAIRES.....	106
II-1-1 Canaux de drainage et Rhône	106
II-1-2 Parcelles	107
II-2 ANALYSE DES MÉTAUX.....	108
II-3 ÉTUDE DE LA RÉPONSE DES EAUX APRÈS APPLICATION SUR BIOESSAIS.....	110
II-3-1 Étude de la réponse toxique sur <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> des eaux issues du Rhône et des canaux de drainage	110
II-3-1-1 Inhibition de la croissance par fluorescence.....	110
II-3-1-2 Inhibition de l'activité estérasiq.	112
II-3-2 Étude de la réponse toxique sur <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> des eaux issues des parcelles rizicoles.....	113
II-3-2-1 Inhibition de la croissance algale.....	113
II-3-2-2 Inhibition de l'activité estérasiq.	115
II-3-3 Conclusions	116
III- ÉTUDE DE L'INTERACTION.....	118
III-1 ÉTUDE DE DIFFÉRENTS MÉLANGES BINAIRES D'HERBICIDES.....	118
III-1-1 Résultats des différentes associations binaires d'herbicides.....	118
III-1-2 Expressions des résultats en présence d'interactions: Formule d'Abbott.....	122
III-1-3 Expressions des résultats en absence d'interaction: Modèles prédictifs.....	123
III-2 CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	125
I- CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE.....	127
I-1 SUIVI PONCTUEL DES EAUX DE DRAINAGE ISSUES DES DEUX PARCELLES EXPÉRIMENTALES: TR ET TE	127
I-1-1 Caractérisation physico-chimique	127
I-1-2 Concentrations en métaux (cuivre, zinc, manganèse) et métalloïde (arsenic)	128
I-2 SUIVI RÉGULIER DE DEUX ANNÉES DE DRAINAGE SUR LA PARCELLE TRAITÉE.....	128
I-3 CARACTÉRISATION DES SOLUTIONS DE SOL	129
I-3-1 Caractérisation physico-chimique	130
I-3-2 Distribution du zinc et du cuivre dans les solutions de sol	130
II- ÉTUDE DE LA TOXICITÉ.....	131
II-1 TOXICITÉ DES EAUX DE DRAINAGE ISSUES DES DEUX PARCELLES EXPÉRIMENTALES.....	131
II-2 TOXICITÉ DES EAUX DE DRAINAGE DE LA PARCELLE TRAITÉE LORS DU SUIVI DES DEUX SAISONS DE DRAINAGE.....	132
II-3 TOXICITÉ DES SOLUTIONS DE SOL.....	133
III- ÉTUDE DE LA SPÉCIATION	134
III-1 ÉTUDE DE LA SPÉCIATION DES ÉCHANTILLONS NATURELS D'EAUX DE DRAINAGE DES DEUX PARCELLES EXPÉRIMENTALES.....	134
III-2 ESTIMATION GRAPHIQUE ET PAR LE CALCUL DE LA CAPACITÉ DE COMPLEXATION DU CUIVRE DANS LES EAUX DE DRAINAGE DES PARCELLES TÉMOIN ET TRAITÉE.....	136

III-2-1 Détermination graphique de la capacité de complexation et de la constante de stabilité: exemple des eaux de drainage prélevées en 2001 sur les deux parcelles expérimentales.....	136
III-2-2 Linéarisation de Ruzic	137
III-3 ÉTUDE DE LA SPÉCIATION DES SOLUTIONS DE SOL.....	137
IV- RELATIONS POTENTIELLES ENTRE LA SPÉCIATION DU CUIVRE ET LA TOXICITÉ	138
IV-1 CROISEMENT DES INFORMATIONS CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES.....	138
IV-2 CALCUL DE LA SPÉCIATION CHIMIQUE PAR MINEQL.....	139
I- CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE.....	142
I-1 SUIVI DES EAUX DE RUISSELLEMENT DES DEUX PARCELLES VITICOLES.....	142
I-1-1 Caractérisation physico-chimique.....	142
I-1-2 Concentration en métaux traces	142
I-2 SUIVI DES EAUX DE LA RIVIÈRE RÉCEPTRICE: LA PEYNE	143
I-2-1 Suivis en période d'été.....	144
I-2-1-1 Évolution temporelle des concentrations en éléments majeurs	144
I-2-1-1-1 Station SNCF	144
I-2-1-1-2 Station D30.....	145
I-2-1-1-3 Station de Montpezat	145
I-2-1-2 Évolution temporelle des concentrations en métaux traces	146
I-2-1-2-1 Station SNCF.....	147
I-2-1-2-2 Station D30.....	148
I-2-1-2-3 Station Montpezat.....	149
I-2-1-3 Évolution spatiale des concentrations en éléments majeurs et en métaux traces.....	149
I-2-1-4 Comparaison avec les résultats obtenus sur les eaux de ruissellement des parcelles viticoles.....	150
I-2-2 Suivis en période de crues	151
II- ÉTUDE DE LA TOXICITÉ	157
II-1 TOXICITÉ DES EAUX DE RUISSELLEMENT ISSUES DES DEUX PARCELLES EXPÉRIMENTALES.....	157
II-1-1 Étude de l'inhibition de la croissance algale de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> par fluorescence.....	157
II-1-2 Étude de l'inhibition de l'activité estérasique.....	158
II-1-3 Étude complémentaire des échantillons d'eaux de ruissellement non toxiques	158
II-1-4 Conclusions.....	159
II-2 TOXICITÉ DES EAUX DE LA PEYNE	160
II-2-1 En période d'été.....	160
II-2-2 En période de crues.....	161
II-2-2-1 Suivi complet de crues.....	161
II-2-2-2 Échantillons moyens.....	163
III- ÉTUDE DE LA SPÉCIATION DES ÉCHANTILLONS NATURELS D'EAUX DE RUISSELLEMENT PAR DPASV.....	163
III-1 DÉFORMATIONS DES PICS EN DPASV	164
III-2 RÉSULTATS DPASV OBTENUS SUR LES EAUX DE RUISSELLEMENT ISSUES DES DEUX PARCELLES EXPÉRIMENTALES.....	166
III-3 ESTIMATION GRAPHIQUE ET PAR LE CALCUL DE LA CAPACITÉ DE COMPLEXATION DU CUIVRE DANS LES EAUX DE RUISSELLEMENT DE PARCELLES VITICOLES.....	167
III-3-1 Détermination graphique des capacités de complexation et des constantes de stabilité associées. 168	
Exemple de l'échantillon NC5	168
III-3-2 Linéarisation de Ruzic	169
III-3-3 Conclusions.....	170
IV- RELATIONS POTENTIELLES ENTRE SPÉCIATION DU CUIVRE ET TOXICITÉ.....	170
IV-1 CROISEMENT DES INFORMATIONS CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES	170
IV-2 CALCUL DE LA SPÉCIATION CHIMIQUE PAR MINEQL.....	172
2-2-1-3 Le reste de la saison.....	217
1-3 Caractéristiques des crues.....	227
1-2-1 La haute vallée de la Peyne.....	230
1-2-2 La basse vallée de la Peyne.....	231

Conclusions & Perspectives.....168

Références bibliographiques.....171

Annexes

INDEX des FIGURES & TABLEAUX

Liste des Tableaux

I- Étude bibliographique

Tableau I-1: Classification des herbicides par famille chimique et mode d'action spécifique.....	p 9
Tableau I-2: Principales caractéristiques de l'Azimsulfuron.....	p 10
Tableau I-3: Principales caractéristiques de l'Oxadiazon.....	p 12
Tableau I-4: Principales caractéristiques du Prétalachlore.....	p 14
Tableau I-5: Principales caractéristiques du Fipronil.....	p 16
Tableau I-6: Principales caractéristiques de l'Alphacyperméthrine.....	p 18
Tableau I-7: Éléments métalliques traces indispensables aux organismes biologiques.....	p 21
Tableau I-8: Principaux schémas d'analyse de spéciation de la phase dissoute.....	p 33

II- Méthodologies et Sites d'étude

Tableau II-1: Valeurs retenues pour les différents paramètres d'analyses en DPASV pour des conditions opératoires optimisées et références bibliographiques associées.....	p 54
Tableau II-2: Principales valeurs de potentiel de pic (Ep) répertoriées et espèces associées...	p 56
Tableau II-3: Temps de rétention et ions caractéristiques pour les quatre composés dosés en CPG pour les deux années d'étude (2001 et 2002).....	p 61
Tableau II-4: Taux de recouvrement obtenus après analyse de l'eau de référence du Rhône dopée en diverses concentrations en produits étudiés.....	p 61
Tableau II-5: Composition des cinq solutions constitutives du milieu AAP.....	p 63
Tableau II-6: Dates des prélèvements et nomenclature employée pour les échantillons étudiés en 2002.....	p 68
Tableau II-7: Caractéristiques générales et période d'application en riziculture camarguaise des produits phytosanitaires étudiés.....	p 69
Tableau II-8: Périodes de prélèvements et nomenclature employée pour l'échantillonnage des eaux de drainage lors des deux saisons de drainage étudiées.....	p 70
Tableau II-9: Concentrations totales en cuivre et zinc ($\mu\text{g/l}$) obtenues en testant différentes conditions d'extraction.....	p 72
Tableaux II-10 A et B: Principales caractéristiques physico-chimiques des horizons 0-2, 2-15 et 15-30 cm des échantillons de sols prélevés sur les deux parcelles sélectionnées.....	p 76

III- Biotests en conditions contrôlées

Tableau III-1: Étude de la variabilité inter-laboratoire en fonction du matériel utilisé respectivement au DSESP (<i>test 1</i>) et à l'Institut Forel (<i>test 2</i>) à partir d'une solution standard de cuivre.....	p 80
Tableau III-2: Étude de la variabilité intra-laboratoire en fonction des gammes de concentrations en cuivre testées.....	p 80
Tableau III-3: Estimation par le calcul (logiciel Regtox6) des valeurs de CE 5, 10, 15, 20, 25 et 50: Exemple du cuivre.....	p 81
Tableaux III-4 A et B: Confirmation de la variabilité intra-laboratoire en fonction des gammes de concentrations en zinc testées (A). Comparaison des 72h-CE ₅₀ du zinc respectivement pour les sels de sulfate (A) et de chlorure (B) de zinc. Étude de la	

reproductibilité des essais pour des inoculum issus de repiquages différents (**B**). (*Test d'inhibition de la croissance par fluorescence sur P. subcapitata*).....p 83

Tableau III-5: Concentrations testées pour les différentes solutions d'arsenic et pourcentages d'inhibition de la croissance par fluorescence sur *P. subcapitata* associés. Estimation des 72h-CE₅₀ par le logiciel Regtox6 pour les différentes formes d'arsenic.....p 84

Tableau III-6: Pourcentages d'inhibition de la croissance de *P. subcapitata* obtenus pour différentes concentrations en DMSO exprimées en % (n=3).....p 88

Tableau III-7: Valeurs des 72h-CE₅ et CE₅₀ (µg/l et µM) estimées par le programme Regtox pour les trois herbicides étudiés.....p 88

Tableau III-8: Valeurs des 72h-CE₅ et CE₅₀ (µg/l et µM) estimées par le programme Regtox pour les deux insecticides étudiés.....p 89

Tableau III-9: Principales données écotoxicologiques sur algues concernant les produits phytosanitaires étudiés.....p 90

Tableau III-10: Comparaison des résultats de toxicité obtenus pour le cuivre et le zinc sur *P. subcapitata* en étudiant les deux paramètres d'effet en terme de 72h-CE₅₀.....p 92

Tableau III-11: Comparaison des résultats de toxicité obtenus pour les différentes formes de l'arsenic sur *P. subcapitata* en étudiant les deux paramètres d'effet en terme de 72h-CE₅₀.....p 93

Tableau III-12: Comparaison des résultats de toxicité obtenus pour le cuivre et le zinc sur *Chlorella sp.* en étudiant les deux paramètres d'effet en terme de 72h-CE₅₀.....p 94

Tableau III-13: Comparaison des résultats de toxicité obtenus pour les différentes formes de l'arsenic sur *Chlorella sp.* en étudiant les deux paramètres d'effet en terme de 72h-CE₅₀.....p 94

Tableau III-14: Cibles moléculaires et processus physiologiques affectés par les trois herbicides étudiés.....p 95

Tableaux III-15 A et B: Comparaison des résultats de toxicité obtenus sur *P. subcapitata* en terme de CE₅ (**A**) et CE₅₀ (**B**) lors de l'étude des deux paramètres d'effet.....p 96

IV- Impact des produits phytosanitaires issus de la riziculture et Étude de l'interaction

Tableau IV-1: Concentrations des principaux métaux (µM) dans les eaux issues des trois canaux de drainage et du Rhône pour les trois dates d'échantillonnage en 2001.....p 101

Tableau IV-2: Pourcentages d'inhibition de la croissance par fluorescence de *P. subcapitata* des deux échantillons toxiques en 2001 (GM*1 et AI*1).
Concentrations initiales en prétilachlore, en oxadiazon, en cuivre et en zinc (µM) et facteurs de dilution nécessaires à l'obtention de 50% d'inhibition de la croissance algale.
Comparaison des concentrations en prétilachlore, en oxadiazon, en cuivre et en zinc (µM) résultantes de cette dilution et des 72h-CE₅₀ de référence.....p 102

Tableaux IV-3 A et B: Concentrations des principaux métaux (µM) dans les eaux issues des trois canaux de drainage et du Rhône (A) et des deux rizières (B) en 2002 pour les échantillons présentant une réponse toxique.....p 106

Tableau IV-4: Pourcentages d'inhibition de la croissance par fluorescence de *P. subcapitata* des échantillons naturels toxiques issus des trois canaux de drainage et du Rhône en 2002.
Concentrations initiales en prétilachlore, en oxadiazon, en cuivre et en zinc (µM) et facteurs de dilution nécessaires à l'obtention de 50% d'inhibition de la croissance algale.
Comparaison des concentrations en prétilachlore, en oxadiazon, en cuivre et en zinc (µM) résultantes de cette dilution et des 72h-CE₅₀ de référence.....p 108

Tableau IV-5: Comparaison des pourcentages d'inhibition de la croissance par fluorescence et d'inhibition de l'activité estérasiq ue de *P. subcapitata* obtenus sur les échantillons naturels

toxiques communs aux deux tests. Échantillons issus des trois canaux de drainage et du Rhône en 2002.....p 110

Tableau IV-6: Pourcentages d'inhibition de la croissance par fluorescence de *P. subcapitata* des échantillons naturels toxiques issus des deux parcelles en 2002.

Concentrations initiales en prétilachlore, en oxadiazon, en cuivre et en zinc (μM) et facteurs de dilution nécessaires à l'obtention de 50% d'inhibition de la croissance algale.

Comparaison des concentrations en prétilachlore, en oxadiazon, en cuivre et en zinc (μM) résultantes de cette dilution et des 72h-CE₅₀ de référence.....p 112

Tableau IV-7: Comparaison des pourcentages d'inhibition de la croissance par fluorescence et d'inhibition de l'activité estérasique de *P. subcapitata* obtenus sur les échantillons naturels toxiques communs aux deux tests. Échantillons issus des deux parcelles en 2002.....p 113

Tableau IV-8: Résultats des Ratio d'Inhibition (RI) obtenus pour les diverses associations de concentrations des différents mélanges d'herbicides étudiés.....p 118

- V- Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre et du zinc: suivi expérimental du dispositif SOLEPUR

Tableau V-1: Caractérisation physico-chimique et concentrations en Carbone Organique Dissous (mg C/l) des eaux de drainage des parcelles TR et TE (Janvier 2001 et 2002).....p 122

Tableau V-2: Concentrations totales en cuivre, zinc, manganèse et arsenic (μM) dans la phase dissoute des eaux de drainage des parcelles TR et TE (Janvier 2001 et 2002).p 123

Tableau V-3: Caractérisation physico-chimique des eaux de drainage issues de la parcelle soumise à épandage et collectées entre octobre 2000 et mars 2002.....p 124

Tableau V-4: Concentrations en cuivre et zinc total dans les eaux de drainage collectées au cours de la période 2000–2002 dans la parcelle soumise à épandage.....p 124

Tableau V-5: Caractéristiques physico-chimiques et concentrations en Carbone Organique Dissous (mg C/l) des solutions de sol extraites des horizons 0-20 cm et 40-60 cm en 1996 et 1999 sur la parcelle TR.....p 125

Tableau V-6: Toxicité observée sur *P. subcapitata* des solutions de sol extraites des différents horizons de sols prélevés sur TR en 1996 et 1999. Dilution nécessaire pour obtenir 50% d'inhibition de la croissance sur les échantillons présentant une toxicité directe et concentrations en cuivre et zinc total.....p 129

Tableau V-7: Résultats de la méthode des ajouts dosés de Mn^{2+} sur une eau de la parcelle TE, exprimés en intensité de courant (nA) et potentiel de pic (E_p en V).....p 131

Tableau V-8: Compilation des valeurs de CC et de log K estimées graphiquement et par la linéarisation de Ruzic et obtenues sur les eaux de drainage issues des deux parcelles expérimentales pour les deux années d'étude.....p 132

Tableau V-9: Toxicité des solutions de sol extraites des différents horizons de sol de la parcelle TR en 1999, observée sur *P. subcapitata*. Concentrations totales en zinc et pourcentage en zinc ionique mesuré en DPASV et comparaison avec la 72h-CE₅₀ de référence du zinc.....p 133

Tableau V-10: Ajouts de cuivre (μM) nécessaires pour obtenir les CE₁₀ et ₅₀ (estimation Regtox - intervalle de confiance 95%) dans les eaux de drainage issues des deux parcelles pour les deux années d'étude. Potentiels de pic (E_p en mV) mis en évidence en DPASV pour des ajouts de cuivre proches de ceux nécessaires à l'obtention de la toxicité totale (CE₁₀₀).....p 134

- VI- Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution: Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne

Tableau VI-1: Caractéristiques physico-chimiques des eaux de ruissellement prélevées sur les parcelles C et NC lors des six événements pluvieux étudiés.....p 136

Tableau VI-2: Concentrations moyennes en cuivre, zinc et arsenic total (μM) dans les eaux de ruissellement issues des deux parcelles expérimentales lors des six crues étudiées ($n=2$)... p 137

Tableau VI-3: pH moyen et concentrations moyennes en éléments majeurs (mM) (max-min) des eaux prélevées en période de débit de base à la station SNCF de 2002 à 2003.....p 139

Tableau VI-4: pH moyen et concentrations moyennes en éléments majeurs (mM) (max-min) des eaux prélevées en période de débit de base à la station D30 de 2002 à 2003.....p 139

Tableau VI-5: pH moyen et concentrations moyennes en éléments majeurs (mM) (max-min) des eaux prélevées en période de débit de base à la station Montpezat de 2002 à 2003 ($n=10$).p 140

Tableau VI-6: Concentrations totales moyennes (μM , max-min) des principaux métaux mesurés dans les eaux de la Peyne aux trois stations d'étude lors des campagnes d'échantillonnage effectuées en période de débit de base ($n=10$).....p 141

Tableau VI-7: Pourcentages d'inhibition de la croissance de *P. subcapitata* obtenus sur les échantillons toxiques de la parcelle C. Concentrations initiales en cuivre et en zinc (μM) et facteurs de dilution associés pour obtenir la CE_{50} . Comparaison des concentrations en cuivre et en zinc (μM) résultantes de ces dilutions et de leur 72h- CE_{50} de référence respective.....p 150

Tableau VI-8: Pourcentages d'inhibition de l'activité estérasiqque de *P. subcapitata* obtenus sur les échantillons toxiques de la parcelle C. Concentrations initiales en cuivre et en zinc (μM) et facteurs de dilution associés pour obtenir la CE_{50} . Comparaison des concentrations en cuivre et en zinc (μM) résultantes de ces dilutions et de leur 72h- CE_{50} de référence respective.....p 151

Tableau VI-9: Résultats de toxicité obtenus pour les quatre premiers échantillons prélevés dans la Peyne lors du suivi de la crue du 27-28 février 2003, exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance algale de *P. subcapitata* par fluorescence. Facteur de dilution nécessaire pour obtenir 50% d'inhibition de la croissance et estimation de la concentration en cuivre en résultant (μM) en comparaison des concentrations initiales en cuivre (μM).....p 154

Tableau VI-10: Valeurs expérimentales des potentiels de pic (E_p) obtenus sur les eaux de ruissellement des parcelles C et NC.....p 160

Tableau VI-11: Compilation des valeurs de CC et de log K estimées graphiquement et par la linéarisation de Ruzic obtenues sur les échantillons non toxiques (parcelle NC uniquement)... p 163

Tableau VI-12: Ajouts de cuivre (μM) nécessaires pour obtenir les CE_{10} et $_{50}$ (estimation Regtox - intervalle de confiance 95%) dans l'ensemble des échantillons non toxiques. Potentiels de pic (E_p en mV) mesurés en DPASV pour des ajouts de cuivre proches de ceux nécessaires à l'obtention de l'émergence de la toxicité (CE_{10}).....p 164

Tableau VI-13 Comparaison des valeurs de CC obtenues par la linéarisation de Ruzic et des ajouts de cuivre nécessaires pour obtenir la CE_{10} (μM). Concentrations en Carbone Organique Dissous (mg C/l) et totale en cuivre (μM) pour les échantillons non toxiques de la parcelle NC.....p 165

Tableau VI-14: Répartition des espèces du cuivre dans les eaux de ruissellement de la parcelle C donnée par le calcul Mineql. (MON: Matière Organique Naturelle).....p 166

Liste des Figures

I- Étude bibliographique

- Figure I-1:** Interactions subies par les métaux au cours de leur transport en milieu aquatique.....p 20
- Figure I-2:** Schéma de la fixation de l'ion libre et des complexes labiles sur l'électrode à goutte de mercure.....p 31
- Figure I-3:** Modèle conceptuel de l'interaction métal – membrane biologique.....p 35
- Figure I-4:** Différents mécanismes de transport intracellulaire des métaux traces au niveau des membranes biologiques et exceptions au modèle de l'ion libre.....p 37
- Figure I-5:** Exemple d'une courbe dose-réponse (concentration-effet) et valeurs remarquables NOEC, LOEC, CE₅₀.....p 41

II- Méthodologies et Sites d'étude

- Figure II-1:** Courbes d'étalonnage du cuivre (■) et du zinc (●) établies par DPASV dans un milieu non complexant (KNO₃ 0,1M).....p 56
- Figure II-2:** Exemple d'une courbe de titration, Ip en fonction de la concentration en métal ajouté et matérialisation du point d'inflexion correspond à la capacité de complexation...p 58
- Figure II-3:** Schéma de la culture d'algues en milieu gélosé-solide et liquide selon la procédure US E.P.A. (1989).....p 64
- Figure II-4:** Spectre d'émission et d'absorption de la fluorescéine (pH=9).....p 66
- Figure II-5:** Quantités d'eau drainée mensuellement dans la parcelle traitée SOLEPUR au cours des deux années d'expérimentation (septembre 2000 à mai 2002).....p 71
- Figure II-6:** Nombres de jours de récupération et volume d'eau de drainage recueilli dans la parcelle traitée SOLEPUR au cours des deux années d'expérimentation (périodes du 28 octobre 2000 au 8 janvier 2001 et du 24 janvier au 18 mars 2002).....p 71
- Figure II-7:** Localisation des deux parcelles échantillonnées (AW6-C et 122-NC) sur le Bassin Versant de Roujan.....p 76
- Figure II-8:** Présentation générale et localisation des points de prélèvements sur la Peyne
■ Station SNCF ; ❖ Station D30 ; Φ Station Montpezat.....p 78

III- Biotests en conditions contrôlées

- Figure III-1:** Courbe dose-réponse du cuivre obtenue à partir des données expérimentales ● et des valeurs calculées par le programme Regtox ■.....p 82
- Figure III-2:** Courbes dose-réponse obtenues suite aux bioessais réalisés sur les produits phytosanitaires utilisés en riziculture (*Test d'inhibition de la croissance par fluorescence de P. subcapitata*).....p 90

IV- Impact des produits phytosanitaires issus de la riziculture et Étude de l'interaction

- Figure IV-1:** Concentrations en Prétalachlore et en Oxadiazon (µM) dans les eaux issues des trois canaux de drainage (Albaron, Grand-Mar et Fumemorte) en 2001.....p 100

Figure IV-2: Concentrations en Prétilachlore et en Oxadiazon (μM) dans les eaux issues des trois canaux de drainage (Albaron, Fumemorte et Grand-Mar) en 2002.....	p 103
Figure IV-3: Concentrations en Prétilachlore et en Oxadiazon (μM) dans les eaux issues des deux rizières (Agon-Ag et Berthe-B) en 2002.....	p 104
Figure IV-4: Toxicité des échantillons naturels d'eaux issues des trois canaux de drainage et du Rhône en 2002, exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance par fluorescence de <i>P. subcapitata</i>	p 107
Figure IV-5: Toxicité des échantillons naturels d'eaux échantillonnées dans les trois canaux de drainage et le Rhône en 2002, exprimée en pourcentage d'inhibition de l'activité estérasiq ue de <i>P. subcapitata</i>	p 109
Figure IV-6: Toxicité des échantillons naturels d'eaux échantillonnées dans deux rizières et le Rhône en 2002, exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance par fluorescence de <i>P. subcapitata</i>	p 111
Figure IV-7: Toxicité des échantillons naturels d'eaux échantillonnées dans les deux rizières et le Rhône en 2002, exprimée en pourcentage d'inhibition de l'activité estérasiq ue de <i>P. subcapitata</i>	p 113
Figures IV-8 A, B et C: Inhibition de la croissance algale de <i>P. subcapitata</i> pour différentes combinaisons de concentrations du mélange Prétilachlore/Azimsulfuron (A), du mélange Oxadiazon/Azimsulfuron (B) et du mélange Prétilachlore/Oxadiazon (C).....	p 117
Figures IV-9 A, B et C: Données expérimentales obtenues lors de l'étude de l'inhibition de la croissance algale de <i>P. subcapitata</i> pour différentes combinaisons de concentrations du mélange Prétilachlore/Azimsulfuron (A), du mélange Oxadiazon/Azimsulfuron (B) et du mélange Prétilachlore/Oxadiazon (C) en comparaison avec les données issues des deux modèles de prédiction de la toxicité de mélanges complexes (CA et IA) pour des proportions données en chacun des composés.....	p 120

- *V- Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre et du zinc: suivi expérimental du dispositif SOLEPUR*

Figure V-1: Concentrations en Cu et Zn total (μM) dans les solutions de sol 1996 et 1999 en fonction de la profondeur.....	p 126
Figure V-2: Concentrations en cuivre total (μM) des échantillons d'eaux de drainage prélevés sur les parcelles TR et TE et concentrations en cuivre ajouté afin d'obtenir une inhibition partielle de la croissance algale.....	p 127
Figure V-3: Concentrations en cuivre total (μM) des eaux de drainage prélevés lors du suivi des deux années de drainage et concentrations en cuivre ajouté afin d'obtenir la CE_{50}	p 128
Figure V-4: Polarogrammes des eaux de drainage des parcelles Traitée (TR) et Témoin (TE) en 2002 suite à des ajouts successifs de Zn^{2+}	p 130
Figure V-5: Polarogramme obtenu suite à des ajouts dosés de Mn^{2+} sur un échantillon naturel d'eau de drainage recueillie sur la parcelle Témoin.....	p 131
Figures V-6 A et B: Estimation graphique de la capacité de complexation (CC) pour le cuivre dans les eaux de drainage issues de la parcelle traitée (A) et témoin (B) en 2001 à partir des courbes obtenues par la méthode des ajouts dosés de cuivre.....	p 132

VI- Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution: Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne

Figure VI-1: Débit journalier moyen (m^3/s) de la rivière la Peyne aux différentes dates de prélèvement (2002-2003).....	p 138
Figure VI-2: Exemples de distribution croissante en fonction du débit.....	p 147
Figure VI-3: Exemples de distribution décroissante en fonction du débit.....	p 148
Figure VI-4: Exemples de distribution complexe en fonction du débit.....	p 149
Figure VI-5: Concentrations en cuivre total (μM) des échantillons d'eaux de ruissellement non toxiques et concentrations en cuivre ajouté afin d'obtenir les CE_{50} et 100	p 152
Figure VI-6: Concentration totale en cuivre dans la fraction dissoute des eaux de la Peyne (μM). Additions de cuivre nécessaires pour obtenir une inhibition de la croissance algale de 50% (Cuaj. CE_{50}) et une toxicité totale (Cuaj. CE_{100}) exprimées en μM de cuivre ajouté pour les trois stations étudiées en période d'étiage. Les deux droites délimitent l'intervalle de confiance pour les valeurs de référence du cuivre (72h- CE_{50} - 0.08 – 0.11 μM Cu).....	p 153
Figure VI-7: Concentration totale en cuivre dans la fraction dissoute des eaux de la Peyne (μM). Additions de cuivre nécessaires pour obtenir une inhibition de la croissance algale de 50% (Cuaj. CE_{50}) et une toxicité totale (Cuaj. CE_{100}) exprimées en μM de cuivre ajouté pour les deux suivis de crues (9 octobre 02 et 28 février 03). Les deux droites délimitant l'intervalle de confiance pour les valeurs de référence du cuivre (72h- CE_{50} - 0.08 – 0.11 μM Cu).	p 155
Figures VI-8 A et B: Exemples de polarogrammes obtenus lors de l'analyse polarographique d'échantillons naturels d'eaux de ruissellement issues des parcelles C (A) et NC (B).	p 157- 158
Figures VI-9 A et B: Polarogrammes des échantillons naturels d'eaux de ruissellement des parcelles viticoles NC (A) et C (B).....	p 159
Figure VI-10: Estimation graphique de la capacité de complexation du cuivre pour l'échantillon NC5 à partir de la courbe obtenue par la méthode des ajouts dosés de cuivre.....	p 161
Figure VI-11: Linéarisation par la méthode de Ruzic des données obtenues lors des ajouts dosés effectués dans l'échantillon NC5.....	p 162
Figure VI-12: Comparaison des valeurs de capacité de complexation (μM Cu) et des concentrations en Carbone Organique Dissous (mg C/l) dans les eaux de ruissellement issues de la parcelle NC.....	p 166

Liste des Abréviations

A : Ampère.

AAP : *Algal Assay Procedure*: Milieu de culture des deux algues de laboratoire *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlorella sp.*

ACI : Actions Concertées Incitatives.

AFNOR : Association Française de NORmalisation.

Ag/AgCl(sat.): Électrode de référence au chlorure d'argent.

AHAS : AcétoHydroxyAcide Synthase.

Al : Site de prélèvement sur le canal de drainage d'ALbaron.

ALS : AcétoLactate Synthase.

ALSA : *ALuminium hydroxyde-coated Sulfonic Acid*.

Ag : Site de prélèvement sur la parcelle AGon.

APHA : *American Public Health Association*: Association Américaine de Santé Publique.

ASV : *Anodic Stripping Voltammetry*: Voltampérométrie à Redissolution Anodique.

ATP : Adénosine TriPhosphate.

B : Site de prélèvement sur la parcelle Berthe.

BLM : *Biotic Ligand Model*: Modèle du Ligand Biologique.

C : Parcelle expérimentale viticole sur sol 'Carbonaté' située en AW6 (découpage de l'INRA).

CA : *Concentration Addition*: Modèle prédictif de la toxicité des mélanges complexes d'addition des doses.

CAS : *Chemical Abstract Service*.

CC : Capacité de Complexation ou Capacité Complexante.

CE_x : Concentration Efficace (ou Effective) engendrant une inhibition de X% du paramètre d'effet considéré après un temps d'exposition donné dans des conditions définies.

CE_{XR} : Concentration Efficace de référence.

CEC : Capacité d'Échange Cationique.

CEE : Communauté Économique Européenne.

CEMAGREF : CEntre National du Machinisme Agricole du Génie Rural des Eaux et Forêts.

CERAFEL : Comité Économique Régional Agricole Fruits Et Légumes de Bretagne.

CFR : Centre Français du Riz.

CI_x : Concentration suffisante pour entraîner X% d'Immobilisation des daphnies en conditions contrôlées.

CIATM : *Capillary Ion Analysis*: Electrophorèse Capillaire.

CL_x : Concentration Létale nécessaire pour tuer X% de la population considérée dans des conditions bien définies.

CLHP : Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance.

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique.

COD : Carbone Organique Dissous.

COT : Carbone Organique Total.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

CuL : Complexe Labile du Cuivre.

DCT : *Direct Current Tast*: Polarographie à Courant Continu.

DEA : Diplôme d'Études Approfondies.

DMA : DiMéthyl Arsenic.

DME : *Dropping Mercury Electrode*: Électrode à Goutte de Mercure Tombante.

DMSO : DiMéthyl SulfOxyde.

DPASV : *Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry*: Voltampérométrie à Redissolution Anodique à Tension Différentielle Surimposée.

DPN : *Direct Pulse Normal*: Polarographie Impulsionnelle.

DSESP : Département Sciences de l'Environnement et Santé Publique.

DT_x : Temps de Dégradation de la substance active = nombre de jours nécessaires pour que X% de le produit soit dégradé, exprimé en jours/heures à un pH et une température donnés.

ECS : Électrode de référence au Calomel.

EDTA : Acide Ethylène Diamine Trétraacétique.

EIM : Effet expérimental.

ENGREF : École Nationale du Génie Rural des Eaux et Forêts.

ENH : Électrode Normale à Hydrogène.

Ep : Potentiel de pic.

et al. : et les autres.

ETP : EvapoTransPiration.

F : Site de prélèvement sur le canal de drainage de Fumemorte.

FDA : Fluorescéine DiAcétate.

FIAM : *Free Ion Activity Model* : Modèle de l'Ion Libre.

GABA : *Gamma Amino-Butyric Acid* : Acide gamma amino-butyrique.

GFAAS : Spectrométrie d'Absorption Atomique au Four Graphite.

GM : Site de prélèvement sur le canal de drainage de Grand-Mar.

GSIM : *Gill Surface Interaction Model* : Modèle d'Interaction à la Surface des Branchies.

ha : Hectare.

HAP(s) : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

HG-ICP-MS : Plasma à Haute Fréquence couplé à un Spectromètre de Masse couplé à un Générateur d'Hydrure.

HMDE : *Hanging Mode Drop Electrode*: Électrode de Mercure à Goutte Pendante.

HNO₃ : Acide nitrique.

HRAC : *Herbicide Resistance Action Committee*: Comité d'Action Contre la Résistance des Herbicides.

I : Force Ionique ou Intensité de Courant (nA).

IA : *Independant Addition*: Modèle prédictif de la toxicité des mélanges complexes d'addition des réponses.

ICP-AES : *Inductively Coupled Plasma – Absorption Emission Spectrometry*: Plasma à Haute Fréquence couplé à une Absorption Atomique à Émission de Flamme.

ICP-MS : *Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry*: Plasma à Haute Fréquence couplé à un Spectromètre de Masse.

IFEN : Institut Français de l'Environnement.

INRA : Institut National de Recherche Agronomique.

IRA : Résine forte échangeuse d'anions.

IRN : Résine forte échangeuse de cations.

ISE : *Ion Selective Electrode*: Électrode Ionique Spécifique (Sélective).

ISIM : Institut des Sciences de l'Ingénieur de Montpellier.

ISTEEM : Institut des Sciences de la Terre, de l'Eau et de l'Espace de Montpellier.

ISO : Organisme de Standardisation International.

IUPAC : *International Union of Pure and Applied Chemistry*. Union Internationale de Chimie Fondamentale et Appliquée.

K : Constante de stabilité.

KCl : Acide Chlorhydrique.

K_d et **K_f** : Constantes de dissociation (d) et de formation (f).

KNO₃ : Nitrate de potassium.

K_{oc} et **K_{ow}** : Coefficients de partage carbone organique/eau (oc) et octanol/eau (ow).

K_s : Constante de solubilité.

< **LD** : Inférieur à la Limite de Détection.

LOEC : *Lowest Observed Effect Concentration*: Concentration la plus faible entraînant un effet observable.

< **LQ** : Inférieur à la Limite de Quantification.

MES : Matières En Suspension.

MHg : Amalgame Métal – Mercure.

ML : Complexe Métal – Ligand.

MMA : MonoMéthyl Arsenic.

MO : Matières Organiques.

MON : Matière Organique Naturelle.

MS : Matières Sèches.

MSE : Maison des Sciences de l'Eau de Montpellier.

NC : Parcelle expérimentale viticole sur sol 'Non Carbonaté - acide', située en 122 (découpage de l'INRA).

nd : Non Déterminé.

NDIR : Cellule de détection Infra-Rouge Non Dispersif.

NF : Norme Française.

NOEC : *No Observed Effect Concentration*: Concentration la plus forte sans effet observé.

NPOC : *Non-Purgeable Organic Carbon*: Carbone organique non purgeable.

OCDE : Organisation pour la Coopération et le Développement Économique.

Pa : Pascal.

PC(s) : PhytoChélatines.

PCB(s) : PolyChloroBiphényles.

PM : Poids Moléculaire.

PPO : ProtoPorphyrinogène Oxidase.

PVC : PolyChlorure de Vinyle.

PVDF : PolyFluorure de VinyliDène.

RFU : Unité Relative de Fluorescence.

Rh : Site de prélèvement sur le Rhône.

RI : Ratio d'Inhibition.

SAA : Spectrométrie d'Absorption Atomique.

SAU : Surface Agricole Utile.

SMDE : *Static Mercury Drop Electrode*: Électrode à Goutte de Mercure Statique.

SPE : Solid Phase Extraction: Extraction en Phase Solide.

SPEX : Solution synthétique multi-élémentaire de calibration, de concentrations connues.

TE : Parcelle expérimentale TEmoin.

TIM : Effet estimé par la formule d'Abbott.

TMPE : *Thin Mercury Film Electrode*: Électrode à Film de Mercure Fin.

Tr : Temps de Rétention.

TR : Parcelle expérimentale TRaitée.

USEPA : *United States Environmental Protection Agency*: Agence de Protection de l'Environnement aux USA.

UV : Ultra-Violet.

V : Volt.

INTRODUCTION

Les micropolluants présents dans l'environnement ont des origines très variées. Leur devenir environnemental ainsi que leur impact potentiel sur les différents écosystèmes sont très dépendants de leurs interactions avec le milieu environnant. Les principaux micropolluants impliqués dans les phénomènes de pollutions chimiques sont les métaux (exemples: Cuivre, Zinc, Plomb, Cadmium), les métalloïdes (exemples: Arsenic, Sélénium), les molécules organiques (exemples: Pesticides, Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques - HAP(s), Polychlorobiphényles - PCB(s)) et certains toxiques minéraux (Cyanure). Les cycles biogéochimiques des éléments traces métalliques ainsi que des espèces organiques et inorganiques sont influencés à la fois par les phénomènes naturels et par les activités humaines. Contrairement aux métaux, présents naturellement et en proportions diverses dans la plupart des roches (fond géochimique) et de nombreux minéraux, les produits organiques sont exclusivement introduits par l'activité anthropique, principalement en agriculture, pour l'amélioration de la production des cultures. L'utilisation de ces produits phytosanitaires est à l'origine d'un problème majeur à l'interface de l'agriculture (amélioration de la productivité) et de la préservation des ressources en eau. Ces contaminants peuvent être à l'origine de perturbations à long terme des écosystèmes aquatiques récepteurs, en particulier vis à vis des producteurs primaires sensibles aux pollutions aussi bien organiques que métalliques.

L'objectif principal de la thèse est d'étudier et d'évaluer les effets de différents contaminants (métaux et pesticides) en terme de biodisponibilité, voire de toxicité, sur des algues microscopiques d'eau douce. Ces effets sur les écosystèmes aquatiques sont étudiés en prenant en compte:

- l'impact de la présence simultanée de plusieurs pesticides organiques,
- l'influence des ligands naturels inorganiques et organiques dissous et particuliers sur la biodisponibilité de contaminants inorganiques,
- la relation entre la spéciation et la biodisponibilité.

L'étude de l'impact de contaminants sur les écosystèmes aquatiques a été menée au niveau de trois sites d'étude représentant des contextes de pollution agricole différents:

- > L'impact de la présence simultanée de plusieurs pesticides organiques dans les eaux a été étudié sur un site de riziculture en Camargue. Ce site a été choisi pour l'étude de cinq pesticides (trois herbicides et deux insecticides) utilisés dans l'amélioration de la production et de la protection du riz.
- > L'influence des ligands 'naturels' sur la biodisponibilité du cuivre et du zinc a été étudiée dans un milieu artificiellement chargé en matières organiques (Le site atelier Solepur implanté à Plouvorn dans le Finistère-Nord).
- > La relation entre la spéciation et la biodisponibilité des contaminants a été abordée dans le cadre d'un site soumis à une pollution métallique combinée à une pollution par des

pesticides organiques issus du traitement de la vigne (*Le bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne, Hérault*), ainsi que sur le site *Solepur*.

Pour chacun des sites, une caractérisation des eaux (irrigation, drainage et ruissellement) a été effectuée ainsi que l'analyse de spéciation des métaux présents (essentiellement cuivre et zinc). Des bioessais, menés sur un organisme cible (algues d'eau douce) ont permis d'étudier la biodisponibilité des produits phytosanitaires, des métaux et métalloïdes retenus. La toxicité des composés seuls ou en mélange a été étudiée en conditions contrôlées en laboratoire.

Les informations issues de l'étude de ces sites, permettront de mieux comprendre l'influence des paramètres environnementaux sur la toxicité observée, ceci dans des contextes de pollutions agricoles d'origine diverse. La présence d'une multipollution peut également engendrer des phénomènes de synergie et/ou d'antagonisme qui devront être intégrés dans l'évaluation de la toxicité globale. Les études réalisées en conditions contrôlées en parallèle des études de terrain seront un complément indispensable pour une meilleure compréhension des résultats obtenus sur des échantillons environnementaux complexes.

Le travail se structure en trois parties: l'étude bibliographique, les méthodologies et la présentation des résultats.

Le chapitre bibliographique est consacré:

1 - A la présentation des différents polluants étudiés susceptibles d'être présents dans les eaux issues des trois sites d'étude retenus:

- contaminants métalliques: cuivre, zinc et arsenic,
- contaminants organiques: produits phytosanitaires utilisés en riziculture. Trois herbicides (Azimsulfuron, Oxadiazon et Prétilachlore) et deux insecticides (Fipronil et Alphacyperméthrine) ont été sélectionnés en accord avec le calendrier des opérations culturales réalisées sur le riz. Les connaissances acquises sur leur dégradabilité et leur devenir dans l'environnement ainsi que leurs effets connus sur les écosystèmes aquatiques sont également présentés.

2 - Aux outils d'évaluation de la spéciation et de la biodisponibilité des contaminants.

Cette partie est également l'occasion de présenter les différentes formes d'apports des contaminants environnementaux étudiés, par les activités agricoles retenues dans le cadre de cette étude (riziculture, épandages de lisiers de porcs et viticulture).

Le chapitre Matériel et Méthodes décrit:

- Les méthodes de caractérisation physico-chimique, d'analyses de l'élément total et de spéciation.
- Les biotests sur algues et les différents critères d'évaluation des effets.

- Les sites d'étude et le détail des suivis expérimentaux en terme de choix de parcelles, de protocole d'échantillonnage spatio-temporel et de méthodologies d'analyses spécifiques.

Le chapitre Résultats est subdivisé en quatre parties:

[1] La première partie est consacrée aux principaux résultats des études méthodologiques menées sur algues en conditions contrôlées au laboratoire. Ces essais ont été réalisés en parallèle sur deux algues de laboratoire couramment utilisées: *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlorella sp.*. Deux paramètres de suivi d'effet ont été retenus, à savoir la mesure de l'inhibition de la croissance par fluorescence et de l'activité estérasique. Les résultats obtenus ont fait l'objet de comparaison.

[2] La seconde partie traite des résultats obtenus lors de l'étude d'échantillons d'eaux soumis à une pollution organique. Le site correspondant concerne *deux parcelles rizicoles* à mode de traitement différent, *trois canaux de drainage* ainsi que le fleuve *Le Rhône* (captage des eaux d'irrigation). Lors de cette étude, les résultats de toxicité obtenus sur les échantillons naturels (parcelles, canaux de drainage et Rhône) ont été mis en relation avec les résultats analytiques de dosage des résidus de produits phytosanitaires et les résultats d'analyses des principaux métaux lourds. Les effets antagonistes ou synergiques potentiels des produits phytosanitaires recherchés ont également été appréhendés en étudiant la toxicité obtenue à partir de mélanges de pesticides limités à des mélanges de deux herbicides.

[3 & 4] Les troisième et quatrième parties sont consacrées à la description des principaux résultats obtenus lors des suivis expérimentaux, respectivement sur le dispositif *Solepur* (Partie III) et le bassin versant viticole de *Roujan* et de la rivière *La Peyne* (Partie IV), en terme de répartition des éléments majeurs et d'évolution des concentrations totales en métaux. Les principaux résultats de toxicité sont également détaillés. L'analyse d'échantillons d'eaux de ruissellement et de drainage initialement non toxiques, après ajouts de cuivre, est menée conjointement par biotests et par polarographie. Elle permet de présenter l'étude des relations potentielles entre la toxicité et les espèces chimiques mises en évidence par l'analyse polarographique.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans le cadre de cette étude nous nous sommes intéressés à l'apport de micropolluants issus de pratiques et activités agricoles en nous appuyant sur trois sites soumis à des pressions agricoles diverses: la riziculture en Camargue, l'épandage de lisiers de porcs en Bretagne et la viticulture en Languedoc-Roussillon.

I- Comportement des principaux contaminants associés aux activités agricoles sélectionnées

L'activité agricole contribue à l'entrée et à l'accumulation d'éléments traces et de pesticides à partir de différentes sources dont l'apport de produits phytosanitaires et de fertilisants. Ces apports, principalement de cuivre et de zinc par l'épandage massif de lisiers de porcs, de produits phytosanitaires d'origine minérale (Cu, Mn, Zn, As) et organique associés à une exploitation intensive de certaines cultures, ne sont pas sans conséquence pour le milieu environnant (Alloway, 1995).

I-1 Les pesticides apportés par la production rizicole en Camargue

I-1-1 Propriétés physico-chimiques des pesticides

Les **propriétés intrinsèques** des produits phytosanitaires, celles du sol (structure, type et quantité d'argiles, teneurs et nature de la matière organique, pH, propriétés redox), les paramètres et techniques d'application des produits phytosanitaires (mode, fréquence et taux d'application, surface traitée, cible...), les pratiques culturales (labours, systèmes d'irrigation, de drainage...) ainsi que les conditions climatiques et hydrologiques (intensité, fréquence et durée des pluies, évaporation potentielle) interviennent sur leur devenir dans l'environnement et doivent être considérés dans l'évaluation de leur probabilité d'occurrence et de leur risque potentiel de contamination.

Une des principales caractéristiques qui influence les risques de contamination et d'impact des produits phytosanitaires sur le milieu est leur **persistance** plus ou moins longue dans un environnement donné. On désigne sous ce terme la durée pendant laquelle une substance est décelable dans le milieu considéré. Il ne faut pas confondre cette notion avec le terme de **rémanence** qui désigne la durée pendant laquelle les effets d'un traitement restent perceptibles sur une culture. Cependant le fait que l'efficacité d'un produit ne soit plus détectée sur une culture ne signifie nullement que ce produit soit totalement dégradé ni qu'il soit inoffensif pour l'environnement. La dégradation des contaminants est évaluée par deux paramètres: **la demi-vie** et le **taux de dégradation**. La demi-vie désigne le temps nécessaire pour que la moitié de la dose initiale soit dégradée. Le taux de dégradation est associé au coefficient de la cinétique de dégradation $v = V_{max} [S / K_m + S]$ avec V_{max} : taux de dégradation maximum (mg/h) et K_m : constante de Michaelis-Menten ($S (0,5 \times V_{max})$). D'autre part, les métabolites et les produits de dégradation ne sont pas forcément inoffensifs pour le milieu (Kolpin *et al.*, 1998), ils peuvent être aussi voire plus toxiques que la molécule initiale (Tessier et Clark, 1995 ; Belfroid *et al.*, 1998).

La mobilité et le transfert des produits phytosanitaires sont fonction de leurs propriétés chimiques intrinsèques. La **volatilité** (constante de Henry), la **solubilité** dans l'eau, la capacité à se fixer aux matières complexantes du sol (coefficient de partage carbone organique-eau - K_{oc}) ainsi que le coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}) déterminent le compartiment dans lequel le produit va se retrouver préférentiellement. Le dernier indice traduit la lipophilie (hydrophobie), ou hydrophilie (lipophobie) d'une molécule. Il existe une corrélation entre la liposolubilité d'une molécule et ses aptitudes à se bioconcentrer (rétention et accumulation progressive dans un organisme vivant à partir du milieu ambiant) et, éventuellement, se bioamplifier (augmentation cumulative à mesure que l'on progresse dans la chaîne trophique) dans les écosystèmes via les organismes vivants.

I-1-2 Toxicité des herbicides

Les algues, bien que n'étant pas les organismes ciblés par l'emploi des herbicides, peuvent être affectées par leur présence de par leur similitude physiologique avec les plantes. Les principaux processus métaboliques des organismes chlorophylliens affectés par les herbicides incluent la photosynthèse (Caux *et al.*, 1996 ; Fairchild *et al.*, 1998), la respiration, la synthèse des acides aminés et des protéines (Nyström et Blanck, 1998 ; Geoffroy *et al.*, 2002 ; Sabater *et al.*, 2002), des lipides (Fairchild *et al.*, 1998), des acides gras (Kasai et Hatakemaya, 1993), des pigments et des acides nucléiques, le maintien de l'intégrité membranaire (Saenz *et al.*, 2001) et les transferts d'énergie (Peterson *et al.*, 1994) (Tableau I-1). D'autres processus vitaux peuvent être concernés tels la croissance et la différenciation, la mitose et la méiose, le transport et la translocation des ions et des molécules ainsi que la transpiration (Dexter *et al.*, 1994) (Tableau I-1). Le tableau suivant (I-1) présente une classification des principaux mécanismes d'action et niveaux d'action (tissulaire et/ou cellulaire) des principales familles chimiques d'herbicides.

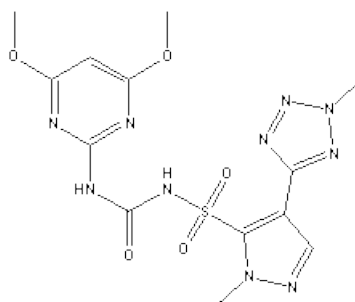
Parmi les produits phytosanitaires préconisés pour lutter contre le développement des adventices (se référer à l'annexe I-I), trois herbicides ont été retenus dans le cadre de cette étude. Leurs propriétés physico-chimiques, leur comportement dans l'environnement ainsi que leur mode d'action spécifique et leur toxicité sur certains organismes aquatiques seront détaillés dans les paragraphes suivants. Toutes les données présentées sont majoritairement issues des fiches Agritox de l'INRA.

Tableau I-1: Classification des herbicides par famille chimique et mode d'action spécifique (Adapté de la classification HRAC - Schmidt, 1997).

Groupes HRAC	Mode d'action	Famille Chimique
A	Inhibition de l'AcétylCholineA Carboxylase (ACCase)	Aryloxyphénoxypropionates Cyclohexanediones
B	Inhibition de l'AcétoLactate Synthase (ALS) et de l'AcétoHydroxyAcide Synthase (AHAS)	Sulfonylurées , Pyrimidinyl(thio)benzoates Imidazolinones, Triazolopyrimidines
C	Inhibition de la photosynthèse au niveau du photosystème II	Triazines, Triazinones, Triazolinones Phényl-carbamates, Urées, Amides, Nitriles Benzothiadiazinones, Phényl-pyridazines
D	Perturbation du transport d'électrons au niveau du photosystème I	Bipyridylium
E	Inhibition de la ProtoPorphyrinogène Oxidase (PPO)	Oxadiazoles , Thiadiazoles, Triazolinones Phénylpyrazoles, Diphényléthers, N-phénylphthalimides
F1	Inhibition de la biosynthèse des caroténoïdes au niveau de la Phytoène DéSaturase (PDS)	Pyridazinones Pyridinecarboxamides
F2	Inhibition de la 4-HydroxyPhényl-Pyruvate-Dioxygénase (4-HPPD)	Trikétones, Isoxazoles, Pyrazoles
F3	Inhibition de la biosynthèse des caroténoïdes (cible inconnue)	Triazoles, Urées, Diphényléthers
G	Inhibition de la EPSP synthase	Glycines
H	Inhibition de la glutamine synthétase	Acides phosphiniques
I	Inhibition de la DiHydroPtéroate synthase (DPH)	Carbamates
K1	Inhibition de l'assemblage des microtubules	Dinitroanilines, Pyridines, Benzamides
K2	Inhibition de la mitose / organisation des microtubules	Carbamates
K3	Inhibition de la division cellulaire	Chloroacétamides , Acétamides, Oxyacétamides
L	Inhibition de la synthèse de la cellulose	Nitriles, Benzamides, Triazolocarboxamides
M	Destruction membranaire	Dinitrophénols
N	Inhibition de la synthèse lipidique	Thiocarbamates, Acides Chloro-Carboniques, Phosphorodithioates, Benzofuranes
O	Action sur les auxines	Acides Phénoxy-Carboxyliques, Benzoïques Acides Pyridine-Carboxyliques, Quinoline-Carboxyliques
P	Inhibition du transport des auxines	Phthalamates Semicarbazones
Z	Mécanismes inconnus	Acides arylaminopropioniques, Organoarsenicals Pyrazoliums

I-1-3 L'Azimsulfuron

I-1-3-1 Propriétés physico-chimiques



L'Azimsulfuron ou 1-(4,6-diméthoxypyrimidin-2-yl)-3-[1-méthyl-4-(2-méthyl-2H-tétrazol-5-yl)-pyrazol-5-ylsulfonyle]urée (International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC) fait partie de la famille des Sulfonylurées (Tableau I-2).

Formule brute	C ₁₃ H ₁₆ N ₁₀ O ₅ S
Poids moléculaire (g/mole)	424,4
Constante de Henry (Pa*m³/mole)	5 à 9 10 ⁻¹¹
Solubilité dans l'eau (mg/l) à 20°C et pH=7	1050
Log Kow (25°C, pH=7)	0,043

Tableau I-2: Principales caractéristiques de l'Azimsulfuron (données Agritox).

Cet herbicide, utilisé en traitement de post-levée pour la culture du riz, n'est pas appliqué directement sur le sol mais introduit dans la couche d'eau. C'est un composé à action systémique qui peut être absorbé par les racines et les feuilles et transporté dans le xylème et le phloème. Son temps de demi-vie est de 89, 124 et 132 jours aux pH respectifs de 5, 7 et 9 à 26°C.

I-1-3-2 Dégradabilité et devenir environnemental

L'azimsulfuron est susceptible de se dégrader par phototransformation directe dans l'eau, sa DT₅₀ est alors de 103, 164 et 225 jours à 20°C aux pH respectifs de 5, 7 et 9 (photopériode 24/24 ; données Agritox). Les sulfonylurées sont principalement décomposées par hydrolyse chimique et par l'action microbienne alors que la photolyse agit avec une moindre importance sur leur dégradation (Blair et Martin, 1988). Ces composés sont absorbés plus fermement sur les particules de sol et de la matière organique lorsque le sol est acide (pH faible). La persistance de l'azimsulfuron en plein champ donne une DT₅₀ de 3 jours et une DT₉₀ comprise entre 8 et 10 jours. Sa persistance mesurée en laboratoire (DT₅₀) varie, quant à elle, de 21 à 178 jours à pH = 6,1, de 26 à 116 jours à pH = 6,9 sur sols limoneux fins. Sur sols limoneux

sableux, elle varie de 18 à 60 jours (pH = 5,8), sur sols argileux de 98 à plus de 120 jours (pH = 8,1) et enfin sur sols argileux limoneux de 120 à 134 jours (pH = 8,1). La variation de pH à l'intérieur d'un champ influence fortement sur la capacité d'un herbicide à persister dans le sol. Ce qui se traduit par une persistance des sulfonilurées plus élevée aux pH basiques.

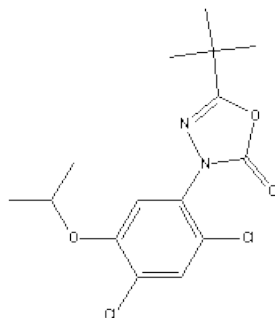
I-1-3-3 Mode d'action et Toxicité

L'azimsulfuron appartient à la famille des sulfonilurées, reconnues pour leur effet inhibiteur de l'AcétoLactate Synthase (ALS) également appelée AcétoHydroxyAcide Synthase (AHAS) impliquée dans la biosynthèse de certains acides aminés essentiels (valine, leucine, isoleucine). Cette inhibition engendre un arrêt rapide de la division cellulaire donc de la croissance. Cette diminution de la croissance voire la totale destruction de la plante peuvent être imputées à un manque en acides aminés essentiels au développement normal ou dues à une accumulation de produits de synthèse intermédiaires et toxiques (Brown, 1990 ; Brown et Kearney, 1991 ; Sabater *et al.*, 2002).

Cet herbicide est classé N R53 R50 conformément au classement en vigueur de la Commission d'étude de la toxicité des produits antiparasitaires à usage agricole et assimilé (CTM du 14/01/98). Il peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique (R53) et est considéré comme très toxique pour les organismes aquatiques (R50). Pour la truite arc-en-ciel et le crapet arlequin, les concentrations en azimsulfuron suffisantes pour obtenir la CL_{50} (Concentration Létale engendrant 50% de mortalité) varient respectivement de 0,36 à plus de 2,26 mM pour une durée d'exposition de 96 heures. Par contre, en toxicité chronique, l'azimsulfuron a des effets sur l'éclosion des œufs de truites arc-en-ciel à une concentration beaucoup plus faible de 0,015 mM (90 jours d'exposition) ainsi que sur la croissance et la mortalité des juvéniles pour une durée d'exposition de 28 jours, à une concentration de 0,05 mM. La mobilité de *Daphnia magna* est également affectée par ce produit pour une durée d'exposition de 21 jours à une concentration de 0,013 mM. En ce qui concerne les algues, pour une exposition de 120 heures, l'inhibition de 50% de la croissance est obtenue pour des concentrations comprises entre 0,03 et 0,05 μ M pour respectivement *Selenastrum capricornutum*, *Skelatonema*, *Navicula* et *Anabaena flos-aquae*.

I-1-4 L'Oxadiazon

I-1-4-1 Propriétés physico-chimiques



L'Oxadiazon ou 5-tert-Butyl-3-(2,4-dichloro-5-(isopropoxy)phenyl)-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-one (IUPAC) fait partie de la famille des Oxadiazoles. Cet herbicide de contact à diffusion nulle ou très faible, utilisé en traitement de pré-émergence dans la culture du riz, est un composé stable à un pH compris entre 5 et 7. Le tableau suivant (**I-3**) présente ses principales caractéristiques physico-chimiques.

Formule brute	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₃
Poids moléculaire (g/mole)	345,23
Constante de Henry (Pa*m³/mole) à 25°C	3,57 10 ⁻⁷
Solubilité dans l'eau (mg/l) à 20°C	1
Coefficient de partage octanol/eau	63100
Log Kow	4,8

Tableau I-3: Principales caractéristiques de l'Oxadiazon (données Agritox).

I-1-4-2 Dégradabilité et devenir environnemental

L'oxadiazon est susceptible de se dégrader par phototransformation directe dans l'eau (DT₅₀ = 2,75 jours à un pH de 5) et par photodégradation directe dans le sol (DT₅₀ = 165 jours) (Données Agritox). La persistance de l'oxadiazon au champ est de 2 mois, la DT₅₀ plein champ varient de 15 à 180 jours selon les conditions climatiques et l'humidité du sol (Barret et Lavy, 1984 ; Wauchope *et al.*, 1991). L'étude menée en laboratoire par Ying et Williams en 2000 (a) donne une valeur de DT₅₀ dans l'eau de 7,38 jours. Ce produit est rapidement adsorbé lors de tests de lixiviation sur colonnes, les métabolites sont, quant à eux, peu mobiles. D'après les études menées, par Das *et al.* (2003) et Ying et Williams (2000b), le temps de demi-vie de l'oxadiazon dans le sol est de respectivement 12 et 14 jours. Les travaux de Das *et al.* (2003) démontrent qu'après 20 jours d'application, le taux de dissipation de l'oxadiazon est très rapide (64%), après 60 jours seulement 0,5% de résidus est encore présent dans le sol des rizières traitées. Les oxadiazoles sont fortement adsorbés sur la matière organique et les colloïdes du sol (Ying et Williams, 2000b). Ying et Williams (2000a) concluent qu'en présence de sédiments, la sorption de l'oxadiazon est forte (Kd variant de 23 à 28) avec une

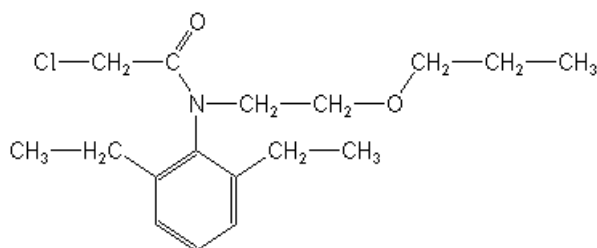
fixation préférentielle sur la matière organique, les composés argileux intervenant dans une moindre mesure. Par contre, en l'absence de sédiments, la dégradation de l'oxadiazon s'effectuera plus rapidement.

I-1-4-3 Mode d'action et Toxicité

Les oxadiazoles sont connus pour affecter la biosynthèse de la porphyrine et indirectement la biosynthèse des chlorophylles en inhibant l'action de la protoporphyrinogène oxidase ce qui induit une accumulation non régulée de protoporphyrine IX. Ce pigment photosensible génère des oxygènes singulets qui à terme sont responsables de la destruction de la membrane par peroxydation (Dayan and Duke, 1997 ; Duke *et al.*, 2000 ; Geoffroy *et al.*, 2002). Conformément au classement en vigueur de la Communauté Économique Européenne (30/09/96 adaptation de la directive européenne 67/548/CEE), l'oxadiazon est répertorié N R53 R50. Tout comme l'azimsulfuron, il est considéré comme très toxique pour les organismes aquatiques (R50) et peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique (R53). En effet, les concentrations en oxadiazon nécessaires pour obtenir la CL₅₀ varient respectivement, pour la truite arc-en-ciel et le crapet arlequin, de 3 à 26 et de 2 à 36 µM pour une durée d'exposition de 96 heures. La concentration entraînant une immobilisation de 50% de *Daphnia magna* est supérieure à 7 µM pour un temps d'exposition de 48 heures. En toxicité chronique, l'oxadiazon agit sur la croissance des juvéniles de vairons et de truites arc-en-ciel pour des durées d'exposition respectives de 43 et 60 jours à des concentrations de 0,096 et 0,0025 µM. En ce qui concerne les algues, pour une exposition de 120 heures, l'inhibition de 50% de la croissance est obtenue avec respectivement une concentration de 10 µM pour *Anabaena flos-aquae* et de 0,37 et 0,024 µM pour respectivement *Navicula pelliculosa* et *Selenastrum capricornutum*.

I-1-5 Le Prétilachlore

I-1-5-1 Propriétés physico-chimiques



Le Prétilachlore ou acétamide-2-chloro-N-(2,6-diéthylphényl)-N-(2-propoxyéthyl) - (Chemical Abstract Service - CAS) ; 2-chloro-2',6'-diéthyl-N-(2-propoxyéthyl)acétanilide – (IUPAC), fait partie de la famille des Chloroacétamides (Tableau I-4).

Formule brute	C ₁₇ H ₂₆ ClNO ₂
Poids moléculaire (g/mole)	311,9
Tension de vapeur à 20°C (µPa)	134,6
Solubilité dans l'eau (mg/l) à 20°C	50
Coefficient de partage octanol/eau	12020
Log Kow	4,08

Tableau I-4: Principales caractéristiques du Prétilachlore (données Agritox).

Cet herbicide utilisé aussi bien en pré que post-semis pour la culture du riz, possède une demi-vie supérieure à 200 jours à des pH compris entre 1 et 9 et une demi-vie de seulement 14 jours pour des pH basiques (>13). Inhibiteurs des pousses, les composés de la famille des chloroacétamides sont uniquement mobiles dans le xylème.

I-1-5-2 Dégradabilité et devenir environnemental

La dégradation des chloroacétamides est principalement assurée par les microorganismes. Le prétilachlore est susceptible de se dégrader par phototransformation directe dans l'eau (DT₅₀ comprise entre 2,4 et 5,1 jours). Sa persistance en plein champ donne des valeurs comprises entre 11 et 60 jours et une DT₅₀ de 25 jours en sol inondé. Dans de telles conditions, il n'est pas persistant et ne fournit pas de métabolites majeurs. Sa persistance est plus grande en conditions anaérobies et dans les sols frais. Le prétilachlore reste immobile (forte adsorption) lors de tests de lixiviation sur colonnes sur sols limoneux sableux, limoneux fins et sur sols sableux (pH = 7,8). Pour un pH inférieur à 6,6, il devient peu mobile (données Agritox).

I-1-5-3 Mode d'action et Toxicité

Le prétilachlore est répertorié Xi R43 conformément au classement en vigueur de la Commission d'étude de la toxicité des produits antiparasitaires à usage agricole et assimilé

(CMT du 18/11/92). C'est un produit irritant (Xi) qui peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau (R43). Le mode et le site d'action de ce composé sont mal connus mais la division cellulaire semble affectée (Kasai, 1999). D'après Schmalfluss *et al.* (2000), il agirait sur la division cellulaire en bloquant la synthèse des très longues chaînes d'acides gras.

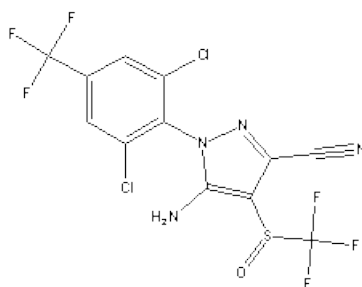
La concentration en prétilachlore nécessaire pour obtenir la CL₅₀ pour la carpe miroir est de 7,4 µM, elles varient de 2,9 à 9,0 et de 6,7 à 8,7 µM respectivement pour la truite arc-en-ciel et le poisson chat, pour une durée d'exposition de 96 heures. Peu de données de toxicité chronique sont disponibles pour le prétilachlore. Seule la concentration entraînant 50% d'inhibition de la croissance d'une algue non spécifiée est mentionnée (0,004 µM), pour une durée d'exposition non précisée.

Même si le prétilachlore n'est pas répertorié comme néfaste pour les organismes aquatiques, les données fournies par Agritox le classent comme l'herbicide étudié le plus toxique pour les algues (gradient de toxicité suivant pour les algues Prétilachlore > Oxadiazon > Azimsulfuron). De plus, les conditions expérimentales n'étant pas détaillées dans les fiches de l'INRA, il semble nécessaire de tester chacun des produits, sur un organisme aquatique cible, seul et en association, ceci de façon à vérifier le gradient de toxicité dans nos conditions expérimentales d'analyses et pour chacun des paramètres d'effet étudiés et de mettre en évidence de possibles interactions entre des herbicides possédant des mécanismes d'action différents.

Des interventions phytosanitaires supplémentaires sur le riz, peuvent être effectuées pour prévenir du développement des larves de chironomes (mai-juin) et des pyrales (juillet- août). Elles ne sont pas systématiques et se traduisent par l'emploi d'insecticides appropriés. Généralement le fipronil est utilisé pour lutter contre les larves de chironomes (Stevens *et al.*, 1998) et l'alphacyperméthrine pour détruire les pyrales. Ces deux insecticides agissent au niveau du système nerveux des insectes ciblés en affectant certains des canaux ioniques présents sur la fibre nerveuse des axones (Valles et Koehler, 1998).

I-1-6 le Fipronil

I-1-6-1 Propriétés physico-chimiques



Le Fipronil ou 1H-pyrazole-3-carbonitrile,5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluorométhyl)phenyl]-4-[(trifluorométhyl)sulfinyl] - (CAS) ; [5-amino-1-(2,6-dichloro- α - α - α - trifluoro-p-tolyl)-4-trifluorométhyl-sulfinylpyrazole-3-carbonitrile] - (IUPAC) - fait partie de la famille des Pyrazoles (Tableau I-5).

Formule brute	C ₁₂ H ₄ C ₁₂ F ₆ N ₄ OS
Poids moléculaire (g/mole)	437,14
Constante de Henry (Pa*m³/mole) à 20°C	3,75 10 ⁻⁵
Solubilité dans l'eau (mg/l) à 20°C	2,4 et 2,2 aux pH 5 et 9
Log Kow	4

Tableau I-5: Principales caractéristiques du Fipronil (données Agritox).

Cet insecticide utilisé pour lutter contre le développement des larves de chironomes possède un temps de demi-vie de 14 jours au pH de 9 et est supérieur à 30 jours pour des pH compris entre 5 et 7.

I-1-6-2 Dégradabilité et devenir environnemental

Le fipronil est susceptible de se dégrader par phototransformation directe dans l'eau (DT₅₀ de 1 jour) et par photodégradation directe dans le sol avec une DT₅₀ jour de 34 jours et une DT₅₀ nuit de 49 jours (photopériode 8/16) sur sols limoneux argileux. Sa persistance en plein champ donne une DT₅₀ variant de 96 à 135 jours. Sa persistance mesurée en laboratoire varie, quant à elle, de 18 à 40 jours sur sols sableux limono-argileux. Elle est de 62 jours sur sols sableux et de 117 jours sur sols argileux-sablo-limoneux. Ce produit est immobile (fortement adsorbé) lors de tests de lixiviation sur colonnes sur sols sableux, limoneux, sableux limono-argileux et peu mobile sur sols argileux sablo-limoneux (Données Agritox).

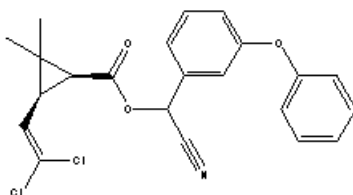
I-1-6-3 Mode d'action et Toxicité

Les insecticides de la famille des pyrazoles, dont est issu le fipronil, sont connus pour leur action inhibitrice du récepteur GABA ('Gamma-AminoButyric Acid') qui régule l'entrée des ions chlorures dans les neurones (Cole *et al.*, 1993). Ils agissent au niveau du système nerveux central et sont responsables d'une hyper-excitation nerveuse et musculaire (Valles et Koehler, 1998).

Le fipronil est classé N R53 R48/25 523/24/25 R55 R57 50 conformément au classement en vigueur de la Commission d'étude de la toxicité des produits antiparasitaires à usage agricole et assimilé (CTM du 09/06/93). Ce composé, très toxique par inhalation, par contact par la peau et par ingestion (R23/24/25) peut provoquer en cas d'exposition prolongée par ingestion, de graves effets pour la santé (R48/25). Tout comme l'oxadiazon et l'azimsulfuron, ce produit peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique (R53). Il est également considéré comme très toxique pour la faune (R55), pour les abeilles (R57) et pour les organismes aquatiques (R50). En effet, les concentrations en fipronil nécessaires pour obtenir la CL_{50} , pour le crapet arlequin, la truite arc-en-ciel et la carpe miroir, sont respectivement égales à 0,19, 0,57 et 0,78 μM pour une durée d'exposition de 96 heures. Pour *Daphnia magna*, la CI_{50} est supérieure à 0,43 μM pour une exposition de 48 heures. En toxicité chronique, le fipronil agit sur la survie larvaire des truites arc-en-ciel pour une durée d'exposition de 90 jours à une concentration de 0,03 μM . Le taux de croissance ainsi que la reproduction de *Daphnia magna* sont également affectés par ce produit pour une durée d'exposition de 21 jours pour des concentrations respectives de 0,02 et 0,046 μM . En ce qui concerne *Scenedesmus subspicatus*, une concentration de 0,16 μM est nécessaire pour obtenir une inhibition de 50% de la croissance algale pour une temps d'exposition de 96 heures.

I-1-7 L'Alphacyperméthrine

I-1-7-1 Propriétés physico-chimiques



L'Alphacyperméthrine ou cyano-(3-phenoxyphenyl)-methyl 3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate (IUPAC) fait partie de la famille des Pyréthrinoïdes. Cet insecticide utilisé en riziculture pour lutter contre le développement des pyrales est un composé stable à un pH compris entre 3 et 7 et instable à un pH compris entre 12 et 13. Ses principales caractéristiques physico-chimiques sont détaillées dans le tableau suivant (**I-6**).

Formule brute	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃
Poids moléculaire (g/mole)	416,3
Tension de vapeur (μPa)	0,17
Solubilité dans l'eau (mg/l) à 25°C	< 0,01
Coefficient de partage octanol/eau	140000
Log Kow	5,16

Tableau I-6: Principales caractéristiques de l'Alphacyperméthrine (données Agritox).

I-1-7-2 Dégradabilité et devenir environnemental

L'alphacyperméthrine est susceptible de se dégrader par phototransformation directe dans l'eau (1,3 jours). Sa persistance au champ mesurée en laboratoire fournit une DT₅₀ de 189 jours sur sols limono-argileux et de 91 jours sur sols sableux. Ce produit est fortement adsorbé lors des tests de lixiviation sur colonnes et présente une très faible solubilité. Il est non biodégradable en 28 jours.

I-1-7-3 Mode d'action et Toxicité

Les pyréthrinoïdes perturbent la perméabilité des membranes nerveuses en agissant au niveau des canaux sodium voltage-dépendant ce qui entraîne une stimulation nerveuse continue (Soderlund et Bloomquist, 1989). Les canaux à sodium régulent le flux entrant d'ions sodium responsables de l'excitation de l'axone. Le site d'action de cette famille d'insecticides n'est pas connu précisément mais ils semblent agir conjointement sur les systèmes nerveux central et périphérique. Une perte de la coordination des mouvements, des convulsions et une paralysie totale sont les principaux symptômes observés (Valles et Koehler, 1998).

L'alphacyperméthrine est répertorié N T R53 R25 R50 conformément au classement en vigueur de la Commission d'étude de la toxicité des produits antiparasitaires à usage agricole et assimilé (CMT du 16/02/00). Tout comme le fipronil, l'oxadiazon et l'azimsulfuron, ce produit peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique (R53). Ce composé est considéré comme très toxique pour les organismes aquatiques (R50) et toxique en cas d'ingestion (R25). Pour le vairon à grosse tête et la truite arc-en-ciel, les concentrations en alphacyperméthrine nécessaires pour obtenir la CL_{50} sont respectivement égales à 0,0022 et 0,0067 μM pour une durée d'exposition de 96 heures. Pour *Daphnia magna*, la CI_{50} est de 0,0026 et 0,0007 μM pour respectivement une exposition de 24 et 48 heures. En toxicité chronique, l'alphacyperméthrine à une concentration de 0,00007 μM , a des effets sur la survie des juvéniles de vairons à grosse tête pour une durée d'exposition de 34 jours. A la même concentration, cette substance agit sur la reproduction de *Daphnia magna* pour une durée d'exposition de 21 jours. En ce qui concerne *Selenastrum*, une concentration supérieure à 0,24 μM entraîne une inhibition de moitié, de sa croissance (données Agritox).

Même si les organismes aquatiques et en particulier les algues ne sont pas les organismes ciblés par l'emploi d'insecticides, les données recueillies sur les fiches Agritox nous prouvent que leur action peut également être néfaste pour les écosystèmes aquatiques. De plus ces insecticides pouvant également interagir avec les autres produits phytosanitaires utilisés en riziculture, il nous a semblé judicieux de les inclure dans notre étude.

Parmi les différents produits phytosanitaires utilisés en riziculture afin de protéger la quantité et la qualité de la récolte, certains peuvent se retrouver à l'état de traces dans les eaux d'irrigation et de drainage issues des rizières. L'impact le plus important de ces traitements phytosanitaires est lié à la réception des eaux d'irrigation des rizières et à leur apport potentiel de résidus phytosanitaires dans les étangs de la Réserve Naturelle de Camargue (Étang de Vaccarès en particulier).

En ce qui concerne l'apport de métaux et métalloïdes dans l'environnement, le cuivre est majoritairement introduit par la viticulture et l'épandage de lisiers de porcs. Il en est de même pour le zinc utilisé en agriculture sous forme de sulfate mais également présent dans de nombreux produits phytosanitaires dérivés de l'acide dithiocarbamique (zinèbe, mancozèbe, ziram...). Du fait de leur stabilité, de leur non-dégradabilité et de leur persistance dans l'environnement, les métaux et les métalloïdes sont propices au transport et à l'accumulation dans les trois compartiments de l'environnement. Au cours de leur transport ces éléments subissent des interactions diverses, notamment avec des espèces organiques ou minérales, en suspension ou dissoutes avec lesquelles ils peuvent former des complexes. De ces interactions dépend fortement leur devenir dans l'environnement.

I-2- Le cuivre, le zinc et l'arsenic: apports par les épandages de lisiers de porcs et la viticulture

La justification du choix de l'étude du cuivre, du zinc et de l'arsenic ainsi que des généralités sur l'épandage de lisiers de porcs et la viticulture sont présentées en annexes I-II et I-III.

I-2-1 Comportement du cuivre et du zinc dans l'environnement

Dans l'eau, le cuivre et le zinc (de poids moléculaire respectif de 63,546 et 65,39 g/mole) sont présents sous forme hydratée (M^{2+}), complexée par des ligands organiques (acides fulviques et humiques) ou inorganiques ou sont adsorbés sur des particules (Figure I-1).

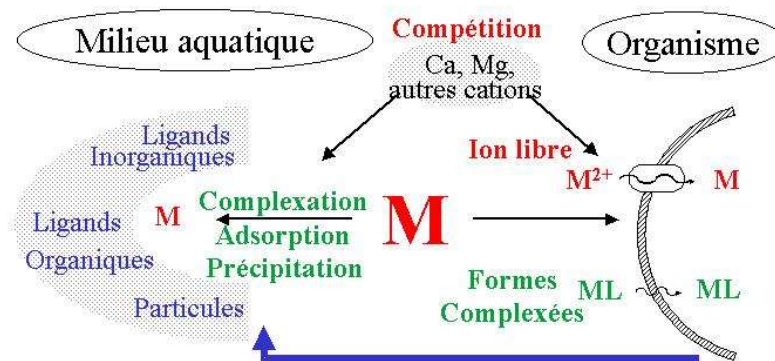


Figure I-1: Interactions subies par les métaux au cours de leur transport en milieu aquatique (Gilbin, 2002 adapté de Turner et Tessier, 1995).

Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau (pH, potentiel redox, lumière, température, dureté, force ionique, teneur en ligands organiques et inorganiques...) agissent sur le degré de dissociation entre les formes complexées et ionique. La **complexation** avec des ligands organiques et minéraux ainsi que la **compétition** avec d'autres cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}) influencent notamment le devenir des métaux (Figure I-1). De surcroît, le ruissellement peut également être responsable de la dissolution et de la mise en suspension de cristaux précipités, du transport de la forme dissoute présente dans la lame d'eau, du métal adsorbé sur les particules de sol érodées ainsi que de leur désorption. La majeure partie du cuivre rejeté dans l'eau se retrouve sous forme particulaire et tend à se déposer, à précipiter ou à s'adsorber sur la matière organique, les argiles et sur les oxydes et hydroxydes de manganèse et de fer. D'ailleurs, une quantité importante du zinc et du cuivre présents dans les eaux de surface se retrouve et s'accumule finalement dans les sédiments des rivières, des estuaires et des zones côtières où ces métaux se lient à des ligands inorganiques et organiques, réduisant ainsi leur mobilité et biodisponibilité. Néanmoins, un relargage ultérieur des métaux reste possible depuis les sédiments contaminés en fonction des conditions physico-chimiques du milieu.

Dans les sols, le zinc et le cuivre s'accumulent en surface sous des formes stables par adsorption sur la matière organique et migrent peu en profondeur. Leur comportement dans le sol est fortement dépendant du pH, du potentiel redox du sol, de sa capacité d'échange cationique, de la nature, distribution et vitesse de décomposition de la matière organique, de la présence d'oxydes, des proportions en sables, limons et argiles.

I-2-2 Toxicité et mode d'action du cuivre

A faibles concentrations, le cuivre est un élément essentiel pour les algues (Tableau I-7) comme constituant et cofacteur de différentes enzymes, il intervient également dans diverses voies métaboliques comme catalyseur (Franklin *et al.*, 2002). Cependant, à des concentrations plus importantes que celles nécessaires à un développement optimal, le cuivre inhibe la croissance et plusieurs processus cellulaires incluant la photosynthèse, la respiration, l'activité enzymatique mais également la synthèse de pigments et de protéines. La division cellulaire peut, également, être affectée par le cuivre par oxydation des groupements thiol, sulfhydryl et du glutathion (Stauber et Florence, 1987 ; Raven *et al.*, 1999 ; Franklin *et al.*, 2000 ; Yruela *et al.*, 2000).

L'élément cuivre est susceptible de se fixer très rapidement sur la surface membranaire des algues (Figure I-1), l'introduction dans la cellule étant facilitée par le phénomène de diffusion (Luoma, 1995). Au niveau membranaire, le cuivre peut engendrer des modifications du potentiel de membrane et de la perméabilité de celle-ci (Sunda et Huntsman, 1983 ; Cid *et al.*, 1996 ; Franklin *et al.*, 2000-2001b). Une fois intégrée dans la cellule, le cuivre peut inhiber les enzymes présentes dans le cytoplasme comme les catalases (Stauber et Florence, 1987), les estérases (Arsenault *et al.*, 1993) et la β -D-galactosidase (Peterson et Stauber, 1996 ; Franklin *et al.*, 2000-2001b). Il peut également causer des modifications de pH et perturber le transport des électrons au niveau mitochondrial ainsi que la production d'ATP (Cid *et al.*, 1995-1996) et affecter les organelles subcellulaires comme les chloroplastes. Wong *et al.* (1994) ont noté une altération structurale de la membrane des thylakoïdes de *Chlorella sp.* ainsi qu'une inhibition de la photosynthèse suite à une exposition prolongée des algues à de fortes concentrations de cuivre.

Eléments	Symbole	Indispensable à faibles conc.		Toxiques à fortes conc.	
		Végétaux	Animaux	Végétaux	Animaux
Arsenic	As		✓	✓	✓
Bore	B			✓	
Cobalt	Co	✓	✓		✓
Chrome	Cr		✓	✓	✓
Cuivre	Cu	✓	✓	✓	✓
Etain	Sn		✓		✓
Fluor	F		✓		
Fer	Fe	✓	✓		
Iode	I		✓		✓
Manganèse	Mn	✓	✓	✓	
Molybdène	Mo	✓	✓		✓
Nickel	Ni	✓	✓	✓	✓
Sélénium	Se		✓		✓
Silicium	Si		✓		✓
Vanadium	V		✓	✓	✓
Zinc	Zn	✓	✓	✓	✓
Cadmium	Cd			✓	✓
Mercur	Hg			✓	✓
Plomb	Pb			✓	✓
Thallium	Tl			✓	✓

Tableau I-7: Éléments métalliques traces indispensables aux organismes biologiques (animaux et végétaux) et toxicité (Source Ademe, 1995 ; Juste *et al.*, 1995).

I-2-3 Toxicité et mode d'action du zinc

Le zinc est un élément essentiel pour l'ensemble des organismes vivants (Tableau I-7), il joue un rôle spécifique dans de nombreuses réactions biologiques en particulier enzymatiques en intervenant comme cofacteur. Tout comme le cuivre, en concentrations excessives (supérieures à sa concentration optimale), il peut perturber les processus métaboliques et endommager certains tissus intracellulaires (Price et Morel, 1994). L'étude menée par Paulsson *et al.* (2000) montre que le zinc interfère avec le phosphore intracellulaire présent dans les algues et le phosphore extracellulaire, rendant ce nutriment moins disponible pour la communauté algale.

I-2-4 Comportement de l'arsenic dans l'environnement

L'arsenic existe dans l'environnement sous forme inorganique et sous différents états d'oxydation (arsenic élémentaire (0), arséniate (+V), arsénite (+III) et arsine (-III)) qui interviennent dans le comportement, la mobilité, la biodisponibilité et la toxicité de cet élément dans les milieux aquatiques (Stoeppler, 1992 ; Jain et Ali, 2000). L'arsenic forme également des composés organiques très stables, tant trivalents que pentavalents. Le comportement dans l'eau de l'arsenic, métalloïde de poids moléculaire de 74,92 g/mole, est essentiellement sous l'influence de facteurs physico-chimiques d'adsorption, de complexation, de précipitation-dissolution et de co-précipitation. De plus, l'arsenic peut subir diverses transformations chimiques et biochimiques telles que l'oxydation, la réduction, l'hydrolyse, la méthylation et la déméthylation. Dans les eaux naturelles comme dans les sols, les arsénates (V) et les arsénites (III) sont les principales formes d'arsenic. En général, les composés d'As(V) sont dominants dans les milieux aérés alors que les composés d'As(III) sont dominants en conditions légèrement réductrices. Le pH joue alors un rôle important sur la spéciation chimique dans les différentes phases liquides et solides en présence, en déterminant le degré d'oxydoréduction (+III ou +V). A terme les sédiments océaniques constituent l'accumulateur final d'une bonne partie de l'arsenic présent dans l'environnement (Molénat *et al.*, 2000).

I-2-5 Toxicité et mode d'action de l'arsenic

Contrairement au cuivre et au zinc, l'arsenic n'est pas un élément essentiel à la croissance des algues (Tableau I-7). Sur la membrane algale, l'arsenic se fixe sur les mêmes sites que le phosphate (élément essentiel pour la croissance algale) de par ses propriétés chimiques très voisines et est intégré, les algues ne différenciant pas son transport de celui du phosphate. Dans les cellules algales, l'As (V) sera biologiquement métabolisé en forme III ou en formes méthylées (produits de détoxication), MonoMéthylArsenic (MMAs) et DiMéthylArsenic (DMAs) ainsi qu'en composés plus complexes comme les arsénosucres et les arsénolipides, l'arsénobétaïne et l'arsénocholine (Knauer *et al.*, 1999 ; Beceiro-Gonzales *et al.*, 2000). En règle générale, la forme trivalente de l'arsenic est considérée comme soixante fois plus toxique que la forme oxydée pentavalente pour l'homme et la plupart des organismes aquatiques (National Academy of Sciences, 1977 ; Squibb et Fowler, 1983 ; Jain et Ali, 2000 ;

Hughes, 2002 ; Aposhian *et al.*, 2004). Les composés inorganiques sont, quant à eux, bien plus toxiques que les composés organiques de l'arsenic (Jain et Ali, 2000 ; Hughes, 2002).

II- Outils d'évaluation de la spéciation et de la biodisponibilité

Face aux nombreuses substances issues des activités anthropiques qui se retrouvent régulièrement dans l'environnement, leur détection rapide, la détermination de leur toxicité ainsi qu'une prévention de leur impact potentiel sont nécessaires pour assurer la protection des écosystèmes. Pour répondre à ces besoins, il est possible de s'appuyer sur deux types de méthodes: **l'analyse chimique des contaminants et les méthodes biologiques d'évaluation de leur potentiel toxique (bioessais).**

Aucune méthode analytique ne permet de détecter ni de quantifier l'ensemble des contaminants présents dans un échantillon de par la sélectivité des méthodes employées et compte tenu de la diversité des contaminants et sans compter les produits de dégradation et de transformation et les contaminants non répertoriés. En outre, les techniques analytiques ne permettent pas d'évaluer les effets de la présence des contaminants sur les organismes vivants ou l'état de santé des écosystèmes considérés. L'approche biologique semble être un outil complémentaire de l'approche chimique dans l'étude de la biodisponibilité des contaminants dans l'environnement. Elle intègre la variation des effets écotoxicologiques dépendant de la forme chimique des contaminants étudiés, les possibles interactions entre eux (effets additifs, synergiques ou antagonistes) et avec les facteurs biotiques et/ou abiotiques du milieu (phénomènes d'adsorption/désorption par exemple).

II-1 Approche Chimique

II-1-1 Méthodes d'analyses des pesticides

Le suivi des pesticides au niveau de l'environnement est complexe: d'une part, il fait appel à des techniques d'analyses spécifiques et coûteuses (présence à l'état de traces), d'autre part, il existe une grande diversité de matières actives, nécessitant des capacités analytiques très différentes. Certaines matières actives sont très difficiles à analyser car elles possèdent des caractéristiques physico-chimiques qui rendent leur extraction ou leur détection difficile. Le problème devient encore plus complexe si l'on s'intéresse à l'analyse des produits de dégradation, qui peuvent être plus toxiques que le pesticide lui-même (Belfroid *et al.*, 1998 ; Kolpin *et al.*, 1998). La matière active peut, en effet, être transformée en des composés encore plus toxiques (activation) ou moins toxiques (détoxication). De plus les méthodes d'analyses sont souvent spécifiques d'une famille de pesticides donnée si bien que des produits pourtant présents dans un échantillon peuvent ne pas être décelés si la méthode d'analyse n'est pas appropriée.

Une analyse multi-résidus ou une analyse de résidus plus spécifique (choix des solvants, conditions d'extractions et expérimentales spécifiques du composé recherché) peuvent être envisagées (Legrand, 1991 ; Kreuger, 1998). Les principales techniques d'analyses utilisées

sont la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) ou la Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (CLHP) le plus souvent couplées à un spectromètre de masse (MS) (Kammerbauer et Moncada, 1998 ; Hu *et al.*, 1999 ; Wolska *et al.*, 1999).

II-1-2 Méthodes d'analyses des métaux

Les concentrations totales en métaux peuvent être mesurées par Spectrométrie d'Absorption Atomique (SAA) au four graphite ou par émission de flamme, ICP-AES ou par ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry) qui présente l'avantage d'une analyse multi-éléments.

II-1-3 Introduction à la spéciation

L'étude de la toxicité des métaux à l'état de traces dans les eaux naturelles passe par la connaissance de leur spéciation car leur degré de nuisance n'est pas le même selon la forme chimique sous laquelle ils sont présents (Morel, 1983 ; Salomon et Forstner, 1984 ; Tessier et Turner, 1995). En effet, la concentration totale d'un métal dans les sols et les eaux ne permet pas d'en déduire sa mobilité ni de connaître ses risques potentiels de toxicité. Du point de vue toxicité, l'influence d'un métal sur l'environnement n'est pas la même selon qu'il se présente sous forme cationique hydratée, sous forme d'un complexe organo-métallique ou sous forme d'un complexe minéral. De ce fait, l'analyse de spéciation est à la base de la compréhension du devenir des métaux traces dans les eaux.

Le terme '**spéciation**' englobe la séparation, l'identification, la détermination ainsi que la distribution et la distinction des différentes formes physico-chimiques et différents états d'oxydoréduction d'un élément (Florence et Batley, 1980 ; Florence, 1982 a et b ; Kyle, 1987 ; Sigg *et al.*, 1992). Récemment l'IUPAC a établi les définitions suivantes dans le but de clarifier le terme 'spéciation' (Templeton *et al.*, 2000):

- Chimie élémentaire: l'espèce chimique est une forme spécifique d'un élément défini par sa composition isotopique, son état d'oxydation ou électronique et/ou sa structure complexe ou moléculaire,
- Chimie analytique: une analyse de spéciation permet d'identifier et/ou de quantifier une ou plusieurs espèces chimiques différentes présentes dans un échantillon,
- Spéciation d'un élément: distribution et répartition de ces différentes formes chimiques dans un système.

En **phase particulaire**, les métaux se présentent sous forme: d'espèces adsorbées plus ou moins fortement par une phase solide, d'élément intégré dans un réseau cristallin, d'élément métabolisé sous forme inorganique ou d'organométallique (Florence, 1982b cité par Lara-Cazenave, 1994 ; Tessier et Turner, 1995).

On distingue, en **phase dissoute**, le métal sous forme: d'ions libres hydratés, de complexes dissous labiles organiques ou inorganiques, de complexes dissous non labiles organiques ou inorganiques, d'organométalliques (Florence, 1982b cité par Lara-Cazenave, 1994 ; Tessier et Turner, 1995).

Ainsi dans le cas du cuivre, la forme organique est peu toxique car les complexes formés sont assez stables alors que les sels minéraux sont beaucoup plus nocifs (Hart, 1981) sans négliger la toxicité des complexes liposolubles capables de diffuser passivement à travers la membrane biologique (Phinney et Bruland, 1994, 1997a et b, Croot *et al.*, 1999). Cependant, pour la majorité des métaux lourds (en particulier le Cd, Cu, Zn et Pb), c'est la forme ionique hydratée qui semble la plus préjudiciable pour les organismes vivants même si le plomb, le zinc et le cadmium sont susceptibles de former des complexes lipophiles (Phinney et Bruland, 1994, 1997b).

Une grande partie des métaux initialement dissous dans une phase aqueuse peut se fixer sur une phase solide (sédiments ou colloïdes) selon cinq mécanismes principaux: **l'adsorption et l'échange d'ions**, la **précipitation ou la co-précipitation** à la surface du solide, **l'absorption** et la **complexation** (Flores-Rodriguez, 1992). Cependant, lors de modification des conditions physico-chimiques du milieu, les métaux ainsi fixés peuvent être mobilisés (Gibbs, 1973). Les molécules organiques présentes dans les systèmes aquatiques ont donc une importance primordiale de par leurs possibilités complexantes vis-à-vis des métaux.

II-1-3-1 Adsorption, Absorption et Échange d'ions

L'adsorption est une accumulation de matière à l'interface phase solide - phase aqueuse. C'est un processus significatif dans la baisse du cuivre dissous dans les eaux superficielles avec l'incorporation finale aux sédiments. Selon les énergies de liaisons mises en jeu, on distingue l'adsorption physique (attraction électrostatique entre soluté et surface polarisée) et l'adsorption chimique (établissement d'une liaison chimique).

L'absorption traduit, quant à elle, l'incorporation par diffusion du soluté à l'intérieur de la phase solide.

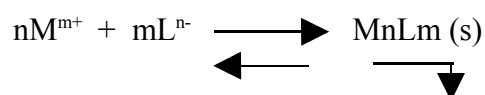
Le mécanisme d'échange d'ions est représenté par l'équation suivante:



avec R: -Si, -Al dans les argiles, -Fe dans les hydroxydes de fer, -C dans les groupes carboxyliques et phénoliques de la matière organique.

II-1-3-2 Précipitation et co-précipitation avec les hydroxydes de fer et les oxydes de manganèse

Dans le milieu naturel les métaux lourds M^{m+} peuvent précipiter sous formes d'hydroxydes, de sulfures ou de carbonates selon l'équation:



Chaque équilibre est caractérisé par sa constante de solubilité : $K_s = [\text{M}^{m+}]^n [\text{L}^{n-}]^m$

Les métaux lourds, comme le cuivre par exemple, peuvent catalyser l'oxydation du fer et du manganèse influençant de ce fait la formation d'hydroxydes de fer et d'oxydes de manganèse (Stumm et Lee, 1961). Des diagrammes de solubilité peuvent ainsi être établis (Stumm et Morgan, 1996), ils permettent de prévoir, pour une concentration donnée en métal, sa solubilité en fonction du pH et de déterminer les espèces dominantes à l'équilibre.

II-1-3-3 Complexation

La formation de complexes contribue largement à l'établissement des équilibres dans l'environnement. Dans les eaux naturelles, les principaux complexants regroupent les ions hydroxylys (OH⁻) et carbonates (CO₃²⁻) et la matière organique naturelle. Les complexes dissous inorganiques du cuivre, les plus fréquemment rencontrés dans le milieu naturel, incluent les produits d'hydrolyse du cuivre (CuOH⁺, Cu(OH)₂, Cu₂(OH)₂²⁺) et les complexes carbonatés (CuCO₃, Cu(CO₃)₂²⁻, CuHCO₃⁺) (Corralès, 1987).

II-1-3-4 Mobilisation des métaux à partir des sédiments

La mobilisation des métaux associés à la matière en suspension et/ou aux sédiments est un risque pour les écosystèmes aquatiques. Elle est basée sur les réactions d'adsorption/désorption, de précipitation/dissolution et d'oxydation/réduction qui contrôlent le devenir des éléments traces métalliques. Cette remobilisation des métaux peut être le résultat de changements physico-chimiques du milieu aqueux (Flores-Rodriguez, 1992):

- Augmentation de la force ionique: Van der Weiden *et al.* (1977) concluent que la désorption des métaux diminue en fonction du rayon ionique selon l'ordre suivant:
Cd > Zn > Mn > Ni > Co > Cu > Cr (Fe et Pb n'étant pas mobilisés).
- Modifications des conditions redox: en l'absence d'oxygène, le fer et le manganèse jouent le rôle d'accepteurs d'électrons. Cette réaction s'accompagne d'un relargage des métaux lourds incorporés ou adsorbés dans les hydroxydes de fer et les oxydes de manganèse.
- Diminution du pH: elle permet la dissolution des carbonates et des hydroxydes et la désorption de métaux de par la compétition avec les ions H⁺.

II-1-3-5 Interaction des éléments traces métalliques avec la matière organique naturelle

L'affinité des métaux lourds pour la matière organique et pour les produits de sa dégradation possédant des fonctions carboxyliques voire phénoliques est de grande importance dans le comportement des métaux toxiques en milieu aqueux. Par exemple, la matière organique dissoute est capable de:

- Complexer les métaux et d'augmenter leur solubilité.
- Modifier la distribution des métaux entre les formes oxydées et réduites.
- Modifier la biodisponibilité des métaux lourds pour les organismes aquatiques et de diminuer leur toxicité.
- Modifier la capacité d'adsorption des métaux sur la matière en suspension ou sur les sédiments (Singer, 1977).

Les espèces organiques les plus courantes qui constituent des complexants actifs dans les milieux naturels regroupent les **acides humiques, fulviques et aminés** ainsi que les **lipides, glucides** (Buffle et Mallevalle, 1974) et les **exsudats des organismes vivants** (Van der Berg, 1979 ; Moffet, 1997). Le rôle des biopolymères (polysaccharides) vis à vis des métaux dans les eaux naturelles a été évoqué et ne semble pas négligeable malgré leur dégradation rapide (Hart, 1981). Les substances humiques sont les produits les plus importants de la matière organique des eaux naturelles (Kim *et al.*, 1999 ; Ma *et al.*, 1999). De par leur origine variée (dégradations biologique et chimique des végétaux et des résidus animaux), elles possèdent une composition variable (humines, acides humiques, acides fulviques). Il est admis que les substances humiques sont les principales responsables du transport des métaux dans l'environnement (Fish et Morel, 1985).

On considère, dans les modèles de calcul de spéciation, que dans les eaux naturelles, les substances organiques présentes s'apparentent essentiellement à de la matière humique avec une majorité d'acides fulviques et moins de 10% d'acides humiques (Reuters et Perdue, 1977 ; Hart, 1981 ; Neubecker et Allen, 1983).

II-1-3-6 Capacité de complexation (CC) et constante de stabilité conditionnelle (K)

La **capacité de complexation (CC)** reflète le taux d'agents complexants - substances organiques et inorganiques, colloïdes inclus - présents dans les échantillons étudiés. Elle indique directement la quantité de ligands susceptibles de fixer des ions métalliques en formant des complexes stables.

Les mesures de la capacité de complexation et de la **constante de stabilité conditionnelle associée** ($K = [ML] / [M] [L]$) impliquent la titration des ligands présents dans l'échantillon par ajouts d'ions métalliques. La détermination de la capacité complexante et l'analyse de la spéciation des eaux naturelles peuvent être atteintes par une variété de techniques analytiques (Hart, 1981) incluant les méthodes électrochimiques potentiométriques (Cabaniss et Shuman, 1986) ou voltampérométriques (Tuschall et Brezonick, 1981 ; Valenta, 1983 ; Florence, 1986 ; Pardo *et al.*, 1994) et les méthodes non électrochimiques regroupant l'échange d'ions (Figura et McDuffie, 1979 ; Morrison et Florence, 1989), la dialyse (Hart et Davies, 1981), les bioessais (Morrison et Florence, 1989).

II-1-4 Méthodes expérimentales « d'évaluation » de la spéciation des métaux traces

La spéciation peut être atteinte par une variété de techniques analytiques incluant les **méthodes électrochimiques** et les méthodes **non électrochimiques** regroupant l'échange d'ions, la dialyse, les résines échangeuses d'ions, l'ultracentrifugation, l'extraction par solvant et la modélisation informatique (Neubecker et Allen, 1983 ; Tiwangye, 1995). Actuellement se développent des techniques couplant des méthodes séparatives et des détecteurs spécifiques (Das *et al.*, 2001).

II-1-4-1 Approche non électrochimique

Elle est basée sur la séparation physique des différentes espèces métalliques et inclut les méthodes suivantes.

II-1-4-1-1 Séparation par la taille

Les constituants chimiques dans les eaux naturelles sont souvent différenciés en phase dissoute et phase particulaire. La distinction de chacune des phases n'existe pourtant pas de façon absolue bien que la plupart des chercheurs accepte de considérer comme dissous les métaux ou fraction de métaux qui traversent une membrane filtrante de 0,45 µm. Cependant, des particules de diamètre inférieur peuvent passer au travers de pores de cette dimension, elles représentent la phase colloïdale. Le choix du seuil de coupure dissous/particulaire reste arbitraire et dépend plus des possibilités techniques de séparation que d'une réalité physique. Actuellement, les techniques d'ultracentrifugation séquentielle (Eyrolle et Benaïm, 1999 ; ran *et al.*, 2000) et à flux tangentiel (Guéguen et Dominik, 2003) permettent de différencier différentes classes de colloïdes en fonction de leur poids moléculaire exprimé en Dalton (Da). Le fractionnement par la taille peut apporter des renseignements intéressants, la fraction biodisponible des métaux étant généralement associée aux particules les plus fines (Muller, 1996).

II-1-4-1-2 Filtration sur gel / Chromatographie de Filtration sur Gel

Elle permet de séparer les composés chimiques en fonction de leur poids moléculaire après passage sur une phase solide constituée de billes de gel poreuses et élution par ordre de poids moléculaire décroissants. Cette technique permet de séparer aisément le métal libre des complexes organiques de fort poids moléculaire.

II-1-4-1-3 Dialyse

Cette approche propose d'utiliser des membranes synthétiques de porosité connue et de mesurer les espèces métalliques qui peuvent la traverser de façon à modéliser ce qui se produit au niveau d'une membrane biologique. La plupart des membranes testées sont perméables aux cations hydratés et aux complexes dissous inorganiques simples par contre la majorité des complexes métalliques avec la matière organique naturelle est non dialysable (Apte et Batley, 1995). Une alternative consiste à utiliser des films de lipides qui permettent d'évaluer la diffusion des espèces organométalliques. Par contre, elle ne permet pas d'accéder à la mesure des métaux transportés par les protéines, médiateurs importants pour le transport à travers les membranes cellulaires (Flores-Rodriguez, 1992).

II-1-4-1-4 Ultracentrifugation

Cette technique permet comme la dialyse de séparer les complexes organiques des cations métalliques libres. Elle présente l'avantage d'être plus rapide que la dialyse. Néanmoins, les risques de modifications des équilibres sont plus importants de par le mode de transfert qui crée des gradients de concentration au sein de la solution (Giannisis, 1986).

II-1-4-1-5 Échange d'ions et principales résines complexantes

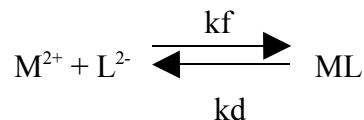
L'utilisation de résines échangeuses d'ions ou résines chélatantes fournit une méthode alternative pour la détermination de la fraction labile des métaux toxiques. Elles permettent d'estimer la labilité des complexes métalliques naturels (Florence *et al.*, 1983) et de

déterminer empiriquement l'affinité des ligands pour les métaux (Vasconcelos et Gomes, 1997). Une résine échangeuse d'ions est formée d'un réseau macromoléculaire tridimensionnel constitué généralement par un copolymère de styrène et de divinylbenzène. Des groupements fonctionnels ionisés ou ionisables fixés sur ce réseau permettent de classer les résines en échangeurs de cations ou d'anions.

Par exemple, la résine Chelex qui possède des groupes iminoacétates (-N-(COOH)₂) est très sensible aux métaux, cette spécificité permet de différencier les fractions labiles et non labiles des éléments traces par une combinaison de facteurs cinétiques et une exclusion par la taille (Florence et Batley, 1977). Utilisée en colonne ou en pot « batch », cette méthode a démontré son utilité pour la quantification des métaux associés aux colloïdes non labiles pendant la durée de l'expérimentation (Figura et Mac Duffie, 1979 et 1980). Apte et Batley (1995) soulignent que la fraction labile du cuivre déterminée par une résine à groupements thiol (colonne ALSA -ALuminium hydroxide-coated Sulfonic Acid) est en corrélation avec les mesures de toxicité effectuées par bioessais sur *Nitzschia closterium* en présence de ligands naturels tels que les acides fulviques et humiques. Cependant, le temps de contact, la quantité de résine utilisée et la cinétique de dissociation des complexes naturels présents peuvent engendrer une surestimation de la fraction labile des métaux traces par cette technique et par conséquent une sur-évaluation des effets sur les organismes aquatiques (Florence *et al.*, 1983). Les résines hydrophobes comme les cartouches C18-Sep-Pak et Amberlite®XAD sont généralement utilisées pour leur capacité de fixation des complexes organiques métalliques dans les eaux naturelles mais elles s'avèrent peu spécifiques et leur utilisation n'est pas recommandée dans les études de spéciation et de biodisponibilité (Apte et Batley, 1995).

II-1-4-2 Approche électrochimique

Elle englobe des méthodes qualitatives et quantitatives basées sur les propriétés électriques de l'analyte en solution (Tiwangye, 1995). Elles permettent de différencier les espèces (Mota et Correia Dos Santos, 1995): labiles, modérément labiles, peu labiles, stables ou inertes obtenues par différence entre la teneur en métal total et les espèces labiles. La **labilité** traduit la facilité avec laquelle un complexe va se dissocier lorsqu'il est soumis à une perturbation (Corralès, 1987 ; Lara-Cazenave, 1994). Le terme labilité est basé sur l'hypothèse d'équilibre entre les métaux libres hydratés et les complexes.



Avec M²⁺: cation métallique ; L: ligand ; ML: complexe métallique et kd et kf: respectivement constantes de dissociation et de formation.

La labilité, d'un point de vue expérimental, est une compétition entre la vitesse de dissociation d'un complexe et les coefficients de diffusion du métal et du complexe. Elle est également fonction de la durée de la perturbation imposée et de la vitesse à laquelle la mesure est effectuée (Varney *et al.*, 1983 ; Rodriguez Presa *et al.*, 1998). Lors d'une analyse électrochimique, si un cation métallique est en présence d'un de ses complexes dissous quasi-

labile, la réponse mesurée tiendra compte de la forme ionique ainsi que de la fraction labile du complexe (Davison, 1978). Ces deux fractions constituant les espèces électrochimiquement labiles en opposition aux espèces inertes non dissociées.

La labilité observée dépend de la technique électrochimique qui est utilisée. Elle est fonction de plusieurs facteurs incluant les propriétés cinétiques et thermodynamiques, le pouvoir de complexation du métal étudié, son affinité à se fixer sur les particules présentes, les propriétés intrinsèques des ligands présents et les conditions expérimentales (pH, potentiel de déposition) (Aualiitia et Pickering, 1986).

Parmi les méthodes qui se rapportent à l'électrochimie, on distingue celles qui sont basées sur des mesures de potentiel de membrane (Électrode Ionique Spécifique ISE) de celles basées sur l'interprétation des courbes intensité de courant - différence de potentiel obtenue pour une concentration donnée (voltampérométrie) (Neubecker et Allen, 1983).

I-1-4-2-1 Méthode potentiométrique (ISE)

L'électrode spécifique permet une mesure directe de l'activité de l'ion libre hydraté M^{2+} et la détermination des constantes de stabilité ou des capacités de complexation (Birraux *et al.*, 1977 ; Bresnahan *et al.*, 1978 ; Florence et Batley, 1980). C'est une technique de mesure propre à une espèce donnée. Les ions métalliques ne sont impliqués dans aucune réaction d'oxydo-réduction (Neubecker et Allen, 1983). On mesure la différence de potentiel qui existe de part et d'autre d'une membrane perméable à l'ion étudié. Cette différence de potentiel est mesurée par rapport à une électrode de référence de potentiel fixe quelque soit la solution dans laquelle elle plonge. C'est la seule méthode analytique qui permet de mesurer la concentration en métal libre sans affecter l'équilibre de la solution (Florence, 1982b). Son principal désavantage réside dans ses limites de détection assez éloignées des faibles concentrations rencontrées dans les eaux naturelles. L'applicabilité de cette méthode est restreinte par le manque de sélectivité de l'électrode. En effet, elle n'est pas exempte d'interférences souvent nombreuses avec d'autres ions, source importante d'erreurs aboutissant en général à une surestimation de la concentration de l'ion étudié. D'autre part, divers processus de contamination, comme par exemple une adsorption et/ou une solubilisation sur la membrane même, tendent à diminuer la validité de la mesure.

II-1-4-2-2 Méthodes voltampérométriques

Elles font partie des méthodes directes qui permettent d'accéder à de faibles concentrations de l'élément étudié (Laxen et Harrison, 1981) en répondant aux exigences de l'analyse des traces. Elles permettent de déterminer la concentration en ions libres donc d'évaluer la fraction biodisponible, en présence de différents ligands. Elles permettent de différencier les valences pouvant être prises par l'élément et de déterminer les différents paramètres physico-chimiques du milieu (coefficient de diffusion, constante de stabilité et capacité de complexation), si toutefois le composé à doser est directement ou indirectement électroactif (Neubecker et Allen, 1983).

Les différents modes d'utilisation des électrodes et modes d'impulsion des méthodes voltampérométriques sont présentés en annexe 2-I. Nous développerons, dans ce qui suit, le principe de la méthode par redissolution anodique, utilisée dans le cadre de ce travail.

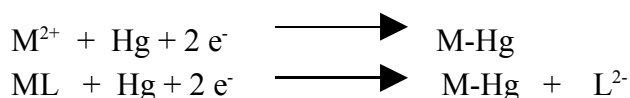
II-1-5 Principe de la redissolution anodique (Stripping Voltammetry)

La méthode par redissolution anodique permet de procéder, préalablement à la détermination voltampérométrique, à une accumulation de substances électroactives dans l'électrode indicatrice. Elle s'effectue en trois étapes dont deux principales:

[1]- ETAPE DE REDUCTION ET DE RECONCENTRATION

Par une **préélectrolyse** à potentiel fixe suffisamment faible pour réduire électrochimiquement les ions métalliques en solution (libres ou complexés) en métal qui se dissout dans le mercure pour donner des **amalgames M-Hg**.

On réalise, ainsi, l'**accumulation** d'une fraction de l'élément initialement dilué dans la solution électrolytique et qui devient concentré, sous forme d'amalgame (dans la mesure où le métal déposé est soluble dans le mercure), dans l'électrode-support.



Afin d'augmenter l'apport de cations métalliques vers l'électrode, on assure une agitation mécanique de la solution. Durant cette étape le transfert de masse est essentiellement assuré par diffusion et par convection (agitation mécanique).

Cette préélectrolyse sera suivie d'une étape d'équilibrage (seconde étape) durant laquelle on interrompt l'agitation. Le transfert de masse passe peu à peu d'un régime de convection à un régime de diffusion pure. Le potentiel est maintenu constant et la réduction du métal se poursuit pendant que la concentration dans la goutte s'uniformise.

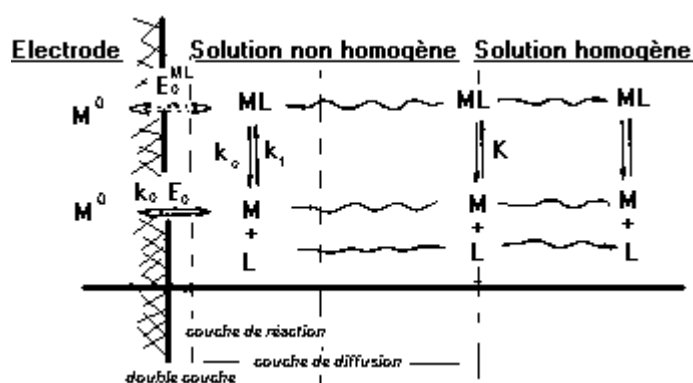


Figure I-2: Schéma de la fixation de l'ion libre et des complexes labiles sur l'électrode à goutte de mercure (D'après Buffle, 1988).

Cette figure (I-2) illustre les phénomènes de diffusion de l'ion libre et des complexes dissous à la surface de l'électrode suite aux phénomènes de dissociation des complexes dans la couche de diffusion de l'électrode. Les phénomènes d'adsorption à l'électrode seront diminués par un renouvellement des gouttes de mercure entre chaque mesure (mode HMDE).

[2]- ETAPE DE REDISSOLUTION

Enfin, on procède à un **balayage du potentiel** de l'électrode indicatrice vers les valeurs positives pour provoquer la **réoxydation du métal amalgamé** et faire apparaître par voltampérométrie anodique un signal de courant correspondant à l'élément métallique pré-concentré.



Lorsque le potentiel de l'électrode de travail atteint une valeur telle que l'espèce présente dans la solution étudiée est oxydée, l'intensité croît brusquement. Quand on représente graphiquement le courant résultant (nA) en fonction du voltage appliqué (mV) on obtient une courbe intensité-potentiel ($i = f(E)$) en forme de pic dont la hauteur, par rapport à l'axe du courant, est directement proportionnelle à la concentration de l'espèce en solution. La hauteur maximale du pic correspond à un voltage (Potentiel de pic: E_p) qui est caractéristique du composé dans un milieu donné (E_p proche du $E_{1/2}$ (potentiel de demi-vague) de la polarographie classique).

Cette technique permet donc une **analyse** à la fois **qualitative et quantitative** des éléments dosés. Des concentrations très faibles peuvent être déterminées en augmentant le temps de préélectrolyse. Les limites de détection sont de l'ordre de 10^{-9} - 10^{-10} M, ce qui fait de cette méthode d'analyse de traces l'une des plus performantes.

En résumé, les différentes méthodes d'analyses de spéciation évoquées peuvent être utilisées seules ou en association. Le tableau (I-8) dresse le bilan des principales techniques d'analyse de spéciation qui permettent d'effectuer une classification des métaux en fonction de la labilité et de la stabilité des complexes présents dans le milieu.

L'applicabilité de chaque schéma est liée à la nature de l'eau étudiée, en effet dans les eaux douces, il existe des ligands organiques forts tels que les substances humiques (acides fulviques et humiques) qui peuvent perturber les analyses effectuées par des phénomènes d'adsorption, fonction du pH, du degré de complexation, de la force ionique et de la présence des ions majeurs.

Tableau I-8: Principaux schémas d'analyses de spéciation de la phase dissoute

Références	Méthodes analytiques	Fractions
Florence et Batley (1977)	<ul style="list-style-type: none"> • polarographie • rétention sur résine • non retenue sur résine et libérée par irradiation UV • non retenue sur résine et non libérée par irradiation UV 	Libre Labile Non labile organique Non labile inorganique
Figura et Mc Duffie (1979)	<ul style="list-style-type: none"> • polarographie • rétention sur résine en colonne • rétention sur résine en pot • minéralisation 	Libre - très labile Moyennement labile Peu labile Inerte
Lecomte (1981)	<ul style="list-style-type: none"> • polarographie • polarographie avec HNO₃ 1% • GFAAS* en HNO₃ 1% • rétention sur résine en colonne IRA 400** - HNO₃ 1% - GFAAS • rétention sur résine en colonne IRN 77*** - HNO₃ 1% - GFAAS 	Libre - très labile Libre - très labile - facilement libérable Totale Non anionique Non cationique
Florence (1983)	<ul style="list-style-type: none"> • polarographie • rétention sur résine Chelex 100 • extraction n-hexane/n-butanol 	Libre - très labile Moyennement labile Liposoluble
Morrison et Rewitt (1987)	<ul style="list-style-type: none"> • polarographie • rétention sur résine en pot • minéralisation totale 	Libre - très labile Libre - très labile - moyennement labile Inerte - association aux colloïdes
Christensen et Lun (1989)	Rétention sur résine Chelex 100 <ul style="list-style-type: none"> • rétention en colonne • rétention en pot 20h • rétention en pot 48h • non retenue 	Labile Moyennement labile Légèrement labile Inerte
Lara-Cazenave (1994)	<ul style="list-style-type: none"> • polarographie • rétention sur résine Chelex 100 • polarographie après minéralisation à sec (mélange HNO₃/H₂O₂) 	Labile Moyennement labile Inerte – association avec les colloïdes
Tubbing (1994)	<ul style="list-style-type: none"> • polarographie • rétention sur résine Chelex 1000 (colonne) • irradiation UV / acide nitrique 	Labile électrochimiquement Labile en colonne Non labile Organique
Procopio <i>et al.</i> (1997)	Amberlite XAD8 <ul style="list-style-type: none"> • Rétention < 0,024s • Rétention comprise entre 0,024 et 3s • Rétention incomplète (>3s) • Non retenue 	Labile Quasi-labile Légèrement labile Inerte

*GFAAS: Spectrométrie d'absorption atomique au four graphite **IRA 400: Résine échangeuse d'anions, forte

***IRN 77: Résine échangeuse de cations, forte.

II-2 Approche Biologique

L'approche biologique est complémentaire de l'approche chimique dans l'étude de la biodisponibilité des contaminants dans l'environnement. Elle intègre la variation des effets écotoxicologiques, dépendante de la forme chimique des contaminants étudiés et des interactions.

II-2-1 Évaluation de la biodisponibilité

La **biodisponibilité** se définit comme le degré avec lequel un contaminant est assimilé par un organisme (O'Donnel *et al.*, 1985 ; Newman et Jagoe, 1994). Selon Thornton (1999), est biodisponible la fraction assimilable par un organisme donné dans un milieu défini.

La biodisponibilité est régie par trois processus (Campbell, 1995 ; Hudson, 1998): la **diffusion** depuis la solution vers la surface de la membrane, la **fixation** sur les sites de transport et l'**assimilation** dans l'organisme via le passage de la membrane lipidique. Elle est dépendante de la **spéciation** ainsi que de tous facteurs et propriétés physico-chimiques qui gouvernent la spéciation et par conséquent de la mobilité mais aussi de l'espèce considérée.

II-2-1-1 Mécanismes d'assimilation des métaux dans les organismes – Modèle de l'ion libre (Free Ion Model) et ses limites d'application

On distingue trois voies principales de transport des métaux à travers les membranes biologiques: la **diffusion passive**, le **transport facilité** par les composants de la membrane ou par les ligands extracellulaires et le **transport actif** gouverné par le gradient de potentiel à travers la membrane (Sunda, 1989 ; Simkiss et Taylor, 1995).

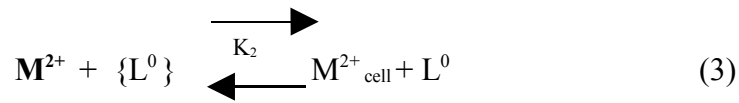
De nombreux résultats appuient l'hypothèse selon laquelle la réponse biologique causée par un métal dissous est fonction de la concentration de l'ion métallique libre, M^{2+} . Le modèle de biodisponibilité admis pour les métaux est celui de l'ion libre (FIAM - **Free Ion Activity Model**) (Figure I-1). Ce modèle prend uniquement en compte les espèces réactives à la surface des cellules (ions métalliques hydratés et complexes labiles) pour évaluer la biodisponibilité des métaux (Campbell, 1995). Il est basé sur l'équation d'équilibre suivante:



$$\text{Avec } K_1 = [ML] / ([M^{2+}][L]) \quad (2)$$

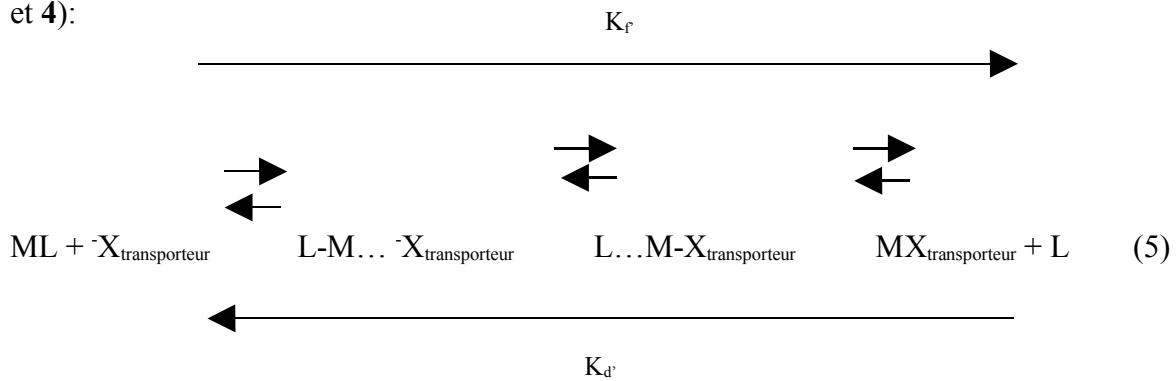
Le transport des ions libres est facilité par les **pompes transmembranaires** et les **canaux ioniques intégrés dans la membrane** ($X_{\text{transporteur}}$), il peut s'effectuer par diffusion passive ou transport facilité (Figures I-3 et 4).

Il existe également des transporteurs (L^0 - **molécules liposolubles**) qui fixent les métaux sur la face externe de la membrane, diffusent au travers de celle-ci et transfèrent les métaux dans la solution située sur la face opposée par internalisation (Figure I-4).



$$\text{Avec } \mathbf{ML}^0 = K_2 \{\mathbf{L}^0\} [\mathbf{M}^{2+}] \quad (4)$$

Pour être intégré, un complexe métallique doit préalablement échanger un de ces ligands extracellulaires de coordination pour un site de fixation ou d'autre(s) ligand(s) de façon à former un complexe «transportable» et assimilable. Ce modèle est basé sur une réaction d'échange de ligands à la surface membranaire traduite par l'expression suivante (Figures I-3 et 4):



$$\text{Avec } \text{MX}_{\text{transporteur}} = K_3 [\text{X}_{\text{transporteur}}] [\text{ML}] / [\text{L}] \quad (6)$$

Si on intègre l'équation (2) dans (6) on obtient:

$$\text{MX}_{\text{transporteur}} = K_3 K_1 [\text{X}_{\text{transporteur}}] [\mathbf{M}^{2+}] \quad (7)$$

Le schéma de Campbell *et al.* (2002) illustre la réaction d'échange de ligands qui a lieu à la surface membranaire pour faciliter l'internalisation des métaux :

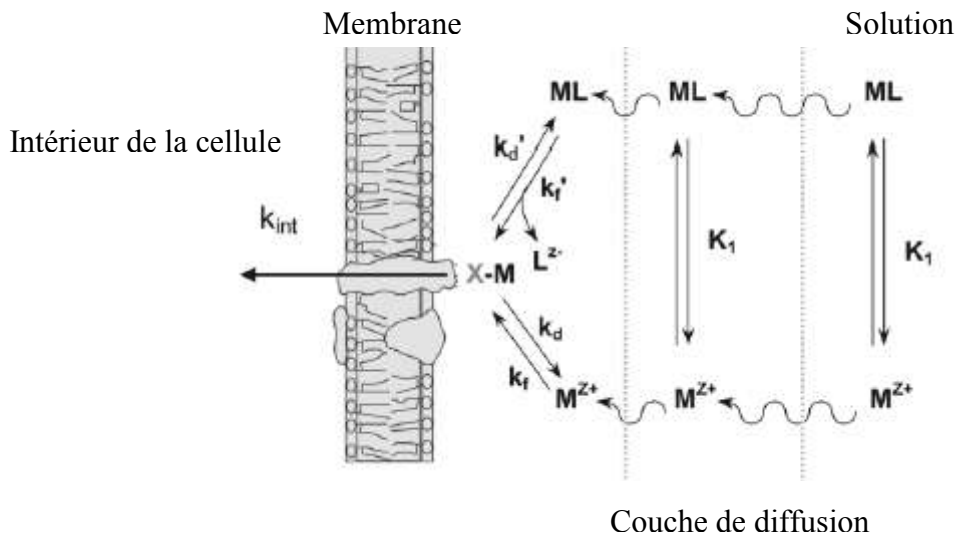


Figure I-3: Modèle conceptuel de l'interaction métal – membrane biologique. (Adapté de Campbell *et al.*, 2002).

M^{z+} : ion libre, ML : complexe métallique en solution, K_f : constante d'équilibre de la formation du complexe ML , X : transporteur transmembranaire, $X-M$: complexe métallique à la surface membranaire, k_d et k_f respectivement constantes de dissociation et de formation des complexes métalliques et K_{int} : constante d'internalisation du métal à travers la membrane biologique.

A l'équilibre, l'assimilation des métaux est fonction de la concentration en ions libres $[M^{z+}]$ mais également de la constante de complexation à l'équilibre K_f et des constantes de formation/dissociation du complexe $MX_{transporteur}$ ainsi que des cinétiques de coordination qui peuvent être influencées par la spéciation.

Néanmoins, les groupements fonctionnels de fixation des métaux présents aussi bien sur les protéines de transport membranaire et les enzymes intracellulaires ne sont pas entièrement sélectives à un métal unique (Sunda, 1989). Certains ligands organiques biologiques peuvent fixer d'autres espèces cationiques qui possèdent des radicaux ioniques ou une géométrie de coordination similaires ou proches de ceux de certains métaux essentiels. Ces phénomènes de **compétition** (Figure I-1) sont régis par les constantes d'affinité respectives des éléments impliqués, leurs concentrations respectives en ions libres et les cinétiques de réaction. Par exemple, un phénomène de compétition avec les ions H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ peut intervenir dans les mécanismes d'assimilation des métaux par les organismes aquatiques (Playle, 1998). Cette approche a été développée pour le poisson avec le modèle **Gill Surface Interaction Model** (GSIM - Pagenkopf, 1983) et généralisée sous le nom de **Biotic Ligand Model** (BLM - Di Toro *et al.*, 2001). Elle constitue une amélioration du modèle de l'ion libre, mais ne prend pas en compte l'influence du pH et de la dureté sur la biodisponibilité des métaux.

II-2-1-2 Exceptions au modèle de l'ion libre

Bien que peu de métaux soient suffisamment hydrophiles, une grande part de complexes métalliques est suffisamment soluble dans les lipides pour être capable de diffuser rapidement par absorption métallique passive à travers la membrane lipidique (Figure I-4). Ces complexes lipophiles constituent une exception au modèle de l'ion libre (Campbell, 1995). De récentes études ont démontré que des complexes lipophiles et/ou des chélateurs organiques de certains métaux divalents pouvaient également diffuser à travers les membranes cellulaires en court-circuitant de ce fait les barrières cellulaires à l'assimilation de métaux toxiques. C'est le cas de certains complexes métalliques associés à la 8-hydroxyquinoline, aux oxines et aux dithiocarbamates (Phinney et Bruland, 1994 ; Phinney et Bruland, 1997 a et b ; Croot *et al.*, 1999).

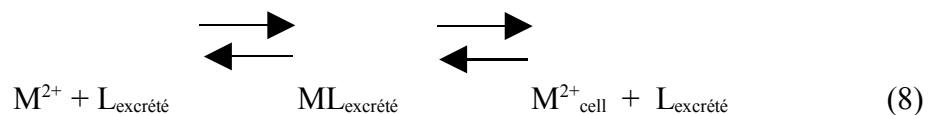
II-2-1-3 Mécanismes de défense vis à vis des concentrations métalliques

Les algues ne sont pas des acteurs passifs dans le processus de contamination. Elles sont capables de mettre en œuvre un certain nombre de techniques de régulation des flux (mécanismes de défense et de détoxification) qui vont augmenter ou diminuer le prélèvement des métaux en fonction de leur besoin propre via la modification de leur spéciation. Ces mécanismes de régulation leur permettent de tolérer de fortes concentrations métalliques présentes dans l'environnement en maintenant une concentration intracellulaire en métaux

optimale pour leur croissance et leur métabolisme. Ils se traduisent par la synthèse de ligands extracellulaires (**exsudats**) et intracellulaires (**phytochélatines**) nécessaires à l'excrétion et/ou au stockage des métaux en excès (Ahner *et al.*, 1995b ; Knauer *et al.*, 1998 ; Cobbett, 2000 ; Pawlik-Skowronska, 2001 ; Vasconcelos *et al.*, 2002).

II-2-1-3-1 Synthèse d'exsudats

Les algues sont susceptibles de produire de la matière organique extracellulaire susceptible de complexer les métaux (groupements fonctionnels variés: carboxyl, thiol, amino, hydroxo et hydroxy-carboxyl) (Vasconcelos et Leal, 2001). Ces ligands naturels produits par l'algue jouent un rôle dans la diminution des effets toxiques potentiels des métaux lourds présents dans l'environnement par la diminution de la concentration en ions libres donc biodisponibles pour l'organisme. Cependant, les **complexes** formés peuvent aussi être **lipophiles** ce qui va faciliter leur pénétration dans le cytosol via un processus de diffusion passive. Hudson (1998) souligne également que les métaux complexés avec des ligands excrétés par les organismes vivants ($ML_{\text{excrété}}$) peuvent être directement prélevés. Néanmoins, il s'avère délicat de déterminer avec exactitude le comportement vis à vis de la membrane lipidique des complexes $ML_{\text{excrété}}$ formés, leur dissociation s'effectuant dans la couche de diffusion limite des organismes.



Dans l'hypothèse d'une concentration en $L_{\text{excrété}}$ très inférieure à celle de l'ion libre, ce mécanisme constitue une exception au modèle de l'ion libre dans la mesure où le transport des métaux n'est plus fonction de la concentration en ions libres mais de la concentration en ligands extracellulaires excrétés par les organismes (Figure I-4).

Le schéma suivant (Figure I-4) récapitule les principales voies de transport des métaux à travers les membranes biologiques en intégrant les exceptions au modèle de l'ion libre:

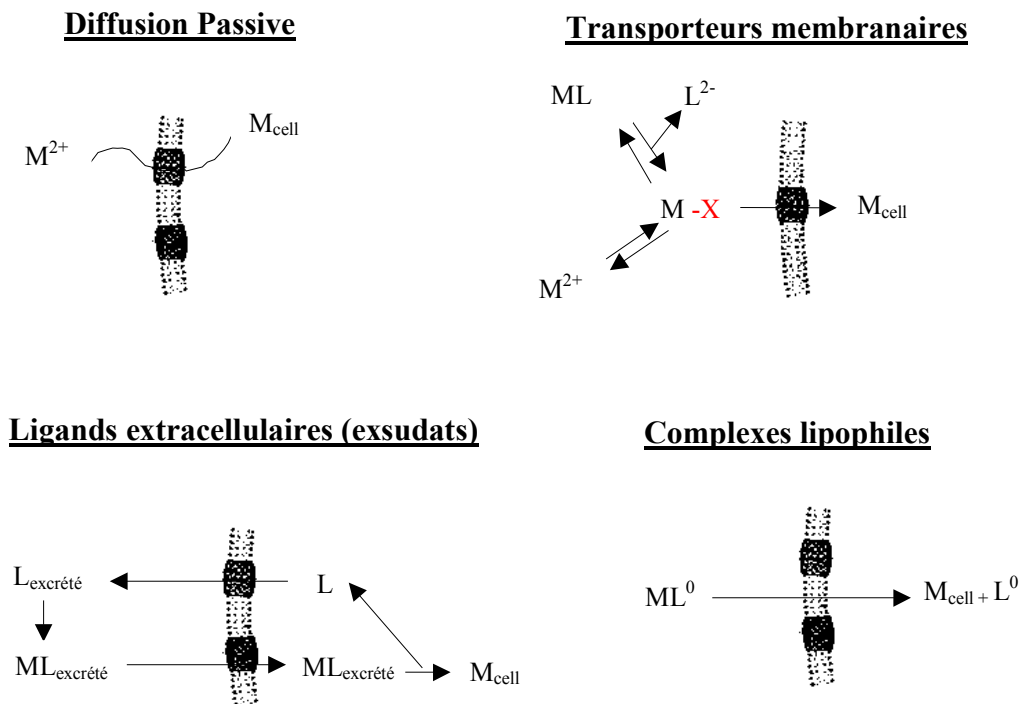


Figure I-4: Différents mécanismes de transport intracellulaire des métaux traces au niveau des membranes biologiques et exceptions au modèle de l'ion libre (Adapté de Hudson, 1998).

II-2-1-3-2 Synthèse de phytochélatines

Parmi les mécanismes de détoxification qui existent chez les algues, certains se traduisent par des processus de formation de **ligands intracellulaires** (acides organiques, amino-acides, polypeptides à groupements thiols: glutathione, phytochélatines) capables de réguler les concentrations métalliques. Dans les plantes, les **phytochélatines** (PC(s)) sont impliquées dans la réduction des sulfates et réduisent implicitement la toxicité métallique en séquestrant certains métaux (cadmium, cuivre, zinc) et en facilitant de ce fait leur transport du cytosol vers les vacuoles (Gekeler *et al.*, 1988). Elles possèdent une structure générale de type (γ -Glutamyl-Cystéine) $_n$ -Glycine avec n variant de 2 à 11 (Grill *et al.*, 1985) et peuvent chélater les métaux grâce à une association avec le groupement sulfuryl de la cystéine. La γ -glutamylcystéine synthase doit d'abord être activée pour cliver la molécule terminale (glycine) du glutathion (γ -Glu-Cys) $_n$ -Gly. Le produit obtenu (γ -glutamylcystéine) peut alors être fixé à l'acide aminé terminal d'un autre glutathion ($n=1$) par la γ -glutamylcystéine dipeptidyl transpeptidase et former ainsi un oligomère (la chaîne peut être prolongée de $n = 2$ à 11). Cette enzyme est activée par un excès métallique cellulaire (Gekeler *et al.*, 1988 ; Ahner *et al.*, 1995a ; Rijstenbil et Wijnholds, 1996). On retrouve également ces phytochélatines chez certains champignons et certaines algues (Ahner *et al.*, 1995b ; Cobbett, 2000 ; Pawlik-Skowroska, 2001). L'apparition d'un pool de phytochélatines peut être un excellent indicateur de pollution métallique. La quantité et la qualité de phytochélatines produites par les algues peut traduire un aspect important de la disponibilité et du transport des éléments métalliques (Pawlik-Skowroska, 2001) même si ces molécules sont mises en évidence en présence de très

faibles concentrations en métaux (homéostasie métallique décrite par Ahner *et al.*, 1995b). L'induction de la synthèse des phytochélatines chez les algues marines est, par exemple, plus importante avec respectivement le cadmium, le cuivre, le zinc, le plomb et le cobalt, l'argent n'ayant aucun effet (Ahner *et al.*, 1995b). Cependant, la synthèse des phytochélatines et leur polymérisation sont régulées, de diverses façons, par les différentes espèces phytoplanctoniques, elle n'est pas simplement fonction de la nature de l'excès métallique, ni proportionnelle à la quantité de métaux présents (stratégies alternatives de détoxification et gestion du stock de glutathion) (Ahner *et al.*, 1995 a et b). Les phytochélatines sont dosées suite à la séparation du matériel algal frais du milieu d'incubation ou du milieu naturel par filtration suivie d'une extraction dénaturant les protéines et les enzymes. L'analyse des phytochélatines s'effectue par CLHP couplée à un détecteur par fluorescence et en colonne de post-dérivation après ajout du réactif de Ellmann dans l'extrait (Rijstenbil et Wijnholds, 1996). L'identification de chacune des phytochélatines (PC1, PC2, PC3...) est basée sur une comparaison de leurs temps de rétention par rapport à ceux obtenus sur des thiols de référence: la cystéine, la γ -glutamyl-cystéine et un standard de phytochélatines purifiées provenant de *Silene vulgaris*.

La liaison des métaux avec les ligands inorganiques et organiques (matière organique naturelle, dissoute, colloïdale et particulaire) est un paramètre très important à considérer pour évaluer l'impact potentiel des métaux sur le biotope. Par exemple, le rôle des colloïdes dans la répartition des métaux traces dans les écosystèmes naturels est largement démontré (Benoit et Rozan, 1999 ; Eyrolle et Benaïm, 1999 ; Ran *et al.*, 2000 ; Guégeun et Dominik, 2003). Ils peuvent contribuer d'une façon significative à la bioaccumulation des métaux et de ce fait exercer un contrôle vis à vis de la toxicité des eaux en modifiant la spéciation des éléments métalliques donc leur mobilité et leur biodisponibilité pour les organismes aquatiques.

Bien que la connaissance des formes chimiques prises par les métaux soit importante pour appréhender leur éventuelle toxicité et leur biodisponibilité. Les tests écotoxicologiques font partie des outils biologiques complémentaires, dont on dispose pour étudier les activités toxiques des eaux et évaluer l'impact de substances sur l'environnement.

II-2-2 Les tests écotoxicologiques: généralités

Concrètement un test écotoxicologique est un essai expérimental déterminant l'effet d'un ou de plusieurs produits sur un groupe d'organismes sélectionnés, dans des conditions bien définies (Keddy *et al.*, 1994). Leur principe réside dans l'identification de la réponse d'un organisme vivant à une substance ou à un échantillon de l'environnement. Les tests les plus couramment utilisés s'effectuent en laboratoire sur une espèce connue en conditions contrôlées et couvrent les différents niveaux trophiques d'un écosystème aquatique (cellules, bactéries, algues, microcrustacés et poissons).

Parmi les biotests couramment utilisés citons le test de luminescence sur *Vibrio fischeri* (bactérie marine bioluminescente, test Microtox), le test d'inhibition de la croissance sur *Pseudokirchneriella subcapitata* (algue verte unicellulaire, anciennement *Selenastrum*

capricornutum) et le test d'immobilisation ou de reproduction sur *Daphnia magna Straus* (microcrustacé d'eau douce). Tous ces tests sont standardisés au niveau international (OCDE, ISO...), américain (EPA), canadien (Environnement Canada) et national (AFNOR). Ils sont faciles à conduire (par rapport à un petit écosystème artificiel reconstitué) et les effets faciles à mesurer. En revanche, leur représentativité pour l'environnement est discutable puisque l'effet sur des organismes de laboratoire est difficilement comparable aux effets sur les écosystèmes pris dans leur intégralité. Les bioessais sont complémentaires aux analyses chimiques et aux observations des effets *in situ* pour les milieux pollués. Ils sont choisis pour répondre à certaines contraintes:

- Cohérence entre les différents tests existants qui se traduit par l'utilisation de tests standardisés et validés afin de permettre la comparaison des résultats obtenus avec les données de la littérature,
- Sensibilité vis à vis des composés étudiés,
- Représentativité vis à vis des écosystèmes étudiés, prise en compte de différents types de paramètres d'effet,
- Faisabilité *in vitro*, précision et bonne reproductibilité, coût raisonnable.

II-2-2-1 Tests de toxicité aiguë et chronique

On définit deux types de toxicité: aiguë et chronique. **Les tests aigus** se déroulent pendant une durée très brève de la vie d'un organisme. Ils permettent d'évaluer l'effet immédiat du produit libéré dans le milieu. Ils sont avantageux du fait de leur faible coût et de leur rapidité. Cependant les concentrations utilisées pour produire un effet doivent être relativement élevées de par la faible durée des tests. Or la plupart des problèmes environnementaux sont liés à des concentrations résiduelles engendrant des effets à long terme qui ne peuvent être mis en évidence par ce type de test. **Les tests chroniques** se déroulent quant à eux pendant une durée relativement longue de la vie de l'organisme et les effets sont mesurés sur des paramètres généralement plus sensibles comme la reproduction par exemple sur la daphnie, les modifications du comportement, l'histologie. Ils permettent de se faire une idée des implications à long terme de la présence d'un ou de plusieurs polluants dans l'environnement.

II-2-2-2 Interprétation des tests, valeurs remarquables

L'utilisation des tests pour l'évaluation de l'impact d'un ou de plusieurs produits passe par la définition de valeurs remarquables déterminées sur la base de données fournies par le biotest utilisé. Elles sont issues de la corrélation qui existe entre la dose d'exposition (concentrations croissances du composé testé ou dilutions de l'échantillon naturel étudié) et l'effet toxique (inhibition de la croissance par exemple), représentée sous la forme d'une **courbe dose-réponse** (Figure I-5).

La **CE_x** ou **EC_x** (Concentration Effective/Efficace) correspond à la concentration en toxique qui engendre un effet de X% par rapport à la réponse des contrôles (milieu de culture standard sans effet). Classiquement, on détermine la **CE₅₀** qui correspond à la concentration qui engendre 50% d'effet. Dans le cadre de la protection de l'environnement, il paraissait plus judicieux de définir une valeur de « non effet » et/ou de « faible effet ». La **NOEC** (No Observed Effect Concentration) et la **LOEC** (Lowest Observed Effect Concentration) ont été proposées (Figure I-5). Elles se définissent comme respectivement la concentration maximale dont l'effet sur les organismes n'est pas différent de celui des contrôles et la concentration minimale pour laquelle un effet est observé. La détermination de ces valeurs s'effectue sur la base d'un test statistique des moyennes. Elles varient beaucoup d'un auteur à l'autre, de plus pour assurer leur fiabilité il faut un nombre important de réplicats (même expérience, même concentration) qu'il n'est pas souvent possible d'effectuer lors d'un test écotoxicologique (Laskowski, 1995). Toutes ces valeurs sont représentatives d'une espèce, des modes d'action et d'entrée des polluants dans l'organisme et du temps de contact.

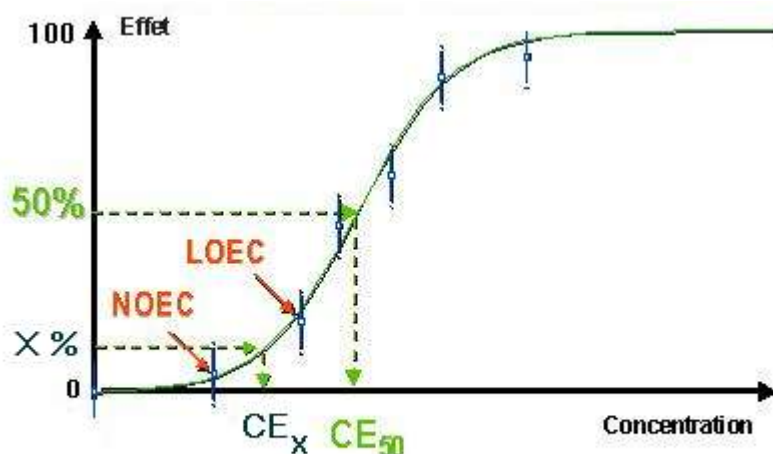


Figure I-5: Exemple d'une courbe dose-réponse (concentration-effet) et valeurs remarquables NOEC, LOEC, CE₅₀ (D'après Forbes et Forbes, 1997).

II-2-2-3 Choix de la cible biologique étudiée: les algues

Parmi les organismes pris en considération dans les biotests, les algues sont largement étudiées et acceptées en tant qu'outil d'évaluation du potentiel toxique (Couture *et al.*, 1985). Ceci est dû au fait que le phytoplancton est à la base (producteur primaire) du réseau trophique des milieux aquatiques. Il représente donc un maillon très important de l'équilibre du système qui doit être pris en considération lors de l'évaluation des risques pour l'environnement. Un effet quelconque ressenti sur les communautés algales peut avoir des répercussions directe ou indirecte sur l'ensemble des organismes des niveaux trophiques supérieurs avec pour conséquence un déséquilibre de l'écosystème aquatique pris dans son intégralité. Les algues semblent plus sensibles aux contaminations que les invertébrés et les poissons de par leur membrane cellulaire en contact direct avec le milieu d'exposition (Joubert, 1980 ; Walsh et Merrill, 1984). En comparaison avec les bactéries, les algues sont moins sujettes à des variations génétiques et leur bonne sensibilité, comparée à d'autres tests microbiologiques, a été démontrée (Joubert, 1980 ; Van Coillie *et al.*, 1981). La toxicité étant

fonction de la durée d'exposition, les tests de toxicité chronique semblent plus adaptés que les tests de toxicité aiguë lorsque l'on s'intéresse à des écosystèmes naturels. Les bioessais sur microorganismes (bactéries, champignons, levures, algues et protozoaires) semblent donc plus faciles à mettre en œuvre du fait de leur temps de génération plus courts (Bitton, 1983). Dans ce sens, une évolution logique a conduit à la miniaturisation des procédures (Wells *et al.*, 1997).

II-2-2-4 Mesure de la toxicité

La toxicité peut être estimée par la mesure de la densité algale, de la concentration en chlorophylle *a* ou de tout autre paramètre permettant d'estimer la densité cellulaire ou l'activité des algues. Les résultats de toxicité observée sont influencés par divers facteurs qui englobent les conditions opératoires (température, durée d'exposition, milieu de culture, paramètres d'effets considérés, espèces étudiées), la nature (eaux naturelles, effluents) et la composition de l'échantillon testé (présence de métaux, de composés organiques).

II-2-2-4-1 Durée d'exposition

Plus le temps d'incubation est long, plus divers facteurs peuvent affecter la réponse mesurée (par exemple: évolution et modification du pH, complexation des composés par les exsudats, adaptation des algues, photodégradation e/ou dégradation bactérienne de certains composés organiques).

II-2-2-4-2 Effets globaux

L'effet toxique d'un échantillon ou d'un polluant peut être évalué en mesurant l'inhibition du taux de croissance (diminution de la division cellulaire) ou la réduction de la biomasse algale totale après 24 à 96 heures d'exposition. Il est estimé en comparant les résultats obtenus dans le milieu de culture standard. Ce paramètre d'effet a une signification environnementale puisque des modifications du taux de croissance d'une population algale peuvent avoir des répercussions sur la structure de la communauté en influençant la compétition et la succession des espèces (Stauber et Davies, 2000).

II-2-2-4-3 Paramètres physiologiques

Les processus physiologiques et/ou biochimiques peuvent être altérés par la présence d'un toxique en particulier les herbicides qui affectent généralement la photosynthèse des plantes cibles. Les paramètres physiologiques comprennent également par exemple, la respiration, la reproduction, le transport des nutriments.

II-2-2-4-4 Activités enzymatiques

Les enzymes jouent un rôle crucial dans le métabolisme de tous les organismes et peuvent être utilisées comme indicateurs d'effets toxiques. De plus les métaux lourds et les pesticides ont des modes d'action visant ou perturbant certaines activités enzymatiques (péroxydases, catalases, estérases, uréases). Certaines de ces activités enzymatiques sont mesurées par fluorimétrie après addition d'un substrat fluorochrome dans l'échantillon testé, c'est par

exemple le cas de la β -D-galactosidase, des estérases (Peterson et Stauber, 1996 ; Franklin et al., 2001b). Dans ce cas, la diminution de la fluorescence est interprétée comme une inhibition de l'activité enzymatique et la CEx correspond à la concentration en contaminants qui réduit de X% la fluorescence par rapport aux contrôles.

II-2-3 Interactions entre polluants

L'estimation de valeurs remarquables n'est pas suffisante en elle-même pour évaluer l'effet d'un toxique sur l'environnement. De plus, les réactions d'un organisme isolé en laboratoire à l'exposition d'un produit unique ne sont pas comparables aux réactions d'un écosystème complexe. En présence de plusieurs toxiques, deux types d'actions peuvent être attendus (Marking, 1985 ; Könemann et Pieters, 1996 ; Feron et Groten, 2002):

- **Les interactions:** qui peuvent être **synergiques** ou **antagonistes**. Une action synergique (réciproquement antagoniste) est telle que la toxicité du mélange est supérieure (réciproquement inférieure) à la somme des toxicités des deux polluants, pour un effet défini.
- **L'absence d'interaction:** on distingue, dans ce cas, les toxiques qui agissent différemment et de manière indépendante de ceux qui possèdent un mode d'action similaire.

D'après Könemann et Pieters (1996) et Feron et Groten (2002), en l'absence d'interaction il existe deux types d'action combinée: action identique simple ('simple similar action') et action indépendante ('dissimilar action') traduisant respectivement **l'addition des doses et l'addition des réponses**. Hewlett et Plackett (1959) ont élaboré des formules permettant de prédire la toxicité résultante de ces deux types d'action. Formules reprises dans des travaux menés récemment par Boedeker *et al.* (1992), Altenburger *et al.* (2000), Backhaus *et al.* (2000), Faust *et al.* (2001, 2003) et Clevers (2003) et présentées comme les deux concepts fondamentaux de prédiction de la toxicité des mélanges complexes.

II-2-3-1 Présence d'interactions: La formule d'Abbott

Une façon simple d'étudier l'effet toxique d'un mélange binaire en présence d'interactions, est de comparer l'effet individuel de chacun des composants du mélange (même paramètre d'effet, mêmes conditions et durée d'exposition) à la réponse combinée. On choisit d'étudier des combinaisons associant différentes concentrations de chacun des deux produits testés en mélange. On note **X** l'effet observé pour le premier produit considéré seul, **Y** celui du second produit et **EIM** (effet expérimental) qui traduit l'effet observé en combinant les deux produits.

On compare ensuite EIM à TIM, effet estimé par la **formule d'Abbott** développée par Gisy. (1996):

$$\mathbf{TIM} = X+Y - YX/100 \quad (1)$$

en utilisant le rapport d'inhibition: **RI** = EIM/TIM.

Les effets potentiels d'interaction sont évalués en comparant la valeur du RI à 1. On parle de **synergie si RI > 1**, d'**antagoniste si RI < 1** et d'**effet additif si RI = 1**.

II-2-3-2 Absence d'interaction: Concepts de prédiction de la toxicité des mélanges complexes

Classiquement deux types de concepts sont utilisés pour prédire la toxicité des mélanges complexes (plus de deux composés), appelés «concentration addition» et «independant action». Ils reprennent respectivement les concepts d'**addition des doses (CA)** et d'**addition des réponses (IA)**.

II-2-3-2-1 Addition des doses - CA

Pour une mixture à n composés, ce modèle est défini par l'équation suivante (Berenbaum, 1985):

$$\sum_{i=1}^n C_i / ECx_i = 1 \quad (2)$$

Dans cette équation C_i représente les concentrations de chacune des substances présentes dans le mélange qui engendrent un effet total de x%. ECx_i traduit les concentrations qui engendrent le même pourcentage d'effet que la mixture mais pour les substances considérées individuellement. Le quotient C_i/ECx_i est alors appelé «toxic unit» ou unité toxique (Sprague, 1970). Pour que cette équation soit valide, chaque substance doit être en proportion déterminée (p_i) par rapport à la concentration totale finale (c_{mix}) pour chacune des associations de concentrations testées ($p_i = c_i/c_{mix}$). La concentration totale finale de chacune des substances (c_i) va engendrer un effet $E(c_{mix})$ de x qui par définition équivaut à ECx_{mix} . Dans l'équation (2) le terme c_i peut être remplacé par l'expression $p_i ECx_{mix}$ ce qui donne une nouvelle équation (3):

$$ECx_{mix} = \left(\sum_{i=1}^n p_i / ECx_i \right)^{-1} \quad (3)$$

Ce modèle est basé sur l'idée que chacun des composants du mélange possède le même site et/ou mécanisme d'action. L'interprétation du terme «même mode d'action» peut différer totalement en fonction du paramètre d'effet considéré. Au sens large, si on considère la mort cellulaire ou l'inhibition de la croissance, ce modèle peut s'appliquer à l'ensemble des contaminants environnementaux, alors que le sens strict de cette expression se rapporte à la cible moléculaire ou le processus physiologique et/ou métabolique altéré dans l'organisme considéré (Pösch, 1993), ce qui restreint le nombre des molécules pouvant être impliquées. Pour ce concept, toutes les substances présentes contribuent à la toxicité du mélange quelle que soit sa concentration et son effet lorsqu'elle est considérée individuellement (<NOEC). Un modèle alternatif a alors été proposé par Bliss (1939), il sera décrit dans le chapitre suivant.

II-2-3-2-2 Addition des réponse - IA

Contrairement au modèle CA, il est basé sur le concept que chacune des substances possède un site et/ou mode d'action différents. L'effet des composés du mélange pris individuellement est indépendant au sens mathématique du terme. Le modèle est basé sur l'équation suivante:

$$E(C_{\text{mix}}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(C_i)) \quad (4)$$

où C_i et C_{mix} représentent respectivement les concentrations de chacun des constituants du mélange et la concentration totale du mélange. $E(C_i)$ traduit l'effet du composé i pris individuellement et $E(C_{\text{mix}})$ l'effet total du mélange.

Ce concept est basé sur l'addition des réponses/effets. De ce fait, chacune des substances du mélange doit être présente à une concentration engendrant un effet supérieur à zéro lorsqu'elle est considérée individuellement, pour être susceptible de contribuer à la toxicité globale du mélange.

II-2-4 De l'intérêt de coupler l'approche biologique et l'approche chimique

Les biotests permettent d'évaluer les niveaux d'effet des métaux et des pesticides. Ils fournissent une réponse globale par rapport aux différentes espèces chimiques présentes en intégrant les possibles interactions. Il semble tout de même nécessaire de coupler les résultats de toxicité observée avec l'analyse chimique complète (caractérisation physico-chimique, concentration en métaux totaux, éléments majeurs et présence et quantification des résidus de produits phytosanitaires) et la spéciation des métaux. Les méthodes polarographiques permettent de déterminer la spéciation des métaux dans les eaux naturelles avec une estimation de la fraction labile généralement en accord avec la biodisponibilité des organismes. Avec certaines restrictions le transport des métaux au niveau membranaire (Modèle de l'ion libre) est proche des phénomènes mis en jeu au niveau de la couche de diffusion de l'électrode de mercure. La complémentarité des résultats obtenus par une technique de d'analyses de spéciation et par des bioessais sur algues permet de se faire une première idée de la biodisponibilité des éléments métalliques traces et de leur éventuel impact fonction de leur forme chimique. Néanmoins certains processus peuvent perturber la comparaison entre les mesures voltampérométriques et le transport biologique: présence de complexes lipophiles, excrétion de ligands organiques par les organismes et adsorption de molécules organiques sur l'électrode de mercure.

Dans cette étude, on s'intéressera exclusivement à l'impact de certains produits phytosanitaires utilisés en riziculture camarguaise sur le milieu récepteur, à la biodisponibilité du cuivre et du zinc en contexte de multipollution viticole et en présence de matières organiques dissoutes variées en couplant les approches chimique et biologique. Ce travail permettra de tester l'applicabilité du modèle FIAM dans des eaux naturelles de composition complexe et d'étudier les interactions qui peuvent exister entre contaminants en terme de biodisponibilité voire de toxicité sur des algues aquatiques d'eau douce. Les principaux résultats obtenus seront discutés en tenant compte des remarques précédemment évoquées.

MATERIEL & METHODES

MATERIEL & METHODES

METHODOLOGIES

I- Méthodologie de prélèvement, de filtration et de conservation des échantillon

Avant utilisation, tout le matériel (verrerie, flaconnage) susceptible d'entrer en contact avec l'échantillon est soigneusement décontaminé et nettoyé selon les protocoles décrits ci-dessous.

I-1 Flaconnage de prélèvements

Pour les eaux de ruissellement de parcelles viticoles, de drainage et de la rivière la Peyne, les prélèvements s'effectuent dans des flacons en polyéthylène préalablement nettoyés à l'acide nitrique 10% et rincés abondamment à l'eau MilliQ (De Mora et Harrison, 1983). Les prélèvements des eaux de rizières, des canaux de drainage et du Rhône s'effectuent dans des bouteilles en verre préalablement nettoyées au méthanol et à l'acétone en vue de l'analyse de résidus de produits phytosanitaires.

I-2 Prélèvements manuels sur le terrain

Dans le cadre d'un prélèvement manuel, chaque flaconnage nettoyé comme précisé ci-dessus est préalablement rincé trois fois avec l'échantillon à prélever de façon à conserver une certaine représentativité de l'échantillon. Les prélèvements se font, dans la mesure du possible, dans une zone où l'eau n'est pas stagnante et dans le sens du courant. La zone en amont doit être dégagée de matériaux contaminants ponctuels. Le prélèvement est effectué en immersion complète, on limite la présence d'air afin de limiter au maximum les contaminations d'une part et l'évolution des échantillons d'autre part.

I-3 Filtration et Conditionnement définitif des échantillons

Le conditionnement définitif doit être effectué assez rapidement, après le prélèvement, pour prévenir tout risque de contamination. L'étiquetage doit être rigoureux pour éviter tout risque de confusion sur l'identité des échantillons (lieu et date de prélèvement). Avant filtration, chacun des échantillons est homogénéisé de façon à remettre toutes les particules en suspension. Les filtrations doivent être effectuées le plus rapidement possible après les prélèvements pour éviter tout processus de dissolution, précipitation et sorption susceptible de modifier les équilibres (cinétiques lentes).

I-3-1 Éléments Majeurs

La filtration s'effectue sur filtres 0,45 μm (PVDF, acétate de cellulose). Les échantillons réservés à l'analyse des cations sont conservés à +4°C et à l'obscurité, en milieu acide (1% d'acide nitrique suprapur concentré) en tubes polypropylènes de 10 ml préalablement nettoyés à l'acide nitrique dilué puis rincés à l'eau MilliQ. Ceux réservés à l'analyse des anions sont conservés sans ajout d'acide à -24°C dans des tubes simplement rincés à l'eau milliQ.

I-3-2 COD

Les échantillons filtrés à 0,45 μm sont conservés jusqu'aux analyses à 4°C et à l'obscurité. Ils sont conditionnés, après stabilisation par ajout de 1% de chlorure mercurique (HgCl_2 à 1g/l)

empêchant tout développement bactérien, dans des flacons en verre borosilicaté de 50 ml préalablement calcinés (8 heures à 550°C).

I-3-3 Métaux Traces

Les exigences nécessaires à la détermination d'éléments traces ne dépend pas de la teneur en substance trace recherchée, mais du rapport entre cette teneur et celle de l'environnement de travail. La première préoccupation dans l'analyse des traces sera donc de maîtriser son environnement de travail. C'est pourquoi la filtration s'effectue avec un système *Sartorius* en polyéthylène sous hotte à flux laminaire. Les filtres utilisés sont de type Millipore® 0,2 µm (PVDF- 47 mm de diamètre) initialement trempés dans une coupelle d'acide nitrique suprapur puis rincés plusieurs fois à l'eau MilliQ avant utilisation. En fin de filtration, les échantillons sont acidifiés avec du HNO₃ (Merck Suprapur) à 1‰ toujours sous la hotte à flux laminaire. Les échantillons sont conservés dans des flacons en nalgene préalablement nettoyés comme suit. Le flaconnage est laissé à tremper dans de l'acide nitrique pour analyse (10%) pendant au moins 2 jours puis rincé à l'eau MilliQ. Les flacons sont conservés pendant au moins 8 jours remplis d'un mélange eau MilliQ et acide nitrique (1% Merk suprapur). Ils sont ensuite rincés à l'eau MilliQ et stockés dans des sachets plastiques.

L'analyse de spéciation a été réalisée sur des échantillons filtrés à 0,45 µm et conservés dans des flacons en polyéthylène (préalablement nettoyés à l'acide nitrique 10%).

I-3-4 Pesticides

Après homogénéisation des échantillons, les extractions sont réalisées sur l'eau brute. Après évaporation à sec et reprise dans une phase mobile, les extraits sont conservés dans des tubes en verre à -18°C jusqu'à analyse.

I-3-5 Biotests

Les échantillons sont filtrés à 0,45 µm et conservés dans des flacons en polyéthylène (préalablement nettoyés à l'acide nitrique 10%) pour la mise en évidence d'une toxicité due aux métaux et dans des flacons en verre (préalablement nettoyés au méthanol et à l'acétone) pour l'étude d'une toxicité associée à des produits phytosanitaires organiques. Dans la mesure du possible, les biotests sont effectués dans un laps de temps relativement court après la filtration, sinon les échantillons sont stockés à -24°C jusqu'à l'exécution des tests.

II- Caractérisation physico-chimique

II-1 Paramètres physico-chimiques généraux

Le pH a été mesuré avec un pH-mètre (*WTW pH96 Microprocessor* à électrode combinée pH et sonde de température intégrée *SenTix 97T*) et la conductivité par un conductimètre à microprocesseur (*WTM LF325*) associé à une cellule de conductivité standard (*Tetracon 325*) selon la norme AFNOR (1977). La mesure de l'alcalinité a été effectuée par titration acide (HCl, 1,2 N et 25ml d'échantillon). Le pH des eaux des différentes études se situant entre 6 et

8, les ions CO_3^{2-} sont négligeables dans cette gamme de pH, l'alcalinité correspond donc à la concentration en ions HCO_3^- .

II-2 Carbone Organique Dissous (COD)

Cette mesure s'effectue avec un analyseur de Carbone Organique Total (*Shimadzu TOC-Analyser 5500*). Le principe de la mesure repose sur la détection du dioxyde de carbone (cellule de détection InfraRouge Non Dispersif (NDIR)) formé après oxydation catalytique à haute température (680 - 950°C) de la matière organique. La cellule NDIR génère un signal de détection représenté par un pic dont la surface est calculée par unité de traitement. Les analyses ont été effectuées en mode NPOC (Non-Purgeable Organic Carbon) suivant la norme AFNOR (1985) à l'Institut Forel (Suisse). Le carbone organique est mesuré dans un échantillon acidifié avec du HCl (pH<2) dont la composante Carbone Inorganique a été éliminée par un flux gazeux (O_2/NO_2).

II-3 Analyse des éléments majeurs

Les analyses effectuées sur la phase dissoute (<0,45 μm) concernent les principaux éléments majeurs: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} et NO_3^- . On considère un élément comme majeur quand sa concentration atteint le mg/l. Toutes les analyses ont été effectuées par électrophorèse capillaire (ISTEEM et Maison des Sciences de l'Eau- Montpellier II - Laboratoire d'Hydrosciences) pour les échantillons de viticulture et les eaux de la Peyne et par chromatographie ionique (Cl^- , SO_4^{2-} et NO_3^-) et absorption atomique four et émission de flamme pour les échantillons d'eaux de drainage et les solutions de sol (ISIM, Montpellier).

II-3-1 Dosage des éléments majeurs par l'électrophorèse capillaire

II-3-1-1 Principe de l'électrophorèse capillaire

L'appareil utilisé est de type *CIATM* (Capillary Ion Analysis, *Quanta 4000* Waters®). Le principe s'apparente à la technique de séparation de type chromatographie. Cependant, il n'y a pas de rétention sur une phase stationnaire, mais au contraire une migration libre des espèces en solution, neutres et/ou porteuses de charges, sous l'effet d'un champ électrique, au sein d'un capillaire rempli d'un électrolyte tampon. Une importante différence de potentiel est imposée entre les deux extrémités du capillaire. Sous l'effet de ce champ électrique, les différentes espèces en présence vont migrer vers la charge opposée (cations vers la cathode, anions vers l'anode) sous l'influence de modificateurs de flux (Osmotif Flux Modifier OFM). La séparation est fondée sur la différence de mobilité, fonction de la conductivité et de la masse moléculaire de chacun des ions analysés.

La détection s'effectue en ligne sur le capillaire par un détecteur UV à haute énergie, utilisant une lampe à vapeur de mercure et des filtres permettant une sélection de différentes longueurs d'onde. La séquence de mesure comprend une partie calibration constituée par l'analyse d'étalons multicomposants suivie d'une partie mesure permettant l'analyse séquentielle d'échantillons. Les calibrations sont effectuées à partir de trois solutions standards de

concentrations connues. On procède ensuite aux traitements des électrophérogrammes (logiciel de traitement des données *Millenium 2010*, carte interface *Lance/Bus*), en vérifiant au préalable la linéarité des courbes d'étalonnage pour chaque ion.

II-3-1-2 Analyse des anions

Les anions Cl^- , SO_4^{2-} et NO_3^- sont analysés avec les paramètres de configuration suivants en adaptant le protocole fourni par le fournisseur *Waters* (1996):

- Capillaire en verre de silice fondue *Accusep* (75 μm x 60 cm) spécifique à l'analyse des anions,
- Potentiel de -20 kV, courant de 19 μA ,
- Injection en mode hydrostatique pendant 30 secondes, le remplissage du capillaire s'effectue par simple différence de hauteur. Le temps de migration a été adapté à 6 minutes,
- Température de l'enceinte 25°C,
- Alimentation négative,
- Détection UV inverse ($\lambda = 214 \text{ nm}$),
- Électrolyte: OFM- OH^- pH = 8 (mélange de 4,6 mM chromate et de 0,5 mM OFM). L'ajout du modificateur de flux (OFM) permet de maîtriser le sens du flux électroosmotique supérieur au flux électrostatique.

Les échantillons sont dilués afin de se situer dans une gamme allant jusqu'à 50 mg/l. Les ions apparaissent sur l'électrophérogramme dans l'ordre suivant: Cl^- , SO_4^{2-} et NO_3^- .

II-3-1-3 Analyse des cations

Les cations suivants Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ et K^+ sont analysés avec les paramètres de configuration suivants en adaptant le protocole fourni par le fournisseur *Waters* (1996):

- Capillaire en verre de silice fondue *Accusep* (75 μm x 60 cm) spécifique à l'analyse des cations,
- Potentiel de 13 kV pour une meilleure séparation des pics notamment sodium et magnésium, courant de 11 μA ,
- Injection en mode hydrostatique pendant 30 secondes. Le temps de migration a été adapté à 8 minutes pour les cations car le potentiel est plus faible que celui choisi pour les anions,
- Température de l'enceinte 25°C,
- Alimentation positive,
- Détection UV inverse ($\lambda = 214 \text{ nm}$),
- Électrolyte: UV-CAT 2 (mélange de tropolone, de 18 Crown-6-Ether et d'UV-CAT 2). Les électrolytes UV-CAT sont développés et commercialisés exclusivement par Waters.

Les échantillons sont dilués afin de se situer dans une gamme allant jusqu'à 100 mg/l. Les ions apparaissent sur l'électrophérogramme dans l'ordre suivant: K^+ , Ca^{2+} , Na^+ et Mg^{2+} .

II-3-2 Dosage des anions par chromatographie ionique

Certaines analyses d'anions majeurs ont été effectuées par chromatographie ionique (Laboratoire de Mme Persin, ISIM). L'appareil utilisé est un chromatographe *Dionex DX120* équipé d'une colonne échangeuse d'anions et d'un détecteur conductimétrique différentiel après suppression d'une partie de la conductivité à l'aide d'un dispositif électromembranaire. L'éluant choisi est un mélange $\text{CO}_3^{2-} / \text{HCO}_3^-$ préparé dans de l'eau ultrapure. Les conditions opératoires sont les suivantes: débit de l'éluant 1,0 ml/min à une pression de 1700 psi (115 bars). Les solutions standards sont préparées aux concentrations suivantes 1, 2, 5 et 10 mg/l de chaque anion. Les temps de rétention varient de 4,4 à 4,7, de 7,7 à 8 et de 12,1 à 14 minutes respectivement pour les ions Cl^- , NO_3^- et SO_4^{2-} .

II-3-3 Dosage des cations par absorption atomique four et émission de flamme

Le principe de l'absorption atomique repose sur la loi de Beer-Lambert:

$$D = \log P_0/P = \xi * C * l$$

avec D: densité optique, P_0 : intensité de la radiation incidente, P: intensité de la radiation transmise, ξ : coefficient d'extinction molaire, C: concentration et l: longueur de la cellule d'absorption. La densité optique étant proportionnelle à l'élément à doser.

Concrètement, l'excitation par une énergie thermique, va permettre le passage de l'état fondamental à un niveau d'énergie supérieur instable. Les atomes vont donc retourner à l'état fondamental ce qui va induire une production d'énergie sous forme de radiations dont la fréquence est caractéristique de chaque élément. L'intensité de la radiation est alors proportionnelle à la concentration de l'élément à doser. En émission de flamme, l'échantillon est nébulisé puis atomisé dans une flamme composée d'un mélange air-acétylène.

Les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} ont été dosés en absorption atomique four (*Varian*) aux longueurs d'onde respectives de 422,7 et 589 nm. Les ions Na^+ et K^+ ont quant à eux été dosés en émission de flamme (*Varian*) aux longueurs d'onde respectives de 766,5 et 285,2 nm. Les solutions de travail sont réalisées à partir de solutions standards à 1 g/l. Les gammes d'étalonnage varient de 0,1 à 0,4 mg/l pour Mg^{2+} , de 1 à 4 mg/l pour Ca^{2+} et de 10 à 20 mg/l pour Na^+ et K^+ .

II-4 Analyse des éléments traces

Les éléments traces suivants ont été analysés: Li, B, Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Ba, Pb, U. On considère qu'un élément est en quantité de traces quand sa concentration est inférieure au $\mu\text{g/l}$. Les analyses ont été effectuées sur la phase dissoute (<0,2 – 0,45 μm). La plupart des analyses ont été réalisées au service commun (ISTEEM-Hydrosciences, Montpellier II) sur un ICP-MS (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry, *VG Plasma Quad II+*). Cet appareil permet une analyse multi-éléments rapide et précise d'échantillons en solution. Cette technique possède des limites de détection très basses (0,01 -0,1 $\mu\text{g/l}$) variant selon les éléments et les matrices.

II-4-1 Principe de fonctionnement de l'ICP-MS

L'échantillon est aspiré dans un fin tube capillaire par une pompe péristaltique vers le nébuliseur puis la chambre de vaporisation. La solution est transformée en aérosol par injection d'argon ultra pur, elle est ensuite transférée vers la torche à plasma à l'extrémité de laquelle se trouve un générateur radio haute fréquence qui crée un champ magnétique. Les électrons excités entrent en collision avec l'aérosol provoquant une ionisation à 6000°K. Les ions aspirés dans les ouvertures de deux cônes en Ni pur, sont focalisés par un système de lentilles électrostatiques vers le quadripôle. Le spectromètre de masse quadripôle les sépare sous l'influence de quatre barreaux soumis à des variations de potentiel selon leur rapport masse/charge ($M_{\text{masse moléculaire}}/Z_{\text{n°atomatique}}$). Un analyseur multi-canaux enregistre les signaux électriques produits.

Le détecteur fournit des réponses linéaires pour des taux de comptage de l'ordre du ppt au ppm. L'appareil géré par un ordinateur, transforme les coups en concentrations grâce à des courbes de calibration qui ont été établies pour chaque élément avec des solutions synthétiques multi-élémentaires de concentrations connues (SPEX).

II-4-2 Préparation des échantillons, des standards et des blancs

Les échantillons environnementaux peuvent être analysés par ICP-MS après filtration et acidification. Deux étalons internes, Bismuth (^{209}Bi) et Indium (^{115}In), sont ajoutés en quantités connues aux échantillons pour corriger la dérive instrumentale propre à chaque appareil au cours de la série de mesure. Cette correction s'effectue automatiquement via le logiciel.

Chaque échantillon est donc préparé de la façon suivante dans des tubes préalablement nettoyés dans un bain acidifié à 5% d' HNO_3 (65%) puis rincés à l'eau MilliQ:

- 9,65 ml d'échantillon en solution,
- 250 μl de HNO_3 ultrapur à 65% pour une meilleure ionisation de l'échantillon (faible interférence de cet acide non significative différente de celle de l'eau MilliQ),
- 100 μl d'une solution de Bi-In à 1 mg/l.

Deux standards de concentrations connues sont utilisés pour établir les droites de calibration. Les gammes de concentrations choisies correspondent aux concentrations les plus couramment rencontrées dans les échantillons étudiés. La base utilisée pour nos standards est le SPEX 2A à 10 mg/l. Les standards réalisés sont respectivement de 5 et 10 $\mu\text{g/l}$. Ces standards sont préparés de façon identique aux échantillons. Des blancs analytiques sont systématiquement passés au début de chaque procédure. Il s'agit d'eau MilliQ préparée de la même manière et au même moment que les échantillons naturels. Ces blancs sont ensuite soustraits des valeurs mesurées pour les échantillons, on enlève ainsi la « contamination » liée au bruit de fond et à la préparation des échantillons. La limite de détection pour chaque élément est calculée à partir des résultats obtenus sur les blancs réactifs.

Remarques:

1- Durant l'analyse par ICP-MS de l'arsenic, il peut se produire des interférences avec les ions chlorures dues à la formation de chlorure d'argon ($^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$) dans le plasma qui possède une masse similaire à celle de l'As (^{75}As). De ce fait les résultats devront être comparés à ceux obtenus par un dosage ICP-MS/Générateur d'hydrures de façon à valider ou pas les résultats obtenus par ICP-MS. Cette méthode consiste en une pré-réduction de l'arsenic par l'iodure de potassium en présence d'acide ascorbique, l'As (III) étant la seule espèce formant des hydrures (Hung *et al.*, 2004). Les mesures ont été effectuées selon la méthode d'Andrea (1977), modifiée par Branch *et al.* (1991) sur un ICP-MS (*VG PlasmaQuad*) couplé à une génération d'hydrures (Feng *et al.*, 1998 ; Hung *et al.*, 2004) et ont permis de valider les mesures obtenues avec la procédure standard. Actuellement l'analyse des espèces arsénées peut être effectuée en une seule injection grâce à un couplage HPLC/ICP-MS (Hung *et al.*, 2004 ; Huang et Ilgen, 2004).

2- Certains échantillons de solutions de sol de par leurs concentrations élevées en métaux ont été analysés en absorption atomique four par Michaël Clairotte au Laboratoire Sciences du Sol (INRA de Montpellier).

Même si les concentrations totales sont des données quantitatives importantes, il nous a paru nécessaire de déterminer la spéciation des éléments métalliques étudiés (cuivre essentiellement et zinc). Cette partie a fait l'objet d'une mise au point de la méthode de d'analyse de spéciation, amorcée en DEA et améliorée lors de mes travaux de thèse. Le principe de la méthode d'analyse de spéciation étudiée ainsi que les principaux résultats d'optimisation des conditions opératoires sont présentés dans les chapitres qui suivent et en annexe **2-II**.

II-5 Analyse de spéciation par voltampérométrie: Mesure des fractions labiles

Les méthodes impulsives ayant actuellement presque complètement supplanté les méthodes polarographiques plus classiques, notre choix s'est porté sur la **méthode voltampérométrique à redissolution anodique à tension différentielle surimposée (Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry - DPASV)** en raison de ses avantages décisifs pour l'analyse de spéciation: une plus grande sensibilité, sélectivité pour la détection des complexes dissous labiles dans les eaux naturelles sans préconcentration et modification de l'échantillon d'origine excepté l'ajout d'un électrolyte neutre. Il est important de préciser que l'utilisation d'une telle technique doit être combinée avec des méthodes adéquates d'échantillonnage et de conservation (décrites précédemment) de façon à minimiser les risques de contamination extérieure et les pertes significatives de l'élément trace et à éviter l'altération des caractéristiques physico-chimiques de l'échantillon à étudier (Daniele *et al.*, 1989). Tout le matériel utilisé (électrode, cellule, consommables) est soumis à un nettoyage poussé à l'acide nitrique suprapur et à un rinçage abondant à l'eau milliQ.

II-5-1 Appareillage

L'appareillage Metrohm, utilisé pour la DPASV, est constitué d'un processeur (*Processor 646V*) et d'un poste électrodes-cellule (*Stand 647V*). Le choix des électrodes s'est arrêté sur une électrode de référence Ag/AgCl(s) (KCl, 3M), une contre-électrode en platine et une électrode indicatrice utilisée en **mode HMDE** (Hanging Mercury Drop Electrode) qui permet d'effectuer des dosages de très haute sensibilité 10^{-7} - 10^{-10} M (domaine des traces) en assurant le confinement et la reconcentration des métaux dans la goutte de mercure sous forme d'amalgames (Cu, Pb, Zn, Cd). Un électrolyte non électroactif (KNO₃, 0,1M, Sygma) est utilisé pour améliorer la conductivité des échantillons testés et minimiser le courant de phénomène de migration sur la valeur du courant.

II-5-1-1 Électrode de travail

Cette électrode possède une micro-goutte de mercure comme partie active, en contact direct avec la solution à analyser. Le mercure est déplacé à l'aide d'un piston commandé par une vis micrométrique, qui permet la formation de gouttes dont l'aire est reproductible à mieux de 5%. Entre chaque dosage, on laisse tomber la goutte ayant servi à la précédente analyse ainsi que les trois ou quatre suivantes afin d'éviter les risques de diffusion à l'intérieur de la colonne capillaire de mercure. En outre, de nombreux ions métalliques se réduisant irréversiblement sous forme d'amalgames dans le mercure, le renouvellement des gouttes, après chaque analyse, permet d'éviter les empoisonnements entre échantillons et conserve à la surface son intégrité (Lara-Cazenave, 1994).

Remarque: le mercure doit être de qualité très pure. Après usage, il est récupéré et conservé pour être traité et éventuellement recyclé (Ademe Angers).

II-5-1-2 Électrode de référence

L'électrode de référence Ag/AgCl est mise en contact avec la solution à analyser par l'intermédiaire d'un pont de jonction généralement rempli d'une solution saturée de KCl. Du fait de l'analyse ultérieure de l'élément cuivre et bien que l'électrode soit équipée d'un disque de verre fritté qui empêche théoriquement la diffusion trop rapide des ions Cl⁻ dans la solution, nous avons préféré utiliser un pont électrolytique constitué de KNO₃ (0,1 M) pour limiter la diffusion des ions chlorures dans la solution et les possibles interférences avec les ions Cu (I) qui risqueraient de modifier les équilibres au sein de l'échantillon à doser (Botelho *et al.*, 2002).

II-5-2 Principe de la redissolution anodique (*Stripping Voltammetry*)

L'analyse par redissolution anodique s'effectue en trois étapes dont deux principales:

- [1] - **L'étape de réduction** qui permet l'accumulation et la concentration sous forme d'amalgames dans la goutte de mercure, des éléments initialement dilués dans la solution,
- [2] - L'étape d'équilibrage (arrêt de l'agitation) durant laquelle l'électrolyse se poursuit sous l'influence du phénomène de diffusion seulement,

[3] - **L'étape de redissolution** qui permet la réoxydation du métal amalgamé. Elle résulte d'un balayage de potentiel vers des valeurs supérieures, qui provoque l'apparition d'un signal de courant correspondant à l'élément métallique pré-concentré.

La reproductibilité des résultats nécessite la maîtrise des paramètres électrochimiques, mais dépend également de la nature de l'électrolyte, de la durée d'agitation et d'équilibrage de la solution ainsi que de la taille de la goutte. Les conditions opératoires retenues pour notre étude sont présentées dans le tableau **II-1**. L'optimisation de ces différents paramètres est détaillée dans l'annexe **2-II**.

Tableau II-1: Valeurs retenues pour les différents paramètres d'analyse en DPASV pour des conditions opératoires optimisées et références bibliographiques associées.

Paramètres	Valeur optimisée	Références bibliographiques
<u>Durée du dégazage</u>	5 minutes	Shuman et Cromer, 1979 Aualiitia et Pickering, 1986 Tubbing <i>et al.</i> , 1994
<u>Durée de la phase d'équilibrage</u>	30 secondes	Cheng <i>et al.</i> , 1994
<u>Potentiel de déposition</u>		
<u>Cuivre seul</u>	-0,65 V	Shuman et Cromer, 1979 Pardo <i>et al.</i> , 1994 (-0,60 V) Donat <i>et al.</i> , 1994 Kozelka et Bruland, 1998 Witter <i>et al.</i> 1998 (-0,7 V) Rozan et Benoit, 1999 (-0,70 V)
<u>Zinc et Cuivre</u>	-1,65 V	Locatelli et Torsi, 2000
<u>Durée de la phase de déposition</u>	180 secondes	Mansouri <i>et al.</i> , 1992
<u>Potentiel de fin de balayage</u>	+0,15 - 0,20 V*	Mansouri <i>et al.</i> , 1992
<u>Amplitude des impulsions</u>	50 mV	Donat <i>et al.</i> , 1994 Town <i>et al.</i> , 1995 Witter <i>et al.</i> 1998 Mohan <i>et al.</i> , 2000
<u>Vitesse de balayage</u>	2 mV/s	Florence 1982/b Morrison et Florence, 1989 Town <i>et al.</i> , 1995

* Le domaine d'utilisation de la gamme de potentiel est limité du fait de l'oxydation du mercure. Ainsi, à des potentiels de l'ordre de 0,2 V, l'oxydation du métal amorce une montée très ample (« un mur ») qui peut masquer d'autres espèces oxydables. Le domaine choisi sera limité au potentiel de 150-200 mV pour éviter la dissolution anodique du mercure.

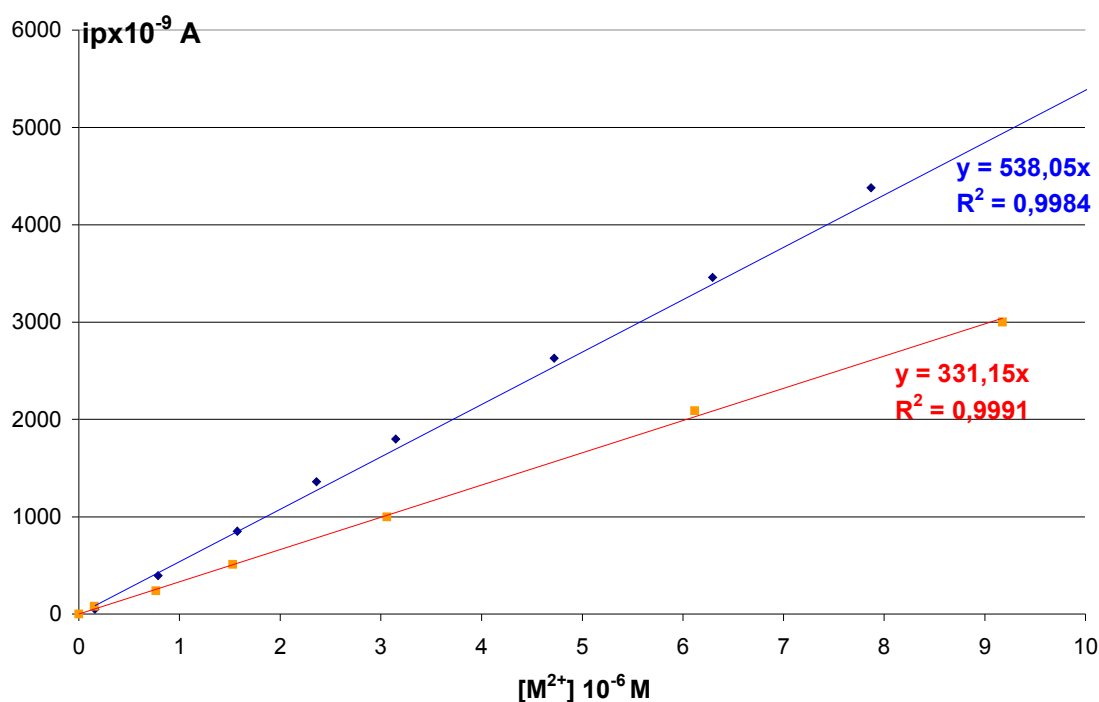
Remarque: Certains des résultats obtenus pour les métaux lourds ont permis de mettre en évidence des possibles phénomènes d'adsorption sur les parois en verre de la cellule électrolytique. Pour y remédier, on procède au siliconage de la cellule de façon à réduire l'adsorption des composés polaires incluant les métaux lourds sur la surface en verre: Siliconage par du DiMéthylDiChloroSilane 5% dans du toluène suivi de deux puis de trois rinçages respectivement par du toluène et du méthanol puis d'un séchage sous azote.

II-5-3 Procédure analytique

Chaque dosage a été précédé d'un nettoyage poussé des électrodes et de la cellule électrolytique à l'acide nitrique 10% et à l'eau milliQ. L'absence de contamination a été vérifiée systématiquement par passage d'un « blanc » constitué de 10 ml de l'électrolyte support (KNO_3 , 0,1M).

Les déterminations quantitatives sont basées sur une série de courbes d'étalonnage où les hauteurs de pic sont portées en fonction des concentrations croissantes en analyte. Pour le cuivre, l'étalonnage est effectué à partir d'une solution mère de sulfate de cuivre (CuSO_4 , $5\text{H}_2\text{O}$ Merck, ultrapur) de concentration 1 g/l de Cu(II), diluée pour obtenir une solution fille de concentration 10 mg Cu(II)/l de pH ajusté à 4,5 par des micro-ajouts d'acide nitrique (HNO_3 , ultrapur). Pour le zinc, elle est préparée à partir d'une solution fille de sulfate de zinc (ZnSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$, Merck ultrapur) obtenue de la même façon que la solution de travail de cuivre. Toutes les solutions sont préparées dans de l'eau MilliQ (Millipore) pour minimiser les apports de métaux traces. Les courbes d'étalonnage sont établies par additions de cuivre et de zinc dans une solution d'électrolyte (KNO_3 , 0,1 M) de pH initial égal à 7 (Figure II-1). Entre chaque addition de cuivre, un dégazage intermédiaire de 180 secondes est effectué ainsi qu'une agitation simultanée de façon à homogénéiser le mélange. Chaque essai est dupliqué.

Figure II-1: Courbes d'étalonnage du cuivre (■) et du zinc (●) établies par DPASV dans un milieu non complexant – KNO_3 0,1M - (Conditions opératoires définies dans le tableau II-1 et dans le texte).



En DPASV, le courant de diffusion i_d est directement proportionnel à la quantité de métal concentré dans la goutte de mercure. (Lara-Cazenave, 1994 ; Cheng *et al.*, 1994):

$$i_d = (1/\sqrt{D\pi t} + 1/r) n F D A C$$

avec F: constante de Faraday, A: surface de l'électrode, D: coefficient de diffusion et C: concentration.

De ce fait, les hauteurs de pic données en intensité de courant (nA) sont portées en fonction des concentrations croissantes en cuivre et/ou en zinc (μM de M^{2+}). Chacun des pics est caractérisé par son potentiel de pic (E_p , Volt). Le tableau II-2 dresse le bilan des valeurs des E_p obtenus au cours de nos différentes études et donne leur signification.

	Cuivre libre	Zinc libre	Cuivre complexé		Zinc complexé	
	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Labile	Inerte	Labile	Inerte
E_p (V)	0,03	-1,00	$E_p < E_p (\text{Cu}^{2+})$		$E_p < E_p (\text{Zn}^{2+})$	
(Ag/AgCl (s) 0,1M KNO_3)				absence de pic		absence de pic

Tableau II-2: Principales valeurs de potentiel de pic (E_p) répertoriées et espèces associées. (Valeurs données par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl(s)).

La méthode des ajouts dosés réalisée dans la matrice environnementale permettra d'accéder à la capacité de complexation et de déterminer qualitativement et quantitativement les espèces en solution dans les échantillons d'eaux étudiés.

1

II-5-4 Détermination de la Capacité de Complexation des eaux

La détermination de la **capacité de complexation (CC)** implique la titration des ligands présents dans l'échantillon par ajouts d'ions métalliques (Mohan *et al.*, 2000 ; Town et Filella, 2000). Elle traduit directement la quantité de matières organiques et/ou inorganiques potentiellement capables de former des complexes. Dans la majorité des études recensées, le cuivre (Buffle *et al.*, 1977, 1980 ; Ruzic, 1982 ; Valenta, 1983 ; Neubecker et Allen, 1983 ; Batley, 1986 ; Kyle, 1987 ; Boussemart *et al.*, 1993 ; Pardo *et al.*, 1994 ; Antelo *et al.*, 1998 ; Rodriguez Presa *et al.*, 1998 ; Rozan et Benoit, 1999 ; Botelho *et al.*, 2002), le cobalt (Hanck et Dillard, 1977) et le plomb (Botelho *et al.*, 2002 – formation de complexes inertes) sont les métaux les plus utilisés pour déterminer la capacité de complexation des eaux naturelles de par leur facilité à se lier à la matière organique. Dans le cadre de cette étude, le cuivre sera essentiellement utilisé pour déterminer les capacités de complexation des échantillons naturels étudiés et les **constantes de stabilité** associées (**K**).

La capacité de complexation est un paramètre qui est lié à la quantité d'agents complexants organiques et inorganiques présents dans l'eau. Elle est équivalente à la concentration en métal lourd (ion Cu(II)) qui doit être ajoutée dans l'échantillon avant l'apparition de l'ion cuivrique libre. Elle permet d'atteindre la concentration en substances organiques et inorganiques, qui regroupent aussi bien les grosses molécules que les colloïdes, présents dans l'échantillon et susceptibles de complexer le cuivre.

II-5-4-1 Modèle à 1 ligand

La courbe de titration, I_p en fonction de la concentration en cuivre ajouté, présente une inflexion ou une modification de pente lorsque la concentration en métal ajouté est équivalente à celle des ligands présents. Ce point de rupture est considéré caractériser la capacité de complexation de l'échantillon.

Ruzic (1982) a développé une théorie permettant d'interpréter les résultats de titrage des eaux naturelles. Cette méthode est basée sur la linéarisation des équations décrivant la réponse électrochimique dans l'hypothèse d'un modèle à un ligand:

$$[Cu'] / [[Cu]_T - [Cu']] = [Cu'] / [CC] + 1 / K * [CC]$$

avec $[Cu']$: Σ [espèces labiles du Cu] déposées dans la goutte de mercure qui regroupent le cuivre sous forme libre (Cu^{2+}) et les divers complexes inorganiques et organiques labiles, formes considérées comme responsables de la toxicité observée en milieu aquatique (Donat *et al.* 1994 ; Witter *et al.*, 1998), $[Cu]_T$: concentration en cuivre ajouté, $[CC]$: capacité de complexation des eaux équivalente à la concentration des espèces complexantes et K : constante de stabilité associée. Cette équation repose sur un modèle réactionnel de type:

$Cu' + CC \rightleftharpoons CuCC$ caractérisé par la constante conditionnelle de stabilité K :

$$K = [CuCC] / [Cu'] [CC]$$

Si on trace la courbe $[Cu'] / [[Cu]_T - [Cu]]$ en fonction de $[Cu']$, on obtient une droite de pente $1/CC$ et une ordonnée à l'origine $1/ K*[CC]$. On a ainsi accès aux valeurs calculées de la capacité de complexation et de la constante de stabilité.

Dans le cadre d'une hypothèse à un seul ligand et lorsqu'on ne peut pas utiliser la linéarisation de Ruzic faute de présence du métal sous forme libre, Pardo *et al.* (1994) préconisent une détermination graphique de la capacité de complexation à partir de la courbe de titration qui peut être divisée en deux zones matérialisées par deux droites bien définies de pentes distinctes (Figure II-2).

La première (droite 1) correspond à l'équation suivante $Cu(II) + L \rightarrow CuL$ (fixation des ions métalliques sur les sites complexants), tandis que la seconde (droite 2) traduit la saturation des sites de fixation présents sur le ligand et la présence de métal libre en excès. L'intersection de ces deux droites définit la capacité de complexation. La constante de stabilité étant quant à elle définie à partir des pentes de deux droites grâce à l'équation suivante (Valenta, 1983):

$$K = a_2 - a_1 / a_1 * CC$$

où a_1 et a_2 correspondent aux pentes de la première et seconde droites respectivement.

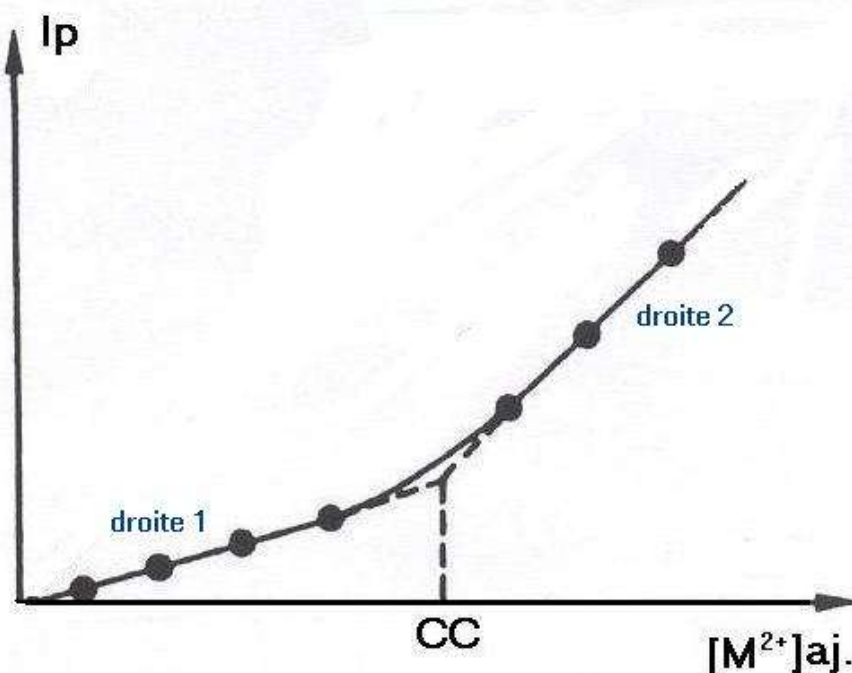


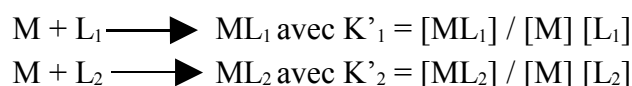
Figure II-2: Exemple d'une courbe de titration, I_p en fonction de la concentration en métal ajoutée et matérialisation du point d'inflexion correspond à la capacité de complexation ainsi que des deux droites (1 et 2) (Graphique issu de Tessier et Turner, 1995).

Les résultats expérimentaux ne sont pas toujours expliqués de façon satisfaisante par un modèle à 1 ligand, on peut alors avoir recours à une équation impliquant plusieurs ligands.

II-5-4-2 Modèle à plusieurs ligands

Dans le cas d'un modèle à deux ligands, les réactions d'équilibre sont alors:

Méthodologies



On arrive à l'équation suivante:

$$[Cu]_T - [Cu'] = K'_1 [Cu'] CC_1 / 1 + K'_1 [Cu'] + K'_2 [Cu'] CC_2 / 1 + K'_2 [Cu']$$

Que l'on peut étendre à un système plus complexes à n ligands:

$$[Cu]_T - [Cu'] = \sum_{i=1}^n K'_i [Cu'] CC_i / 1 + K'_i [Cu']$$

Par régression non linéaire on peut ajuster une courbe $[Cu'] / [Cu]_T - [Cu']$ en fonction de $[Cu']$ et en déduire les valeurs de K'_i et CC_i à partir de la droite de pente $1/(CC_1+CC_2)$ et d'ordonnée à l'origine $1/[(CC_1+CC_2)/(CC_1/K'_1+CC_2/K'_2)](CC_1+CC_2)$ (Ruzic, 1982 ; Kyle, 1987). En général un modèle à deux ligands est suffisant pour obtenir un ajustement correct des résultats expérimentaux (Baron, 1990).

II-5-5 Modèle de calcul de la spéciation chimique

Notre choix s'est porté sur un logiciel de calcul de spéciation *MINEQL+* (Westall *et al.*, 1976 ; Schecher et McAvoy, 1994) qui permet de prédire la distribution des espèces du cuivre en tenant compte des caractéristiques physico-chimiques à l'équilibre ($pCO_2 = 3,12 \cdot 10^{-9}$ Pa) de chacun des échantillons étudiés. Ce modèle est cependant très peu utilisé lors d'études de terrain de par son manque de données empiriques relatives aux constantes de stabilité de la matière organique naturelle (Christensen *et al.*, 1999). Pour pallier à ce manque, les valeurs des constantes de stabilité calculées par la méthode de Ruzic (1982) seront introduites dans le logiciel pour tenir compte de l'influence de la matière organique spécifique à chaque échantillon sur la spéciation chimique. Les données obtenues par cette simulation seront considérées comme représentatives d'une estimation de la répartition des espèces du cuivre dans les échantillons environnementaux considérés.

Remarque: Les formes solides et les précipités ne seront pas pris en considération dans la mesure où l'on travaille dans les domaines de solubilité des composés impliqués dans la spéciation. Les calculs ont été menés en considérant la présence de l'électrolyte support utilisé en DPASV (KNO_3 0,1M).

II-6 Quantification des produits phytosanitaires

La méthodologie d'extraction et d'analyse est commune à l'Oxadiazon, au Prétalachlore, à l'Alphacyperméthrine et au Fipronil. Elle diffère pour l'Azimsulfuron. Les composés sont tous dosés par une méthode séparative - la chromatographie - qui est basée sur des interactions (type adsorption, échange d'ions, exclusion sérique, partage mode inverse par exemple) entre les molécules d'un échantillon présent dans une phase mobile éluante (liquide-CLHP ou gazeuse-CPG) et une phase solide (stationnaire) présente dans une colonne. En fonction de

leur structure, les molécules vont interagir plus ou moins rapidement avec la phase stationnaire. Chaque molécule possède des temps de rétention différents et spécifiques qui vont permettre de les différencier et de les quantifier. Toutes les analyses ont été effectuées au Laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté de Pharmacie de Montpellier.

II-6-1 Analyse de l'Azimsulfuron

Elle s'effectue par chromatographie liquide haute performance (CLHP) avec détection UV (245 nm) sur un échantillon préalablement extrait.

Le principe de l'extraction liquide-liquide est le suivant: 300 ml d'eau brute sont acidifiés par 1 ml d'acide phosphorique (pH <5,5), ils sont extraits par 2 fois 80 ml de dichlorométhane. Les extraits sont évaporés à sec sous vide et repris par 0,5 ml de phase mobile (mélange eau-acétonitrile) et conservés à -18°C jusqu'à analyse.

L'analyse est effectuée sur une CLHP *Thermoseparation products Spectra System P1000 XR*. Les conditions chromatographiques sont les suivantes: colonne C18 (*CC 250/3 nucleosil 100-5 C18 HD* à 30°C); la phase mobile est constituée d'un mélange d'eau acidifiée à l'acide acétique (500-2) et d'acétonitrile (gradient de 25 à 100% en acétonitrile en 25 minutes) et présente un débit de 0,5 ml/min.

II-6-2 Analyses de l'Oxadiazon, du Prétalachlore, de l'Alphacyperméthrine et du Fipronil

Elles s'effectuent par chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur un échantillon préalablement extrait.

Le principe de l'extraction liquide-liquide est le suivant: 300 ml d'eau brute sont extraits par 2 fois 80 ml d'acétate d'éthyle suivi d'une extraction par du dichlorométhane. Les extraits sont réunis et évaporés à sec. Le résidu est repris par 0,5 ml d'hexane et conservé à -18°C jusqu'à analyse.

L'analyse s'effectue par chromatographie en phase gazeuse (*Chromatographe HP 5890*). Les conditions chromatographiques sont les suivantes: température de l'injecteur 250°C; température du détecteur 295°C; colonne capillaire *DB5* (longueur 30 m, i.d 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 µm); gaz vecteur, hélium 5,5 à un flux de 1,2 ml/min. La température initiale de 80°C est maintenue pendant 1 minute. Elle augmente de 25 ± 1°C par minute jusqu'à 130 ± 30°C puis de 5°C/min jusqu'à 280°C, température maintenue pendant 7 à 10 minutes. Le CPG est couplé à un détecteur de masse *HP 5971* équipé d'une chambre d'ionisation par impact électronique 70eV permettant une caractérisation des composés recherchés.

Pour les conditions chromatographiques précédemment détaillées, les temps de rétention des différents composés testés sont reportés dans le tableau **II-3**. Dans un premier temps les caractéristiques spectrales des composés ont été déterminées en mode balayage (ou SCAN) entre 50 et 550 uma. Afin de pouvoir détecter les composés étudiés avec un maximum de sensibilité, nous avons recouru à la détection d'ions sélectionnés spécifiques (mode fragmentométrique ou SIM) d'intensité élevée. Les ions caractéristiques m/z pour chacun des composés sont présentés dans le tableau **II-3** pour les deux années d'étude.

Composés	Temps de rétention t_R (min)	Ions MS
	2001 / 2002	m/z (uma)
Prétilachlore	24,5 ± 0,1	162-238
	19,5 ± 0,1	
Oxadiazon	24,7 ± 0,1	175-258
	19,7 ± 0,1	
Fipronil	22,9 ± 0,1	367-213
	18,0 ± 0,1	
Alphacyperméthrine	35,7 ± 0,1	181-208
	30,6 ± 0,1	

Tableau II-3: Temps de rétention (t_R en minutes) et ions caractéristiques pour les quatre composés dosés en CPG pour les deux années d'étude (2001 et 2002).

II-6-3 Rendements d'extraction et Seuils de quantification

La quantification de l'ensemble des composés s'effectue par étalonnage interne. Pour chacun des composés, le taux de rendement d'extraction ainsi que les seuils de quantification ont été systématiquement déterminés.

L'eau du Rhône après vérification de sa qualité de référence (non détection des produits phytosanitaires étudiés), a été dopée en chacun des composés à différentes concentrations comprises entre 0,1 et 10 µg/l. Les taux de recouvrement obtenus pour chacune des concentrations testées sont répertoriés dans le tableau II-4. Ils sont compris entre 68 et 108%.

✓ Composés	Concentrations (µg/l)	Taux de recouvrement %
✓ Azimsulfuron	10	90
	1	84
	0,10	89
✓ Fipronil	1,05	108
	0,10	68
✓ Prétilachlore	1,23	83
	0,12	74
✓ Oxadiazon	2,40	86
	0,24	68
✓ Alphacyperméthrine	0,50	79
	0,05	98

Tableau II-4: Taux de recouvrement obtenus après analyse de l'eau de référence du Rhône dopée en diverses concentrations en produits étudiés.

En 2001, les seuils de quantification ont été définis à 0,02 µg/l pour le fipronil et le prétilachlore, à 0,05 µg/l pour l'oxadiazon et l'alphacyperméthrine et à 0,1 µg/l pour l'azimsulfuron. Ils sont respectivement de 0,5 µg/l pour le prétilachlore et l'oxadiazon et de 0,1 µg/l pour l'azimsulfuron, le fipronil et l'alphacyperméthrine en 2002.

III- Biotest algal

III-1 Choix des espèces d'algues

Deux espèces d'algues unicellulaires vertes de la classe des Chlorophycées *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov Hindak) anciennement *Selenastrum capricornutum* et *Chlorella sp.* (Ecosite de Mèze) seront utilisées pour réaliser les biotests.

La forme de *Pseudokirchneriella subcapitata* ressemble à celle d'un croissant de lune et sa taille est d'environ 5,5 µm. *Chlorella sp.* possède, quant à elle, une forme sphérique et sa taille varie de 2 à 3 µm. Ces deux formes caractéristiques sont aisément reconnaissables au microscope. Ne possédant pas de flagelle, ces deux algues demeurent statiques et ne forment pas de colonie.

Même si *Pseudokirchneriella subcapitata* n'est pas représentative de la population naturelle des eaux de surface, elle peut tout de même être utilisée comme indicateur de la réponse des algues planctoniques d'eau douce puisqu'elle répond aux qualités requises pour les tests d'écotoxicité. D'un point de vue écologique, les chlorelles, par contre, sont des algues ubiquistes, que l'on retrouve dans tous les habitats aquatiques. Ces deux genres ont fait l'objet de nombreuses études impliquant des tests de toxicité métallique et organique (Fairchild *et al.*, 1998 ; Nyström et Blanck 1998 ; Franklin *et al.*, 2000 ; Rioboo *et al.*, 2002 ; Okamura *et al.*, 2002). Les cultures de deux algues seront effectuées conformément aux recommandations de l'US. EPA (1989).

III-2 Milieu de culture

Le milieu AAP (Algal Assay Procedure) est un milieu de culture nutritif standard (pH 7,5 ± 0,1) recommandé par l'US. EPA (1989, 1994) et l'Environnement Canada (1992). Il est constitué à partir de 5 solutions de nutriments concentrés 1000x (Tableau II-5). Les solutions de base sont autoclavées à 120°C sous une pression de 1 bar pendant 50 minutes puis conservées à 4°C et à l'obscurité. On veille à les renouveler tous les 6 mois afin de limiter leur contamination et leur éventuelle dégradation.

Pour l'étude de la toxicité des métaux, la présence d'Acide EthylèneDiamineTétraacétique (EDTA) dans le milieu est déconseillé (US. EPA, 1994) car il risque de modifier la spéciation des métaux (complexation des ions libres et compétition avec les ligands étudiés) et de diminuer leur biodisponibilité (Guéguen *et al.*, 2004). Dans le milieu initial AAP_{normal} (AAPn) utilisé pour le maintien de la culture, l'EDTA est présent pour éviter la précipitation du fer nécessaire à la croissance des algues. Pour les biotests, un milieu plus spécifique AAP_{modifié} (sans EDTA - AAPm) sera utilisé pour les tests impliquant des métaux, néanmoins du fer sera ajouté en complément au milieu noté AAP_{modifié+Fe} (AAPm+Fe).

Solutions	Nutriments	Concentration	Elément	Concentration
1	MgCl ₂ , 6H ₂ O	10,0 mg/l	Mg	2,65 mg/l
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	4,4 mg/l	Ca	1,2 mg/l
	H ₃ BO ₄	185,5 µg/l	B	32,4 µg/l
	MnCl ₂ , 4H ₂ O	415,6 µg/l	Mn	115,4 µg/l
	ZnCl ₂	3,3 µg/l	Zn	1,6 µg/l
	CoCl ₂ , 6H ₂ O	1,4 µg/l	Co	0,35 µg/l
	CuCl ₂ , 2H ₂ O	0,012 µg/l	Cu	0,004 µg/l
	Na ₂ MoO ₄ , 7H ₂ O	7,3 µg/l	Mo	2,9 mg/l
	FeCl ₃ , 6H ₂ O	160 µg/l	Fe	33,1 µg/l
	Na ₂ EDTA, 2H ₂ O *	300 µg/l	-	-
2	NaNO ₃	25,5 mg/l	N	4,2 mg/l
3	MgSO ₄ , 7H ₂ O	14,7 mg/l	S	1,9 mg/l
4	K ₂ HPO ₄	1,04 mg/l	P	0,19 mg/l
			K	0,47 mg/l
5	NaHCO ₃	15,0 mg/l	Na	11,0 mg/l
			C	2,1 mg/l

* Composé omis lors de la préparation du milieu AAPm+Fe

Tableau II-5: Composition des cinq solutions constitutives du milieu AAP.

III-2-1 Culture souche des algues en milieu solide

Pour un stockage de longue durée de la souche, les algues sont inoculées sur un milieu nutritif solide. Le milieu gélosé est composé d'une solution d'agar-agar (1,5%) mélangée au milieu liquide AAPn concentré 1,5x. Le tout est autoclavé 50 minutes à 120°C sous une pression de 1 bar. La solution ainsi obtenue est refroidie dans des tubes stériles en prenant soin d'obtenir une surface inclinée. Afin de préparer la culture souche en milieu solide, les algues sont d'abord prélevées à partir d'un repiquage axénique d'environ 4 jours en conditions stériles. Une prise d'environ 100 µl de cette culture est déposée et répartie sur toute la surface du milieu solide par striation, les tubes sont alors étiquetés avec la date d'ensemencement. Après une incubation de 24 ± 1°C pendant 7 jours et sous lumière blanche contrôlée et continue (5000-6000 lux), les algues sont conservées à 4°C et à l'obscurité pendant 6 mois maximum (Figure II-3). Sous cette forme elles peuvent servir de réserve à des repiquages ultérieurs. Cette culture souche permet de s'affranchir des dérives génétiques causées par de trop nombreux repiquages.

III-2-2 Maintien de la culture en milieu liquide

Elle s'effectue par préparation d'un repiquage axénique à partir d'une culture sur agarose (Figure II-3). Le transfert d'une colonie d'un milieu solide à un milieu liquide s'effectue en conditions stériles. Les algues sont transférées à l'aide d'une anse pasteur dans un erlenmeyer contenant 100 ml de milieu de culture liquide AAPn. La culture est mise en incubation pendant 7 jours à 24 ± 1°C, en agitation et illumination en continu à 5000-6000 lux. Cette culture porte le numéro 0 et aucun test écotoxicologique n'est réalisé à partir de ces algues. Au bout de 7 jours, l'état de la culture est vérifié au microscope pour s'assurer de l'absence d'une éventuelle contamination par des micro-organismes. Ensuite, un nouveau repiquage est préparé (numéro 1) en prélevant 1 ml de la solution d'algues 0 déposé dans 100 ml de milieu

de culture liquide AAP (Figure II-3). On continue les cycles de repiquage en prévision de tests écotoxicologiques futurs tous les 3-4 jours afin de maintenir la culture en phase exponentielle de croissance, ceci jusqu'au numéro 8 pour éviter la dérive génétique.

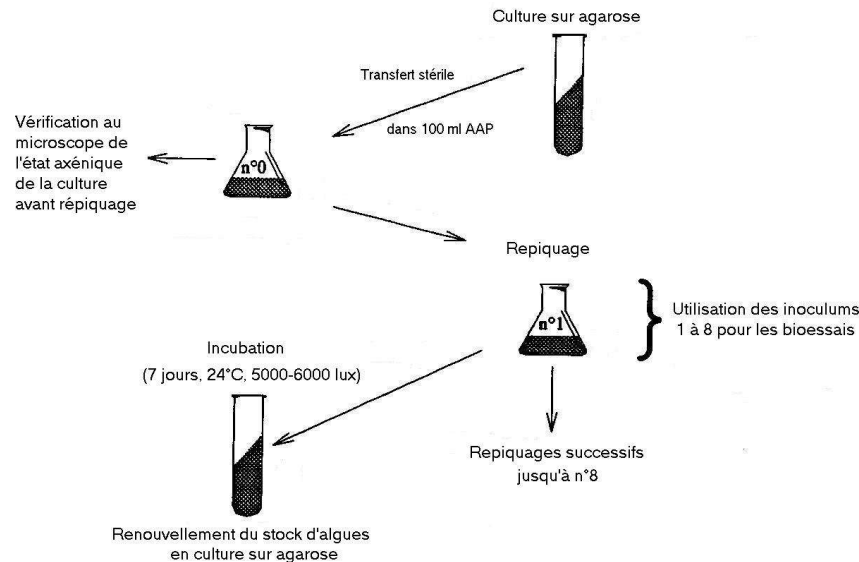


Figure II-3: Schéma de la culture d'algues en milieu gélosé-solide et liquide selon la procédure US E.P.A. (1989). (Adapté de Chèvre, 2000 et Gilbin, 2002).

III-3 Test de toxicité chronique

Le protocole utilisé est conforme aux recommandations de l'US. EPA (1989, 1994) et de l'Environment Canada (1992).

III-3-1 Préparation de l'inoculum

Les algues en phase exponentielle de croissance sont préalablement lavées et concentrées trois fois par centrifugation (6 minutes, 2000 tours/min) et par reprise du culot dans le milieu de culture adapté aux biotests (exempt d'EDTA). L'inoculum est préparé de façon à obtenir une concentration cellulaire initiale de 10^4 cellules/ml pour le test chronique en 72 heures.

■ Comptage au microscope optique

La détermination de la densité des organismes est réalisée au moyen d'une cellule de comptage *Fuchs Rosenthal* placée sur le plateau mobile d'un microscope (*Leis*, grossissement de 40×60). Un inoculum de $10 \mu\text{l}$ d'algues prélevé dans le culot suite à la dernière centrifugation est introduit dans 1 ml de milieu de culture dans un tube eppendorf (dilution au $100^{\text{ième}}$). La concentration cellulaire en algues est mesurée en comptant 3 fois 16 petits carrés sur la cellule de *Fuchs Rosenthal* (nombre de cellules par ml de solution stock). On effectue la dilution nécessaire pour obtenir un inoculum de $2,1 \times 10^5$ cell/ml dans 10 ml de milieu AAPm+Fe (concentration algale de départ 10^4 cell/ml).

III-3-2 Incubation

Les essais biologiques sont effectués en microplaques transparentes 96 puits statiques. Les conditions retenues sont une incubation de 72 heures à $24 \pm 1^\circ\text{C}$ en lumière continue (5000-6000 lux) dans le milieu standard choisi (en l'occurrence AAPm+Fe) et une remise en suspension des algues. Chaque puits correspond soit à une concentration de toxique (métaux, pesticides), soit à une dilution de l'échantillon naturel testé (200 μl par puits) dans lequel sont ajoutés 10 μl d'inoculum algal. Les puits placés sur les bords ne sont pas utilisés mais simplement remplis d'eau MilliQ afin d'éviter les effets de bords dus à l'évaporation (St Laurent *et al.*, 1992). Pour éviter des carences en nutriments un concentré de milieu de culture est systématiquement ajouté aux échantillons naturels (1‰ de chacune des 5 solutions stock plus la solution de fer). Toutes les dilutions sont effectuées dans le milieu de culture AAPm+Fe. En général, plusieurs concentrations de la solution à tester seront étudiées sur 3 à 6 réplicats.

III-4 Paramètres de suivi de l'effet

L'inhibition de la croissance (72h) a été mesurée par fluorescence (Lecteur *Spectramax Gemini XS - Molecular Devices*). Cet appareil fournit des résultats en unités relatives de fluorescence (RFU) qui n'ont pas de signification particulière mais permettent de comparer la réponse obtenue entre les différents échantillons et/ou concentrations testés et de calculer un pourcentage d'inhibition par rapport au développement dans le milieu de culture seul (référence) après soustraction du blanc (milieu de culture sans algue). Plusieurs paramètres d'effet ont été suivis et comparés pour mesurer l'effet sur les algues.

III-4-1 Effets chroniques: inhibition de la croissance algale

La mesure de la fluorescence augmente proportionnellement au contenu en chlorophylle *a* et suit également la densité cellulaire (Nyström et Blanck, 1998). Cette mesure indirecte de l'activité photosynthétique, s'avère être également un bon indicateur pour évaluer la concentration cellulaire et donc l'inhibition de la croissance (Geis *et al.*, 2000).

La détermination de la chlorophylle *a* s'effectue classiquement à un couple de longueur d'onde émission/excitation (± 20 nm) de 430/660 nm (APHA, 1985 ; Caux *et al.*, 1996 ; Mayer *et al.*, 1997 ; Van der Heever et Grobbelaar, 1998) ou 400-460/640 nm (Thompson, 1997). Après une étude de la fluorescence de *Pseudokirchneriella subcapitata* dans les conditions du test (milieu AAPm+Fe), Gilbin (2002) a déterminé le couple de longueur d'onde optimal de **488/685 nm** qui a été utilisé pour l'ensemble des biotests réalisés lors de cette étude.

III-4-2 Analyse par ajout de fluorochromes: exemple de l'activité estérasiq

Le principe repose sur l'introduction du substrat d'une enzyme ou d'un complexant/ligand d'une molécule d'intérêt dans le milieu qui va soit posséder une fluorescence propre soit traduire l'activité enzymatique recherchée par production d'un composé fluorescent. La fluorescence augmente ou diminue quantitativement avec l'activité ou la concentration du paramètre mesuré.

■ Exemple de la mesure de l'activité estérasiq: ajout de Fluorescéine DiAcétate (FDA)

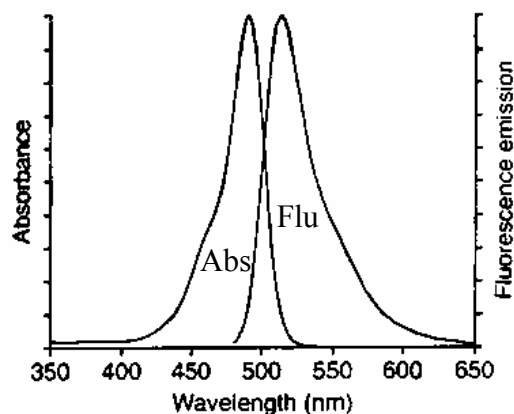
C'est un substrat-précurseur ($C_{24}H_{16}O_7$, PM = 416,39 g/mole, pKa = 6,4) lipophile sans fluorescente propre introduit dans les cellules algales par simple diffusion (diffusion passive) puis hydrolysé par des estérases intracellulaires non spécifiques. Cette molécule engendre un produit –la fluorescéine- qui est fluorescent dans le spectre du vert (530 - 560 nm). Lorsque un stress toxique existe l'activité estérasiq est diminuée. L'inhibition de la fluorescence de la FDA est un bon indicateur de l'effet de molécule toxique sur l'activité enzymatique des estérases et également une mesure indirecte de la viabilité cellulaire (intégrité membranaire et assimilation par les cellules algales) (Dorsey *et al.*, 1989).

De par sa faible solubilité dans l'eau, la solution stock de FDA (1 mM) est préparée dans du DMSO, elle est conservée à $-18^{\circ}C$. Une solution fille (0,1 mM) est utilisée lors des tests, elle est préparée en diluant 550 μ l de solution stock décongelée juste avant emploi dans 5 ml d'eau milliQ. Il est important d'effectuer la dilution finale juste avant le test, de par l'hydrolyse très rapide de la FDA dans l'eau (Snell *et al.*, 1996). Après la première lecture au temps T_0 une concentration finale en FDA de 5 μ M est ajoutée dans chacun des puits par une addition de 10 μ l de la solution fille. D'après les travaux de Franklin *et al.* (2001b) sur *Pseudokirchneriella subcapitata* pour une concentration initiale en FDA de 25 μ M la partie linéaire de la courbe représentant l'intensité de la fluorescence en fonction du temps se situe entre 3 et 12 minutes. Elle correspond au maximum de conversion de la FDA en fluorescéine, la décroissance obtenue après 12 minutes est due à la limitation du transport intracellulaire de la FDA. Dans notre étude, la concentration initiale en FDA est plus faible que celle choisie par Franklin *et al.* (2001b). De ce fait, l'activation ou non de la fluorescence par l'activité enzymatique des estérases sera comparée à celle mesurée avant l'introduction de la FDA après une post-incubation de 15 minutes (au lieu de 5 minutes pour l'étude de Franklin). Pour ce temps d'incubation, la précipitation de la FDA est évitée.

Le choix des longueurs d'onde de mesure de l'activité estérasiq est fonction du spectre d'absorption et d'émission de la fluorescéine qui excitée à 488 nm fluorescence dans le spectre du vert 530-560 nm (Gala et Giesy, 1994) (Figure II-4). Les longueurs d'ondes choisies pour l'étude (**excitation 485 / émission 530 nm**) sont conformes à celles utilisées par Breeuwer *et al.* (1995) 490/515 nm, Franklin *et al.* (2001 a et b) 488/530-560 nm et Regel *et al.* (2002) 488/530 nm.

Figure II-4:
Spectre d'émission et d'absorption
de la fluorescéine (pH = 9).

(D'après *Molecular Probes*).



III-5 Expression des résultats de toxicité

L'apparition d'effets (inhibition de la croissance, de la chlorophylle, de l'activité estérasique) en fonction de la concentration en contaminants suit généralement une fonction qui peut être décrite par l'équation de Hill (1910) initialement utilisée pour modéliser la fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine (Vindimian *et al.*, 1983). L'équation du modèle est la suivante:

$$\text{Effet} = (\text{Effet } \infty - \text{Témoin}) = C^{\text{nH}} / C^{\text{nH}} + \text{CE}_{50}^{\text{nH}} + \text{Témoin}$$

où nH est le nombre de Hill qui caractérise la pente de la relation dose-réponse au point d'inflexion et CE₅₀ la concentration d'effet médian. Deux autres paramètres sont à définir, l'effet hypothéqué à une concentration infinie (Effet ∞) et l'effet observé à une concentration nulle (Témoin).

La modélisation des données de toxicité obtenues dans cette étude sera effectuée à partir du programme Regtox 6 (macro pour Excel) développé par Vindimian *et al.* (1983). Ce programme est basé sur un algorithme rapide (Marquardt, 1963) de recherche de solution optimale par itérations successives (régression non linéaire), qui intègre le modèle de Hill et permet d'estimer les paramètres initiaux ainsi que les concentrations d'effet (nombre de Hill, CE₅ à CE₅₀, effet nul et maximum). Les intervalles de confiance à 95 et 99% de chacun des paramètres seront estimés par une méthode «bootstrap» (500 simulations type «Monte Carlo») entièrement non paramétrique. Les concentrations d'effet ont été calculées à partir de 3 à 6 valeurs de fluorescence pour chacun des échantillons environnementaux et de leur dilution et au maximum 12 pour les témoins (milieu de culture + algues).

MATERIEL & METHODES

SITES D'ETUDE

Les chapitres suivants seront consacrés à une présentation des stratégies d'échantillonnage et des méthodologies d'analyses spécifiques à chacun des suivis expérimentaux étudiés. La description du contexte, des pratiques agricoles et des principales caractéristiques des sites d'étude est présentée en annexe 1.

I- Suivi expérimental en Camargue

En Camargue, la riziculture méditerranéenne est une agriculture intensive associée à une utilisation fréquente et répétée de différents produits phytosanitaires. De par la gestion hydraulique nécessaire pour optimiser la production rizicole (annexe 1-I), ces produits sont susceptibles de se retrouver à l'état de traces dans les étangs et fleuves récepteurs via les eaux d'irrigation et de drainage. L'étude menée a pour objectif d'effectuer une évaluation de l'impact environnemental potentiel, des traitements phytosanitaires utilisés en riziculture camarguaise, sur les écosystèmes aquatiques récepteurs.

I-1 Échantillonnage

Une étude de faisabilité permettant d'effectuer une première évaluation de l'impact des traitements phytosanitaires, utilisés en riziculture, sur la qualité des eaux issues des rizières, a été menée en 2001. Elle a été conduite sur des prélèvements d'eaux de surface provenant de **trois canaux de drainage** issus de trois bassins versants– Fumemorte (F), Grand-Mar (GM) et Albaron (Al) ainsi que sur les eaux du **Rhône** en amont (Rh - captage des eaux d'irrigation) pour trois dates de prélèvement choisies en fonction des interventions phytosanitaires (9 mai, 11 juin et 7 août). Les résultats obtenus nous ont amené à prolonger l'étude. **Deux rizières** Berthe (B) et Agon (Ag) à mode d'exploitation différent (biologique et non biologique) sont venues s'ajouter aux points de prélèvements existants. La cadence des prélèvements a été modifiée. Le tableau suivant (**II-6**) récapitule les dates des prélèvements et présente la nomenclature adoptée pour caractériser les échantillons étudiés en 2002.

	Albaron	Grand-Mar	Fumemorte	Rhône	Agon	Berthe
17-mai	AI1	GM1	F1	Rh1	Ag1	B1
24-mai					Ag2	
31-mai	AI2	GM2	F2	Rh2	Ag3	
04-juin						B2
11-juin					Ag4	
14-juin	AI3	GM3	F3	Rh3	Ag5	
17-juin						B3
25-juin						B4
28-juin	AI4		F4-F5	Rh4	Ag6	
05-juil					Ag7	
08-juil						B5
12-juil	AI5	GM4	F6	Rh5	Ag8	
16-juil						B6
19-juil					Ag9	
23-juil						B7
25-juil					Ag10	
26-juil	AI6	GM5	F7			
29-juil						B8
08-août		GM6		Rh6		
09-août	AI7		F8		Ag11	
12-août						B9
23-août	AI8	GM7	F9	Rh7	Ag12	
26-août						B10
30-août					Ag13	

Tableau II-6: Dates des prélèvements et nomenclature employée pour les échantillons étudiés en 2002.

Les différentes étapes qui nous ont permis de faire une première évaluation de l'impact des traitements phytosanitaires, utilisés en riziculture, sur la qualité des eaux sont les suivantes:

- Recherche de résidus de produits phytosanitaires.
- Analyse des principaux métaux et métalloïdes.
- Étude de la toxicité des eaux (bioessais sur algues).

I-2 Produits phytosanitaires recherchés

Compte tenu des pratiques culturales inhérentes à la riziculture, notre choix s'est arrêté sur trois herbicides employés dans la lutte contre le développement des adventices: *l'Oxadiazon*, le *Prétilachlore* et *l'Azimsulfuron* ainsi que sur deux insecticides: *le Fipronil* et *l'Alphacyperméthrine*. Le tableau suivant (**II-7**) regroupe les principales caractéristiques des produits étudiés ainsi que des précisions concernant leur emploi et les périodes d'application sur le site d'étude. Les caractéristiques propres à chacune des molécules ont été détaillées dans le chapitre bibliographique et présentées dans les tableaux **I-2 à 6**.

Produits étudiés	Emploi et cibles	Périodes d'application	Pureté %	Structure	Poids Moléculaire g/mole
Oxadiazon	Herbicide de pré-émergence	15 Avril - 30 Avril	>99	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₃	345,23
Prétilachlore	Herbicide de post-émergence	15 Avril - 15 Mai	96	C ₁₇ H ₂₆ ClNO ₂	311,9
Azimsulfuron	Herbicide de post-émergence	15 Mai - 15 Juin	99,7	C ₁₃ H ₁₆ N ₁₀ O ₅ S	424,4
Fipronil	Insecticide (larves de chironomes)	15 Avril - 15 Mai	99,9	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	437,14
Alphacyperméthrine*	Insecticide (pyrales)	20 Juillet - 15 Août	99	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	416,3

* Traitement non systématique

Tableau II-7: Caractéristiques générales et périodes d'application en riziculture camarguaise des produits phytosanitaires étudiés.

I-3 Analyses des métaux et biotests sur algues

L'analyse des métaux a été conduite pour aider à l'interprétation des résultats de toxicité. Les algues étant des indicateurs très sensibles à la pollution métallique, il nous a semblé judicieux de faire un inventaire des métaux retrouvés dans les eaux des trois canaux de drainage, du Rhône et des rizières et d'en mesurer les concentrations qui seront confrontées aux CE₅₀ de référence des métaux testés et aux réponses toxiques mesurées sur les eaux recueillies. La présence d'impuretés métalliques dans les différents engrais inorganiques mises en évidence par Gimeno-Garcia *et al.* (1996) et l'usage de métallos-pesticides en riziculture justifient également les analyses de métaux.

II- Suivi expérimental du dispositif Solepur

L'objectif de l'étude menée sur ce site est d'évaluer le transfert du cuivre et du zinc accumulés dans le sol vers les eaux de drainage et d'estimer la contamination des eaux de drainage par ces métaux issus d'épandages massifs et répétés de lisiers de porcs en s'attachant à la fois aux quantités et teneurs mises en jeu ainsi qu'à la spéciation du cuivre et du zinc dans la phase dissoute. La présentation détaillée de l'infrastructure et des principales données acquises depuis la mise en fonctionnement du pilote Solepur ainsi que l'origine des apports en cuivre et zinc par les lisiers sont présentées en annexe **1-II**.

II-1 Échantillonnage

Les eaux de drainage issues de la parcelle TR ont été prélevées entre 2000 et 2002 par le dispositif présenté en annexe **1-II**. L'étude a été menée lors de deux saisons de drainage contrastées caractérisées par un drainage cumulé de 610 mm (saison 2000-2001 particulièrement pluvieuse) et de 140 mm (en 2001-2002, saison très sèche), au lieu de 300-400 mm pour une année moyenne (Martinez et Peu, 1999) (Figure **II-5**). L'étude de ces deux années de drainage va permettre de connaître l'évolution actuelle des flux après l'arrêt des épandages en 1996. Les analyses ont porté sur une séquence de 14 échantillons composites représentatifs de la lame d'eau écoulee (obtenus entre le 28 octobre 2000 et le 8 janvier 2001) et de 5 échantillons composites (obtenus entre le 24 janvier et le 18 mars 2002) (Tableau **II-8**) prélevés par le Cemagref de Rennes pour un volume d'eau drainée variant de 37,5 à 105,4 m³ et un nombre de jours de récupération variable (1 à 18 jours) reporté sur le graphique (Figure **II-6**).

Saison de drainage 2000-2001														
Périodes de prélèvement du	28/10/00	02/11/00	06/11/00	08/11/00	13/11/00	21/11/00	26/11/00	05/12/00	09/12/00	12/12/00	13/12/00	16/12/00	02/01/01	05/01/01
au	01/11/00	05/11/00	07/11/00	12/11/00	20/11/00	25/11/00	04/12/00	08/12/00	11/12/00		15/12/00	01/01/01	04/01/01	08/01/01
Nomenclature	ED1	ED2	ED3	ED4	ED5	ED6	ED7	ED8	ED9	ED10	ED11	ED12	ED13	ED14

Saison de drainage 2001-2002					
Périodes de prélèvement du	24/01/02	31/01/02	08/02/02	23/02/02	01/03/02
au	30/01/12	07/02/02	17/02/02	28/02/02	18/03/02
Nomenclature	ED'1	ED'2	ED'3	ED'4	ED'5

Tableau II-8: Périodes de prélèvements et nomenclature employée pour l'échantillonnage des eaux de drainage lors des deux saisons de drainage étudiées.

En parallèle, une collecte d'eaux de drainage a été effectuée *in situ* sur les parcelles **TR** et **TE** du dispositif Solepur en janvier 2001 et 2002 pour pallier à l'évolution des échantillons relative aux modes de conservation, de stockage et d'envoi des échantillons composites de Rennes à Montpellier.

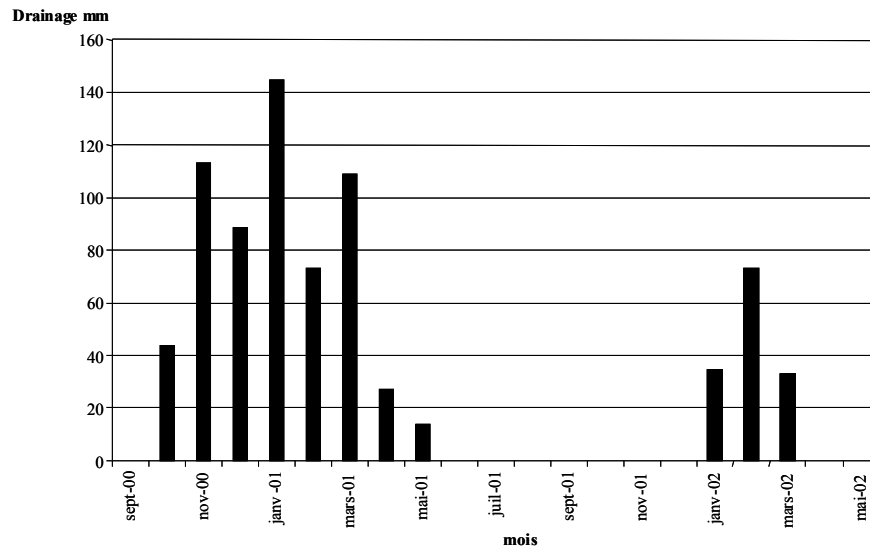


Figure II-5: Quantités d'eau drainée mensuellement dans la parcelle traitée au cours des deux années d'expérimentation (septembre 2000 à mai 2002).

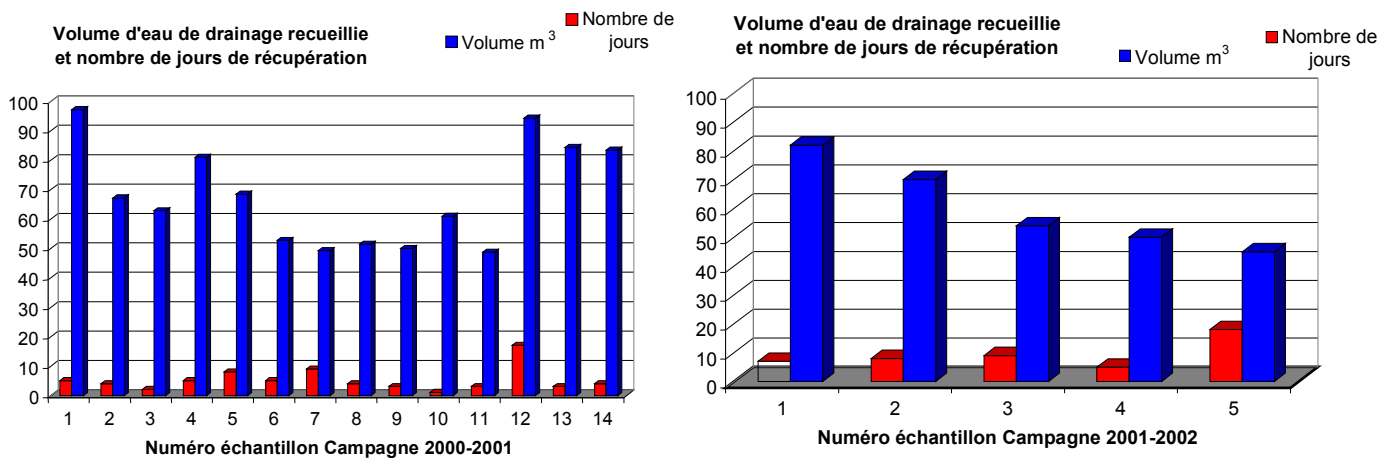


Figure II-6: Nombres de jours de récupération et volume d'eau de drainage recueilli dans la parcelle traitée au cours des deux années d'expérimentation (périodes du 28 octobre 2000 au 8 janvier 2001 et du 24 janvier au 18 mars 2002).

La contamination des eaux superficielles peut se faire via des écoulements à la surface du sol (ruissellement et érosion) mais aussi par des phénomènes de transfert hypodermique dans l'épaisseur de l'horizon superficiel. De ce fait, la caractérisation de solutions de sol obtenues à partir de sol sec des différents horizons (0-20, 20-40 et 40-60 cm) mérite d'être également effectuée. La caractérisation a été menée sur des échantillons de sol sec prélevés sur la parcelle traitée en 1996 (arrêt des épandages) et en 1999. L'étude des extraits de sol va permettre de travailler sur des solutions plus concentrées que les eaux de drainage.

II-2 Détermination des conditions d'extraction des solutions de sol

L'obtention des extraits de sol a fait l'objet d'une mise au point préliminaire, effectuée sur un échantillon composite de sol prélevé en 1999 sur TR et préalablement tamisé à 65 μm , qui a permis de retenir des conditions d'extraction optimales. En se référant aux travaux de Mahammedi (2001), trois durées d'extraction sous agitation ont été testées: 5, 10 et 20 minutes pour deux temps de centrifugation (1 et 6 minutes). L'extraction a été réalisée avec une solution de nitrate de potassium, également utilisé en polarographie comme électrolyte-support, à deux concentrations 0,005 et 0,01M qui ne modifient pas la force ionique. Compte tenu des résultats obtenus pour les différents essais effectués (Tableau II-9), les conditions d'extraction suivantes ont été retenues: temps de contact et d'agitation de 20 minutes entre 10 ml de solution de KNO_3 (0,005 M) et 5 g de sol - centrifugation 1 minute à 5000 tr/min. Ces conditions permettent une extraction optimale aussi bien du cuivre que du zinc. Ces métaux sont analysés sur l'échantillon préalablement filtré à 0,2 μm dès la fin de la centrifugation et acidifié à raison de 0,5% (HNO_3 , suprapur) par spectrométrie d'absorption atomique à four ($\lambda = 324,5 \text{ nm}$ pour le cuivre et $\lambda = 307,6 \text{ nm}$ pour le zinc).

Durée d'agitation	Durée de centrifugation	KNO_3	[Cu]	[Zn]
	mn	M	$\mu\text{g/l}$	
5	1	0,005	$33,3 \pm 0,14$	$96,4 \pm 7,2$
10	1	0,005	$35,5 \pm 0,4$	$101,9 \pm 4,2$
20	1	0,005	$43,9 \pm 0,5$	$137,7 \pm 8,5$
10	6	0,005	$35,9 \pm 0,4$	$109,6 \pm 3,5$
20	6	0,005	$35,9 \pm 1,3$	$105,2 \pm 9,9$
5	1	0,01	$30,4 \pm 0,9$	$194,2 \pm 6,7$
10	1	0,01	$31,0 \pm 0,0$	$191,6 \pm 2,3$
20	1	0,01	$33,8 \pm 1,1$	$198,6 \pm 6,3$

Tableau II-9: Concentrations totales en cuivre et zinc ($\mu\text{g/l}$) obtenues en testant différentes conditions d'extraction (*durée d'agitation et de centrifugation, concentration en KNO_3 - n = 2*).

II-3 Analyses des échantillons

Une caractérisation physico-chimique complète (détaillée dans le chapitre Méthodologies) sera effectuée sur l'ensemble des échantillons collectés (eaux de drainage issues des parcelles TE et TR prélevées *in situ* et lors des deux suivis annuels, solutions de sol). Préalablement aux analyses, les eaux de drainage seront filtrées sur 0,45 μm , et les extraits de sol sur 0,2 μm . Les ions seront dosés par chromatographie ionique (Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-}), par spectrométrie d'absorption atomique (Mg^{2+} , Ca^{2+}), d'émission de flamme (K^+ , Na^+). La quantification des éléments traces sera obtenue par ICP-MS (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry) et/ou absorption atomique. La spéciation du cuivre et du zinc sera étudiée sur les eaux issues des parcelles TR et TE et sur les solutions de sol afin de définir les formes chimiques prises par le cuivre et le zinc et d'évaluer leur biodisponibilité. Elle sera réalisée par redissolution anodique sur goutte de mercure pendante (Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry DPASV en mode HMDE). En parallèle de la spéciation chimique, l'impact potentiel de ces métaux en terme de biodisponibilité voire de toxicité sera évalué sur un organisme aquatique

Pseudokirchneriella subcapitata anciennement *Selenastrum capricornutum* à partir des mêmes échantillons que ceux étudiés en analyse de spéciation. L'objectif est d'étudier la relation possible entre la forme chimique du cuivre et du zinc, déterminée par l'analyse de spéciation (DPASV), et leur toxicité vis-à-vis d'une algue aquatique d'eau douce sensible aux contaminants métalliques, en tenant compte de l'influence de 'ligands' naturels.

III- Suivi expérimental du bassin versant viticole de Roujan

Le bassin viticole de Roujan est fortement équipé tant du point de vue des suivis hydrologiques que de celui de la qualité des eaux. Les chroniques sont acquises pour les flux d'eau depuis 1992 et pour la qualité de l'eau depuis 1995 par l'INRA de Montpellier. Les caractéristiques générales du bassin ainsi qu'une présentation des pratiques culturales employées sur cette zone sont détaillées en annexe **1-III**.

III-1 Choix des parcelles et caractéristiques du sol

Sur le bassin de Roujan, les sols sont principalement de type carbonaté, seules quelques zones présentes sur le plateau sont acides. Parmi les 244 parcelles que comptent le bassin viticole de Roujan, deux parcelles ont été sélectionnées et étudiées (Figure **II-7**). Sur ces deux parcelles, des prélèvements de sol ont été réalisés par l'INRA de Montpellier au niveau des horizons 0-2, 2-15 et 15-30 cm et ont été analysés après séchage à l'air libre et tamisage à 2 mm. Les analyses ont été effectuées par le laboratoire d'analyses des sols d'Arras conformément aux méthodes standardisées françaises (AFNOR, 1999 ; ISO, 1999) et les résultats sont compilés dans la thèse de V. Chaignon (2001).

- Après décarbonatation, un fractionnement granulométrique est effectué sur les **échantillons de sols secs** selon la norme NF X 31-107,
- Le pH eau du sol est mesuré, dans un rapport sol/solution de 1/2,5 dans de l'eau déminéralisée (NF X 31-117),
- Le taux de carbone organique est déterminé par oxydation sulfochromique (NF ISO 10694, Méthode Anne),
- Le calcaire total (CaCO_3) est mesuré par attaque à l'acide chlorhydrique (NF X 31-105),
- La capacité d'échange cationique (CEC) est mesurée par échange par percolation à l'acétate d'ammonium ainsi que les cations échangeables Ca, Na, Mg, K (NF X 31-130, Méthode Metson),
- Les concentrations en Cu, Zn, K, P totales sont mesurées en spectroscopie d'émission plasma (ICP-AES) après attaque aux acides fluorhydrique et perchlorique des échantillons solides (méthode HF, NF X 31-147),
- Les oxydes de fer sont déterminés suivants les méthodes Mehra-Jackson et Tamm à l'obscurité et les oxydes de Mn le sont suivant la méthode Deb (Baize, 2000b),
- Le Cu et le Zn sont extraits par l'EDTA selon la norme NF X 31-120.

Notre choix s'est arrêté sur deux parcelles qui possèdent un sol différent, les principales différences résidant dans le caractère plus acide de l'une (Parcelle 122 dite **parcelle à sol 'acide'** notée NC par la suite) alors que l'autre est plus riche en calcaire (Parcelle AW6 nommée **parcelle à sol carbonaté** notée C). Ces caractéristiques contrastées auront sans doute une influence sur la nature des matières en suspension et sur la spéciation du cuivre dans les sols et les eaux de ruissellement. Les résultats issus de ces deux parcelles sont présentés dans les tableaux **II-10 A et B**.

III-2 Échantillonnage

Les deux parcelles individualisées (NC et C) qui constituent la base expérimentale de cette étude et dont le type de sol diffère, ont été équipées de capteurs et de préleveurs pour recueillir les eaux de ruissellement.

Un dispositif expérimental est installé sur la parcelle à sol carbonaté instrumentée et étudiée par l'INRA Sciences du Sol de Montpellier. Il permet un échantillonnage automatique de chacune des crues de façon à obtenir une série de prélèvements en fonction du débit de ruissellement. Les eaux de ruissellement sont concentrées en bout de parcelle dans un canal jaugeur de type *Venturi*, permettant le calcul du débit à partir d'une hauteur d'eau mesurée dans le canal. La mesure est réalisée par deux systèmes distincts: un capteur de pression reliant la pression de l'eau dans le canal à la hauteur d'eau couplé à des nilomètres (*SEROSI*, précision 5 mm). La fréquence est de une mesure par minute moyennée sur dix minutes en cas d'écoulement faible. Deux types de prélèvements ont été effectués:

[1] - Échantillonnage de la totalité de la crue: deux préleveurs d'échantillons (*Sigma 800*: 24 échantillons de 330 ml) sont programmés pour déclencher le prélèvement automatique dès le début du ruissellement. Deux types de préleveurs existent, l'un est déclenché par la centrale en fonction des variations de débit, l'autre appareil prélève régulièrement jusqu'à la fin du ruissellement à raison d'un prélèvement toutes les trente minutes. Ce système permet d'échantillonner tout type de crue (les plus longues aussi bien que les courtes et intenses). Les prélèvements s'effectuent par pompage direct du flux de ruissellement dans le canal *Venturi*. Le prélèvement automatique des échantillons provient du besoin de couvrir la totalité de la crue (montée des eaux, pic de crue, de décroissance) pour l'étude des flux de produits phytosanitaires dans les eaux de ruissellement. Le type de mesure permet de connaître l'évolution des concentrations en fonction de la quantité d'eau ruisselée.

[2] - Parallèlement, si tous les flacons sont remplis avant la fin de la crue, un système de partition et de stockage des eaux de ruissellement existe en aval du canal *Venturi* pour permettre une estimation du débit écoulé et pour recueillir un mélange moyen d'eau de ruissellement.

Sur cette parcelle, un système de transmission de données en téléphone *GSM* permet de connaître en temps réel l'évolution de la crue par une liaison par modem (*SIEMENS MI*) de la centrale d'acquisition de données au laboratoire. Le nettoyage du canal, la récupération des échantillons et des données relatives à la crue sont effectués suite à chaque événement pluvial. D'autre part, un dispositif de prélèvement ponctuel a été mis en place sur la parcelle NC initialement non instrumentée par l'INRA de Montpellier. Le ruissellement de la totalité de la

parcelle ne peut pas être collecté par ce dispositif, seul le ruissellement sur un inter-rang le sera. Ce système mobile (création de P. Andrieux) possède deux partiteurs de 20 litres qui récoltent les eaux provenant du ruissellement après passage dans un collecteur en PVC couvrant la surface d'inter-rang. Ce dispositif permettra de récolter des échantillons dans le but de comparer les caractéristiques des eaux de ruissellement prélevées jusqu'à présent sur la parcelle C.

III-3 Conditionnement et analyses des échantillons

Les échantillons provenant des préleveurs automatiques sont conditionnés, sur place, dans des flacons en polyéthylène, conditionnement recommandé pour l'analyse des métaux traces, préalablement nettoyés à l'acide nitrique (HNO_3 , 10%) après contact prolongé durant 24 heures, suivi de trois rinçages à l'eau milliQ (De Mora et Harrison, 1983).

La caractérisation physico-chimique des échantillons d'eaux de ruissellement recueillis sur les deux parcelles sera systématiquement effectuée (mesures du pH, de la conductivité, de l'alcalinité, COD). Les anions et cations majeurs seront dosés par électrophorèse capillaire, les concentrations en métaux totaux par ICP-MS. L'analyse de spéciation du cuivre sera réalisée par DPASV (mode HMDE) et permettra de mettre ou non en évidence la présence des ions métalliques libres et/ou des formes métalliques provenant de la dissociation des complexes ou des colloïdes préalablement électrodéposés dans l'électrode de mercure. Toutes les techniques utilisées ont été détaillées dans le chapitre Méthodologies.

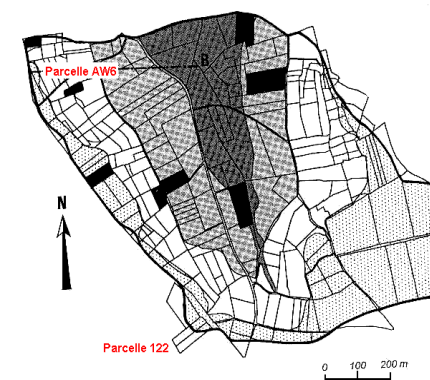
Sites d'étude

A	Horizons	Extractions												
		Deb	Tamm	Merha	Acétate d'ammonium			EDTA		HF				
		Mn	Fe		Ca	Na	Mg	K	Cu	Zn	K	P	Cu	Zn
		cm	g/kg		cmol/kg			µg/g		mg/g			µg/g	
Parcelle 122														
n=3	0-2	0,13 ± 0,01	1,4 ± 0,3	16,7 ± 1,5	2,9 ± 1,2	0,06 ± 0,03	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,6	40,1 ± 14,6	1,5 ± 0,5	9,7 ± 2,1	1,9 ± 0,8	127,3 ± 46,5	41,3 ± 3,05
n=1	2-15	0,26	1,2	19	4,3	0,05	0,7	0,7	56	2,3	11	1,1	157	49
n=1	15-30	0,2	1,2	18	2,6	0,05	0,6	0,7	43	3,1	12	0,7	117	46
Parcelle AW6														
n=3	0-2	0,56 ± 0,01	0,6 ± 0,06	7,03 ± 0,8	37,3 ± 2,1	0,10 ± 0,08	1,4 ± 0,5	0,6 ± 0,2	32 ± 11,8	4,6 ± 4,6	15 ± 1	2,4 ± 0,56	97,3 ± 24,2	59,7 ± 10,4
n=3	2-15	0,56 ± 0,03	0,6 ± 0,0	7,8 ± 0,8	39 ± 1	0,17 ± 0,19	1,5 ± 0,7	0,4 ± 0,15	37,3 ± 14,6	1,7 ± 0,95	15,7 ± 1,5	1,9 ± 0,3	109,3 ± 36,0	61,3 ± 8,1
n=3	15-30	0,56 ± 0,04	0,6 ± 0,0	8,0 ± 0,7	40,3 ± 1,15	0,37 ± 0,48	1,9 ± 1,1	0,3 ± 0,1	20,3 ± 6,35	1,0 ± 0,35	15,0 ± 1,7	1,6 ± 0,15	62,7 ± 12,1	58,3 ± 6,5

Tableaux II-10 A et B: Principales caractéristiques physico-chimiques des horizons 0-2, 2-15 et 15-30 cm des échantillons de sols prélevés sur les deux parcelles sélectionnées (d'après Chaignon, 2001)

Figure II-7: Localisation des deux parcelles échantillonnées (AW6 et 122) sur le Bassin Versant de Roujan (d'après Andrieux *et al.*, 1993)

B	Horizons	Humidité à 105°C	pH eau	Granulométrie		C-org	N-org	CaCO ₃	CEC
				Argile (<2µm)	Sable (500-2000µm)				
				cm	%				
Parcelle 122									
n=3	0-2	17,7 ± 3,8	5,4 ± 1	135,7 ± 59,5	713,3 ± 165,7	11,1 ± 1,6	1,07 ± 0,46	0	6,6 ± 1,6
n=1	2-15	42	5	213	581	8,1	0,8	0	8,6
n=1	15-30	62	4,3	263	485	4,4	0,45	<2	8,7
Parcelle AW6									
n=3	0-2	15,3 ± 5,5	8,5 ± 0,06	169,0 ± 45,5	216,0 ± 98,2	8,6 ± 2,95	0,86 ± 0,30	270 ± 7	7,7 ± 2,2
n=3	2-15	25,7 ± 9,9	8,7 ± 0,06	189,3 ± 29,7	172,3 ± 68,9	7,5 ± 2,95	0,78 ± 0,25	286,0 ± 18,4	9,0 ± 1,1
n=3	15-30	19,7 ± 4,7	8,7 ± 0,06	200,7 ± 17,2	163,0 ± 60,6	4,4 ± 0,5	0,51 ± 0,08	292,3 ± 17,0	8,8 ± 0,5



Le travail déjà effectué sur les parcelles viticoles (Gilbin, 2002) a permis de passer de l'échelle de la parcelle à celle du bassin versant récepteur (Bassin de la rivière la Peyne, affluent de la rive droite de l'Hérault). Le bassin versant de la Peyne dans son ensemble a fait l'objet de travaux d'étude hydrologique depuis 1991. Il a été choisi pour sa représentativité des conditions pédologiques, d'occupation du sol et hydrologiques des agrosystèmes et des écosystèmes de la plaine languedocienne. Ces principales caractéristiques sont répertoriées en annexe 1-IV.

IV- Suivi expérimental du bassin de La Peyne

Notre étude se focalise essentiellement sur la partie basse du versant et sur la rivière La Peyne exclusivement. L'échantillonnage sera mené en période d'étiage ou de débit de base mais également en période de crues. On rappelle que le ruissellement de surface constitue, en terme de flux, l'apport principal de la Peyne en période de crues, par l'intermédiaire du réseau de fossés qui favorise l'entraînement de contaminants dissous et particulaires vers les écosystèmes aquatiques récepteurs.

IV-1 Échantillonnage,

En **étiage** ou **débit de base**, les prélèvements concernent **trois stations** localisées sur la figure II-8 (SNCF, D30 en amont et Montpezat en aval respectivement). Pour les **suivis de crues**, on a recueilli des échantillons uniquement, au niveau de la station aval (Montpezat), à partir d'un échantillonneur muni de flacons en plastique installé à la station le 9 janvier 02 et au niveau de l'exutoire du bassin versant de Roujan.

En 2001, deux campagnes d'échantillonnage ont été effectuées, une en période d'étiage (10 juillet 01) et un suivi de crue (20 octobre 01). Les échantillons d'étiage ont été prélevés à la main, les échantillons de crue ont été prélevés par échantillonnage automatique.

En 2002-2003, douze campagnes d'échantillonnage ont été effectuées, deux suivis de crue (9-10 octobre 02 et 27-28 février 03) et dix en période d'étiage (le 18 juin, 10 juillet, 12 août, 16 septembre, 15 octobre et 26 novembre 02 (données métaux manquantes) ainsi que le 21 janvier, 02 avril, 05 mai et 03 juin 03).

IV-2 Analyses chimiques et biologiques

Les éléments majeurs (HCO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+) et les éléments traces (Li, B, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Cs, Ba, Pb, U) ont été systématiquement mesurés dans la phase dissoute ($<0,02 \mu\text{m}$). Les analyses ont été réalisées au laboratoire d'Hydrosciences (MSE) par électrophorèse capillaire (majeurs), ICP-MS (traces) et GFAAS (Fe).

L'étude du potentiel toxique de la phase dissoute pour l'algue aquatique d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* a été conduite à l'aide du biotest standardisé mis en œuvre au laboratoire en conditions contrôlées: test d'inhibition de la croissance en microplaque 96 puits (72 heures à $24 \pm 1^\circ\text{C}$ en agitation et illumination (5000 à 6000 lux) en continu) (US. EPA,

1989). Les paramètres de suivi de l'effet choisis pour cette étude sont la mesure de la fluorescence à 488/685nm (détermination indirecte de l'activité photosynthétique) et de l'activité estérasiqque à 485/530nm (lecteur *Spextramax Gemini XS* (*Molecular Devices*)).

En plus des campagnes d'échantillonnage analysées conjointement avec le laboratoire Hydrosiences de la MSE (caractérisation physico-chimique complète et analyses des traces), les biotests ont été menés sur cinq échantillons moyens résultants des crues de décembre 02 et janvier 03 (le 10, 11, 12 et 14 décembre et le 6 janvier) prélevés à Montpezat ainsi que sur quatre échantillons moyens collectés à l'exutoire du bassin versant (le 9 octobre, le 10 et 20 décembre 02 et le 27 février 03).

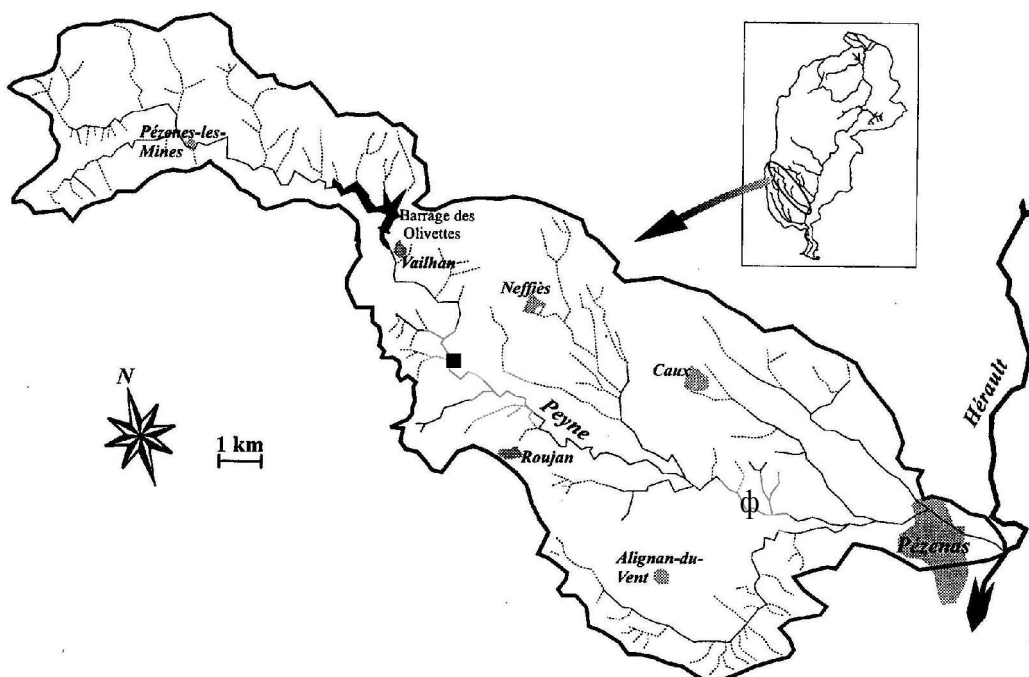


Figure II-8: Présentation générale et localisation des points de prélèvements sur la Peyne: ■ Station SNCF ; ♦ Station D30 ; Φ Station Montpezat.

RESULTATS

RESULTATS

BIOTESTS EN CONDITIONS CONTROLEES

Des biotests préliminaires à l'étude d'échantillons environnementaux ont été conduits, en conditions contrôlées, sur des solutions standards de cuivre, de zinc, des différentes formes d'arsenic et sur les substances organiques pures des produits phytosanitaires recherchés de façon à obtenir des 72h-CE₅₀ de référence (CE_{50R}) estimées à partir de courbes dose-réponse (Programme Regtox 6).

I- Mesure de l'inhibition de la croissance par fluorescence

I-1 Étude de l'inhibition de la croissance de *Pseudokirchneriella subcapitata* à partir de solutions standards de métaux et métalloïdes

I-1-1 Effet du cuivre

I-1-1-1 Variabilités intra et inter-laboratoires: exemple de l'estimation de la 72h-CE₅₀ de référence du cuivre

La variabilité des réponses inter-laboratoires a été testée sur deux appareils de même marque (*SpectraMAX Gemini XS Molecular Devices*) mais utilisés dans des laboratoires différents, l'un fait partie de l'équipement du laboratoire de l'Institut Forel (Suisse), l'autre est utilisé au Département Sciences de l'Environnement et Santé Publique (DSESP-Montpellier). Chaque test a été mené sur les mêmes gammes de concentrations (Tableau **III-1**), le test noté 1 a été effectué au laboratoire DSESP, le second à l'Institut Forel.

Pour l'ensemble des tests effectués, les concentrations les plus élevées sont préparées à partir d'une solution fille (0,1 g Cu/l) obtenue à partir d'une solution standard de cuivre à 1 g Cu/l (CuSO₄·5H₂O, *Merck*, ultrapur). Toutes les dilutions sont effectuées dans de l'eau MilliQ. Les dilutions séquentielles (1/2) sont ensuite effectuées directement dans la plaque par dilutions successives dans le milieu de culture AAPm+Fe.

Le programme Regtox qui permet d'estimer les valeurs de CE₅₀ a été utilisé en intégrant les valeurs moyennes de fluorescence (n = 6 pour les différentes concentrations et n = 12 pour le témoin (milieu de culture + algues)). Les pourcentages d'inhibition de la croissance mesurés expérimentalement et obtenus en réponse aux concentrations testées ainsi que les valeurs des CE₅₀ estimées (intervalle de confiance p = 0,05) pour les deux tests sont présentés dans le tableau suivant (**III-1**).

Test 1		Test 2			
Concentrations	Inhibition	Concentrations	Inhibition		
µg/l	%	µg/l	%		
3,125	24	3,125	1		
6,25	66	6,25	10		
12,5	84	12,5	57		
25	97	25	80		
50	99	50	99		
100	99	100	100		
200	99	200	100		
CE ₅₀ estimée					
µg/l	4,9	(4,5 - 5,4)	µg/l	12,2	(11,3 - 13,8)
µM	0,077	(0,071 - 0,085)	µM	0,192	(0,178 - 0,217)

Tableau III-1: Étude de la variabilité inter-laboratoire en fonction du matériel utilisé respectivement au DSESP (*test 1*) et à l’Institut Forel (*test 2*) à partir d’une solution standard de cuivre.

Pour une même gamme de concentrations en cuivre, la CE₅₀ est plus que doublée lors du test effectué en Suisse. L’appareil utilisé à l’Institut Forel semble posséder une sensibilité plus faible que celui du laboratoire DSESP, de plus les conditions opératoires (inoculum provenant de repiquages différents par exemple) peuvent expliquer cette différence significative (Mayer *et al.*, 1997).

La variabilité des réponses intra-laboratoires a également été testée en fonction des gammes de concentrations choisies et répertoriées dans le tableau (III-2). Le test 1 permet d’effectuer un premier screening en utilisant une gamme de concentrations assez large. Pour le test 3, on restreint la gamme des concentrations en fonction des résultats obtenus lors du premier test.

Test 1		Test 3			
Concentrations	Inhibition	Concentrations	Inhibition		
µg/l	%	µg/l	%		
3,125	24	0,625	-7		
6,25	66	1,25	3		
12,5	84	2,5	6		
25	97	5	39		
50	99	10	73		
100	99	20	97		
200	99	40	99		
CE ₅₀ estimée					
µg/l	4,9	(4,5 - 5,4)	µg/l	6,1	(5,3 - 6,9)
µM	0,077	(0,071 - 0,085)	µM	0,096	(0,083 - 0,109)

Tableau III-2: Étude de la variabilité intra-laboratoire en fonction des gammes de concentrations en cuivre testées.

Pour le premier test, la croissance algale est totalement inhibée pour des concentrations supérieures ou égales à 25 µg Cu/l et seule la plus faible concentration testée (3,125 µg Cu/l) nous donne un pourcentage d'inhibition inférieur à 50%. Le deuxième test (Test 3) a donc été conduit en tenant compte des résultats obtenus lors du test 1 et en choisissant une gamme de concentrations plus restreinte de façon à obtenir un éventail de pourcentages d'inhibition plus large et dispersé autour de la valeur de référence de 50%. On obtient une valeur moyenne de 72h-CE_{50R} du cuivre de 4,9 et 6,1 µg Cu/l (soit 0,077 et 0,096 µM) respectivement pour les tests 1 et 3. Dans ce cas, le test de screening sous estime la valeur de la 72h-CE₅₀ de référence du cuivre.

La réponse des bioessais est influencée par des facteurs liés à la **procédure**: lumière, température, source d'azote et pH (Mayer *et al.*, 1997), densité cellulaire de l'inoculum initial (Vasseur *et al.*, 1988 ; Franklin *et al.*, 2002), à la **nature du milieu de culture** (Heijerick *et al.*, 2001), aux **indicateurs d'effet** choisis (inhibition de la croissance mesurée par fluorescence, inhibition d'une activité enzymatique) et à la **spécificité des équipements** disponibles dans les laboratoires. Ceci rend, par ailleurs, difficile la comparaison avec les données de la littérature.

I-1-1-2 Obtention d'une courbe dose-réponse: exemple du cuivre

La totalité de la courbe dose-réponse est difficile à obtenir en microplaques sur un même essai. De ce fait, le programme Regtox qui permet d'estimer les CE 50, 25, 20, 15, 10 et 5 en extrapolant les valeurs obtenues expérimentalement sur les concentrations testées sera utilisé, en complément des essais expérimentaux, pour finaliser l'obtention de la courbe dose-réponse de chacun des éléments testés.

Dans cet exemple, la matrice Regtox est utilisée à partir des valeurs moyennes (n=6) de fluorescence exprimées en Unités Relatives de Fluorescence (RFU) obtenues sur les concentrations en cuivre suivantes 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 et 0,625 µg/l de cuivre (se référer aux données du test 3, tableau III-2). Les résultats compilés dans le tableau III-3 permettent d'obtenir une courbe dose-réponse complète (Figure III-1) en intégrant les valeurs estimées par le logiciel Regtox (Tableau III-3) et les valeurs obtenues expérimentalement à partir des concentrations testées (Tableau III-2).

	Optimal	Average	Médian	< alpha =5	> alpha =5	< alpha =1	> alpha =1
Control (RFU)	263,4	264,9	264,2	246,4	285,6	244,1	289,6
Hill number	2,7	2,7	2,7	2,0	3,5	1,8	3,7
EC estimée (µg/l)							
EC50	6,1	6,0	6,0	5,3	6,9	5,0	7,2
EC5	2,0	2,0	2,0	1,3	2,9	1,0	3,0
EC10	2,7	2,7	2,6	1,8	3,6	1,6	3,7
EC15	3,2	3,2	3,1	2,3	4,1	2,0	4,3
EC20	3,6	3,6	3,6	2,7	4,5	2,4	4,7
EC25	4,0	4,0	4,0	3,1	4,9	2,8	5,1

Tableau III-3: Estimation par le calcul (logiciel Regtox6) des valeurs de CE 5, 10, 15, 20, 25 et 50: Exemple du cuivre (*concentrations testées présentées dans le tableau III-2 – test 3*).

La superposition presque parfaite des deux courbes (Figure III-1: données expérimentales et valeurs calculées) valide l'utilisation de la matrice Regtox pour l'estimation des valeurs des CE de référence (5, 10, 15, 20, 25 et 50) qui ne sont pas systématiquement incluses dans les résultats expérimentaux en particulier les CE plus faibles (5, 10, 15) qui sont des données importantes de toxicité.

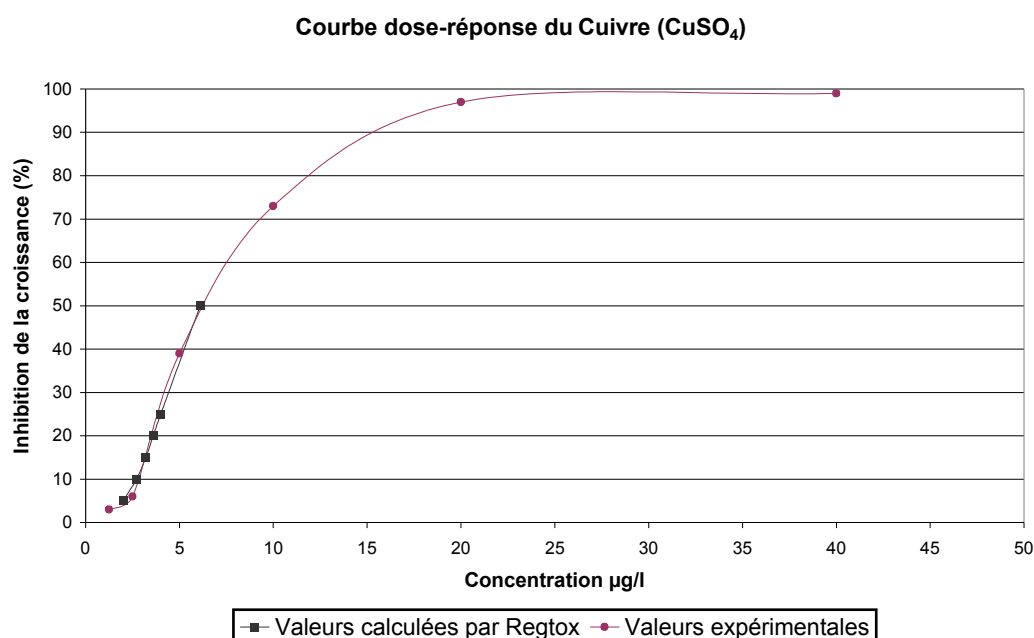


Figure III-1: Courbe dose-réponse du cuivre obtenue à partir des données expérimentales ● (Tableau III-2) et des valeurs calculées par le programme Regtox ■ (Tableau III-3)

En conclusion, pour cette étude la 72h-CE₅₀ de référence du cuivre est comprise entre **5,3 et 6,9 µg Cu/l (soit 0,08 et 0,11 µM** avec $p = 0,05$) avec une valeur moyenne de 6,1 µg Cu/l (soit 0,096 µM). Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles reportées par Franklin *et al.* en 2001(a) (8 ± 2 µg Cu/l, valeurs conformes aux résultats de Stauber, 1995), en 2001(b) (48h-CE₅₀ = 4,9 et 72h-CE₅₀ = 7,5 µg Cu/l) et en 2002 (CE₅₀ variant de 6,8 à 17 µg Cu/l en fonction de la densité cellulaire initiale 10^2 à 10^5 cell/ml et comprise entre 6,8 à 8,2 µg Cu/l pour une densité cellulaire de 10^4 cell/ml avec une valeur moyenne de 7,5 µg Cu/l). Quant à Vasseur *et al.* (1988), ils reportent une valeur de 10 µg Cu/l pour une densité cellulaire initiale de $2 \cdot 10^4$ cell/ml. Nos valeurs de référence se situent également dans l'intervalle (6 à 70 µg Cu/l) donné par Toussaint *et al.* (1995) après avoir compilé les résultats d'une série d'articles ($n = 6$) traitant des effets des métaux (Zn, Cu, Cd) et de certains produits organiques (phénol, malathion, 2,4D) sur *Pseudokirchneriella subcapitata* et d'autres indicateurs biologiques tels que *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* et *Pimephales promelas*. Elles sont par contre inférieures à celles reportées par Heijerick *et al.* en 2002 (13 à 22 µg Cu/l) en milieu de culture ISO (différent du milieu AAP).

I-1-2 Effet du zinc

Une démarche similaire a été conduite sur des solutions standards de zinc (1g Zn/l). Les études recensées dans la bibliographie ont été effectuées aussi bien sur des solutions standards de sulfate que de chlorure de zinc. Deux tests ont été effectués sur les deux solutions standards de zinc ZnSO₄·7H₂O (*Prolabo*, ultrapur) et ZnCl₂·H₂O (*Sygma*, ultrapur)) à des gammes de concentrations différentes pour le sulfate de zinc (Tests 1 et 2) (Tableau III-4 A) et à des concentrations identiques pour le chlorure de zinc pour vérifier la reproductibilité des essais pour des inoculums issus de repiquage différent (Tests' 1 et 2) (Tableau III-4 B).

A				B			
ZnSO ₄				ZnCl ₂			
Test 1		Test 2		Test' 1		Test' 2	
Concentrations µg/l	Inhibition %	Concentrations µg/l	Inhibition %	Concentrations µg/l	Inhibition %	Concentrations µg/l	Inhibition %
31,25	29	3,125	13	3,125	-25	3,125	1
62,5	40	6,25	10	6,25	-5	6,25	-4
125	78	12,5	32	12,5	7	12,5	22
250	90	25	46	25	37	25	39
500	97	50	58	50	69	50	55
1000	99	100	74	100	87	100	78
2000	99	200	85	200	96	200	85
CE ₅₀ estimée				CE ₅₀ estimée			
µg/l	67,2 (51,4 - 82,1)	32,6 (25,4 - 39,3)		32,9 (23,7 - 41,2)		43,7 (29 - 63,5)	
µM	1,03 (0,79 - 1,26)	0,50 (0,39 - 0,60)		0,50 (0,36 - 0,63)		0,67 (0,44 - 0,97)	

Tableaux III-4 A et B: Confirmation de la variabilité intra-laboratoire en fonction des gammes de concentrations en zinc testées (A). Comparaison des 72h-CE₅₀ du zinc respectivement pour les sels de sulfate (A) et de chlorure (B) de zinc. Étude de la reproductibilité des essais pour des inoculums issus de repiquages différents (B).

(Test d'inhibition de la croissance par fluorescence de *P. subcapitata*)

Le premier test effectué à partir d'une solution standard de ZnSO₄ a permis d'effectuer un premier screening sur une gamme de concentrations assez large. Il a permis de choisir une gamme de concentrations plus faible utilisée pour mener le deuxième test. Dans cet exemple et contrairement au cuivre, le screening amène à une sur-estimation de la CE_{50R} du zinc. Cette étape de screening s'avère être nécessaire pour choisir la gamme de concentrations optimale pour l'estimation des 72h-CE₅₀ de référence.

La seconde gamme de concentrations comprise entre 3,125 et 200 µg Zn/l sera utilisée pour mener la deuxième série de tests sur la solution standard de ZnCl₂. Les tests ('1 et '2) permettent de vérifier la reproductibilité des résultats suite à l'utilisation d'inoculum provenant de repiquages différents. Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de différence entre les deux tests '1 et '2 ce qui permet de valider le test de reproductibilité pour des inoculums différents.

En conclusion, la valeur moyenne pour la 72h-CE₅₀ du zinc sera prise égale à **36 ± 6 µg Zn/l (soit 0,6 ± 0,1 µM)** étant donné qu'il n'y a pas de différence entre les tests menés sur des solutions standards de ZnSO₄ et de ZnCl₂. Cette valeur se situe dans la fourchette répertoriée par Toussaint *et al.* (1995) qui donnent des valeurs comprises entre 30 et 70 µg Zn/l (n = 6)

avec une valeur médiane de 60 µg Zn/l dont celle de St-Laurent (1992) 96h-CE₅₀ de 52,6 µg Zn/l (31,9 – 72,7 µg Zn/l avec p = 0,05). Heijerick *et al.* (2002) obtiennent une valeur de 67,0 ± 12,4 µg Zn/l (72h-CE₅₀ - ZnCl₂ en milieu ISO), Franklin *et al.* (2001b) des valeurs de 39 (27-57) et 38 (30-49) µg Zn/l pour respectivement 48 et 72h d'incubation, Pardos *et al.* (1998) une valeur de 96-97 µg Zn/l (48h-CE₅₀) tandis qu'Errecalde *et al.* (1998) observent une inhibition totale de la croissance de *Pseudokirchneriella subcapitata* pour des concentrations en zinc supérieures à 91,5 µg Zn/l. L'étude menée par Muysen et Janssen (2001) donne des valeurs de référence qui évoluent en fonction de l'acclimatation des algues à des concentrations différentes en zinc, ces valeurs varient de 39 ± 12 à 117 ± 10 µg Zn/l pour une exposition de 100 jours à une concentration en zinc de 65 µg/l, soit une tolérance au zinc multipliée par un facteur 3.

I-1-3 Effet de l'arsenic

Les différentes formes d'arsenic – l'arsénite (AsIII), l'arséniate (AsV) et les formes méthylées (DMA diméthylarsinate et MMA monométhylarsonate) - ont été étudiées à partir de solutions standards à 1g As/l. L'arsenic V est obtenu à partir de l'acide arsénique (H₃AsO₄) et la forme III à partir du NaAsO₂ (99% d'As, PM = 129,91 g/mole). Le MMA et le DMA sont obtenus respectivement à partir de l'acide monométhylarsonique (98% d'As, PM = 292,07 g/mole) et de l'acide diméthylarsinique (>97% d'As, PM = 214,05 g/mole). Toutes les solutions de travail sont préparées dans de l'eau MilliQ, les dilutions sont quant à elle directement effectuées dans les puits contenant le milieu de culture (dilution ½).

Les CE₅₀, répertoriées dans le tableau (III-5), sont estimées par le programme Regtox à partir des valeurs moyennes de fluorescence obtenues pour les différentes concentrations (n=6) et pour le témoin (n=12) avec un intervalle de confiance de 95%. Les concentrations testées pour les solutions d'arsenic V et III ainsi que les pourcentages d'inhibition obtenus sont également présentés dans le tableau (III-5).

As V		As III		MMA		DMA	
Concentrations mg/l	Inhibition %	Concentrations mg/l	Inhibition %	Concentrations mg/l	Inhibition %	Concentrations mg/l	Inhibition %
0,075	4	4,5	45	200	8	200	9
0,1	-3	5	47	300	16	300	17
0,125	-7	6	46	350	20	350	22
0,2	25	9	72	400	23	400	25
0,25	26	10	71	600	45	600	39
0,4	51	12	80	700	52	700	35
0,5	84	18	90	800	57	800	41
CE₅₀ estimée							
mg/l 0,34	(0,29 - 0,41)	5,6	(5,0 - 6,1)	684	(609 - 703)	1037	(880 - 1305)
mM 0,0045	(0,0039 - 0,0055)	0,075	(0,067 - 0,081)	9,1	(8,1 - 9,4)	13,8	(11,7 - 17,4)

Tableau III-5: Concentrations testées pour les différentes solutions d'arsenic et pourcentages d'inhibition de la croissance par fluorescence de *P. subcapitata* associés. Estimation des 72h-CE₅₀ par le logiciel Regtox6 pour les différentes formes d'arsenic.

Les algues sont plus sensibles à la forme oxydée de l'arsenic (V) qu'à la forme réduite (III) (Blanck *et al.*, 1989) contrairement aux autres organismes vivants (Jain et Ali, 2000 ; Hughes, 2002 ; Aposhian *et al.*, 2004). Dans notre étude, la CE₅₀ de référence de l'As V est comprise entre 0,29 et 0,41 mg As/l avec une valeur moyenne de **0,34 mg As/l (soit 4,5 10⁻³ mM)**, celle de l'As III entre 5 et 6 mg As/l avec une valeur moyenne de **5,6 mg As/l (soit 7,5 10⁻² mM)**. Pour les formes méthylées, il est nécessaire de tester des concentrations proches du gramme d'As par litre, non réalistes avec des concentrations susceptibles d'être mesurées dans l'environnement. Les concentrations testées nous ont permis d'estimer des valeurs moyennes de 72h-CE_{50R} égales à **684 mg As/l et 1037 mg As/l pour le MMA et le DMA (soit 9,1 et 13,8 mM)**.

Pour les différentes formes d'arsenic, on observe le gradient de toxicité suivant pour *Pseudokirchneriella subcapitata*:

→ Toxicité de l'As(V) > As(III) > MMA > DMA

Ce gradient est en accord avec les travaux de Knauer *et al.* (1999) réalisés sur le phytoplancton présent dans des lacs à forte contamination.

La sensibilité aux différents contaminants pouvant être présents dans l'environnement est spécifique à chaque espèce d'algues. On a donc choisi de travailler, en parallèle des études menées sur *Pseudokirchneriella subcapitata*, sur une autre algue unicellulaire de laboratoire *Chlorella sp.* de façon à étudier la variabilité inter-espèces des réponses toxiques à des contaminants connus.

I-2 Étude de l'inhibition de la croissance de *Chlorella sp.* à partir de solutions standards de métaux et métalloïdes

I-2-1 Effet du cuivre

La valeur moyenne (**0,13 µM soit 8,4 µg Cu/l** avec un intervalle de confiance 7,0 – 9,4 µg Cu/l) de la CE₅₀ obtenue pour *Chlorella sp.* est différente de celle estimée pour *Pseudokirchneriella subcapitata*. Cette algue est légèrement moins sensible au cuivre que *Pseudokirchneriella subcapitata* qui possède une 72h-CE₅₀ moyenne de référence pour le cuivre de 0,096 µM (soit 6,1 µg Cu/l – intervalle de confiance 5,3 – 6,9 µg Cu/l).

L'étude de Franklin *et al.* (2002), menée sur une espèce de chlorelles, fournit un intervalle de valeurs pour la CE₅₀ de référence du cuivre comprises entre 4,6 et 16 µg Cu/l pour des densités cellulaires en *Chlorella sp.* comprises entre 10² et 10⁵ cell/ml. Cette étude permet de déterminer une 72h-CE₅₀ comprise entre 6,7 et 8 µg Cu/l pour une densité cellulaire de 10⁴ cell/ml avec une valeur moyenne de 7,3 µg Cu/l qui s'intègre dans notre intervalle de confiance.

I-2-2 Effet du zinc

Les résultats obtenus sur les deux sels de zinc ne montrent pas de différence entre les valeurs estimées de 72h-CE₅₀ de référence du zinc. La valeur moyenne 72h-CE_{50R} pour le zinc est égale à **246 ± 31 µg Zn/l (soit 3,8 ± 0,5 µM)**. *Chlorella sp.* est près de 7 fois moins sensible au zinc que *Pseudokirchneriella subcapitata* qui possède une 72h-CE_{50R} pour le zinc de 36,4 ± 6,3 µg Zn/l (soit 0,56 ± 0,10 µM). Cette valeur de référence est nettement supérieure à celle qui résulte des travaux de Muysen et Janssen (2001) menés sur une espèce identifiée de chlorelles (*Chlorella vulgaris*). Cette étude donne une 72h-CE₅₀ de référence pour le zinc de 34 ± 8 µg/l pour des algues non acclimatées et égale à 105 ± 14 µg Zn/l pour des algues acclimatées à une concentration en zinc de 65 µg/l pendant 100 jours, soit une augmentation par trois de leur tolérance au zinc. Les auteurs reportent également des données sur *Chlorella vulgaris* de 96h-CE₅₀ de 2,4 mg Zn/l (Rachlin et Farran, 1974) et de 72h-CE₅₀ égale à 65 mg Zn/l (Wren et McCarroll, 1990). Les divers travaux menés fournissent des valeurs de référence très variables ce qui rend délicate l'intercomparaison des études.

I-2-3 Effet de l'arsenic

Dans notre étude, la CE₅₀ de référence de l'As V est comprise entre 0,9 et 2,7 mg As/l avec une valeur moyenne de **1,6 mg As/l (soit 2,1 10⁻² mM)**, celle de l'As III entre 1,7 et 3,2 mg As/l avec une valeur moyenne de **2,3 mg As/l (soit 3,1 10⁻² mM)**. Contrairement aux résultats obtenus avec *Pseudokirchneriella subcapitata*, la toxicité du MMA est comparable à celle de l'As(V), la valeur moyenne de sa CE_{50R} est de **1,7 mg As/l (soit 2,3 10⁻² mM)** avec un intervalle de confiance à 95% de 1,3 – 2,1 µg As/l. En ce qui concerne l'autre forme méthylée (DMA), sa CE₅₀ de référence est trois fois plus faible que celle obtenue sur *Pseudokirchneriella subcapitata*, elle est comprise entre 302 et 362 mg As/l avec une valeur moyenne de **329 mg As/l (soit 4,4 mM)**.

Pour les différentes formes d'arsenic, on observe le gradient de toxicité suivant pour *Chlorella sp.*:

→ Toxicité de l'As(V) > MMA > As(III) > DMA

Ce gradient est en accord avec les travaux de Knauer *et al.* (1999) réalisés sur le phytoplancton présent dans des lacs non contaminés et diffère de celui obtenu pour *Pseudokirchneriella subcapitata*, algue plus tolérante que *Chlorella sp.* à la forme monométhylée mais plus sensible à la forme V. Cette sensibilité plus ou moins importante au MMA peut être expliquée par les deux types de mécanismes employés par les algues pour détoxifier l'arsenic V (Knauer *et al.*, 1999). Certaines espèces algales réduisent la forme V en forme III directement rejetée dans la colonne d'eau, d'autres produisent des composés méthylés intermédiaires type MMA et DMA. Les algues utilisant le second mécanisme de détoxification sont plus tolérantes aux formes monométhylées, produit de dégradation intermédiaire de leur mécanisme de détoxification des formes (V) d'arsenic. Les résultats obtenus lors de cette étude de laboratoire suggèrent que *Pseudokirchneriella*

subcapitata utilise le second mécanisme de détoxification et produit un composé de dégradation intermédiaire méthylé tandis que *Chlorella sp.* réduit directement la forme V en forme III sans production de composés monométhylés intermédiaires ce qui expliquerait sa plus forte sensibilité au MMA et dans une moindre mesure au DMA.

En ce qui concerne la sensibilité des algues à l'arsenic, c'est chez l'algue marine *Skeletonema costatum* qu'a été observée la sensibilité la plus forte à l'arsenic dissous. Sanders (1989) a constaté une réduction de 20 à 40% de la productivité de cette algue après une exposition de 4 heures à une concentration de 5 µg/l des formes inorganiques de l'arsenic (V et III). Pour les algues d'eau douce, la plus forte sensibilité a été notée chez *Scenedesmus obliquus* qui voit sa croissance réduite de près de 40% suite à une exposition durant 14 jours, à une solution contenant 10 µg/l d'As(V) (Vocke *et al.*, 1980). Ces mêmes auteurs reportent une NOEC de 10000 µg/l d'As(V) chez *Pseudokirchneriella subcapitata* suite à une exposition de 14 jours.

En conclusion, *Chlorella sp.* est une espèce globalement plus résistante que *Pseudokirchneriella subcapitata* à la pollution par les métaux et les métalloïdes (excepté pour les formes méthylées de l'arsenic et plus particulièrement le MMA). Ces remarques sont étayées par l'étude de terrain conduite par Loez *et al.* en 1995 sur la tolérance au zinc de *Chlorella vulgaris* sur une communauté phytoplanctonique de la rivière Reconquista en Argentine.

I-3 Étude de l'inhibition de la croissance de *Pseudokirchneriella subcapitata* à partir des substances actives des produits phytosanitaires

I-3-1 Choix du solvant

La faible solubilité dans l'eau de la plupart des produits phytosanitaires nécessite l'emploi d'un solvant organique pour la préparation des solutions standards des substances pures. Cependant les solvants organiques possèdent une toxicité propre et peuvent imposer un stress toxique aux organismes utilisés pour les biotests. Il est nécessaire de choisir un solvant à toxicité faible vis à vis de *Pseudokirchneriella subcapitata* et de vérifier sa non toxicité au pourcentage utilisé pour l'obtention des solutions filles et de travail. En se référant aux travaux de Bérard (1996) et de El Jay (1996) respectivement sur le phytoplancton lacustre et sur deux algues de 'laboratoire' *Selenastrum capricornutum* et *Chlorella vulgaris*, on a choisi de travailler avec le DMSO (DiMéthyl SulfOxide). En effet, pour les principaux solvants organiques utilisés lors des biotests sur algues et présents dans certaines formulations commerciales de pesticides, ces deux auteurs donnent le gradient de toxicité suivant:

→ Ethanol > Méthanol > DMF (DiMéthyl Formamide) > DMSO

Cependant le DMSO est également utilisé à de fortes concentrations pour l'extraction des pigments chlorophylliens par lyse cellulaire, il apparaît nécessaire et important de tester à partir de quel pourcentage de dilution, le DMSO pourrait avoir une incidence sur les résultats de toxicité mesurés sur les substances pures.

I-3-2 Effet du solvant

Les différentes concentrations sont préparées à partir du DMSO (Fisher, pour analyses) dans le milieu de culture AAPm+Fe et exprimées en pourcentage de dilution. Les effets du solvant variant avec sa concentration, plusieurs dilutions ont été testées de façon à fixer une concentration sans effet toxique sur les algues. Les principaux résultats détaillés dans le tableau ci-contre (III-6) nous permettent de conclure que pour des concentrations inférieures à 1%, le solvant n'aura pas d'incidence sur les résultats de toxicité des substances pures. Au delà de cette valeur, les concentrations testées engendrent une inhibition significative de la croissance algale. Ces résultats sont en accord avec ceux de El Jay (1996).

DMSO (n = 3)	
Concentration %	Inhibition %
0,5	-18 ± 12
1	3 ± 9
2	37 ± 4

Tableau III-6: Pourcentages d'inhibition de la croissance de *P. subcapitata* obtenus pour différentes concentrations en DMSO exprimées en % (n=3).

I-3-3 Effet des produits phytosanitaires

Les résultats des tests de toxicité en laboratoire (conditions contrôlées) avec les molécules actives des pesticides étudiés sont compilés dans la figure III-2. Le détail du travail effectué est présenté et décrit dans les paragraphes suivants.

I-3-3-1 Effet des trois herbicides

Les résultats qui résultent de l'étude de l'inhibition de la croissance de *P. subcapitata* à partir de substances actives d'herbicides sont présentés dans le tableau suivant (III-7) :

	CE ₅		CE ₅₀	
	µg/l	µM	µg/l	µM
Oxadiazon	16,4 (15,7 - 17,3)	4,75 10 ⁻² (4,5 - 5 10 ⁻²)	20,3 (20,1 - 20,4)	5,88 10 ⁻² (5,82 - 5,91 10 ⁻²)
Prétilachlore	1,19 (1,18 - 1,20)	3,82 10 ⁻³ (3,78 - 3,85 10 ⁻³)	2,75 (2,73 - 2,77)	8,82 10 ⁻³ (8,75 - 8,88 10 ⁻³)
Azimsulfuron	2,4 (1,8 - 3,1)	5,7 10 ⁻³ (4,2 - 7,3 10 ⁻³)	17,8 (14,3 - 29,1)	4,2 10 ⁻² (3,4 - 6,9 10 ⁻²)

Tableau III-7: Valeurs des 72h-CE₅ et CE₅₀ (µg/l et µM) estimées par le programme Regtox pour les trois herbicides étudiés.

(Valeurs moyennes et intervalles de confiance p=0,05 (entre parenthèses) obtenus lors du test d'inhibition de la croissance par fluorescence de *P. subcapitata*).

Si on se réfère aux courbes dose-réponse obtenues pour chacun des herbicides (Figure III-2), les pentes sont très marquées pour le prétilachlore et l'oxadiazon tandis que l'azimsulfuron présente une courbe plus 'étalée' ce qui se traduit par des valeurs de CE₅ et CE₅₀ plus différenciées.

Les herbicides étudiés montrent le gradient de toxicité suivant:

→ **Prétilachlore > Azimsulfuron > Oxadiazon**

conformément aux 72h-CE₅ et CE₅₀ obtenues par le programme Regtox à partir des concentrations testées pour chacun des herbicides étudiés (Tableau III-7).

I-3-3-2 Effet des deux insecticides

Les insecticides sont, quant à eux, nettement moins toxiques (Tableau III-8) que les herbicides. Leurs concentrations toxiques (CE) sont bien supérieures à celles pouvant être mesurées dans l'environnement.

	CE ₅		CE ₅₀	
	µg/l	µM	µg/l	µM
Fipronil	256 (229 - 285)	0,59 (0,52 - 0,65)	953 (911 - 1004)	2,18 (2,08 - 2,30)
Alphacyperméthrine	890 (733,5 - 980)	2,14 (1,76 - 2,35)	1180 (1127 - 1242)	2,8 (2,7 - 3,0)

Tableau III-8: Valeurs des 72h-CE₅ et CE₅₀ (µg/l et µM) estimées par le programme Regtox pour les deux insecticides étudiés.

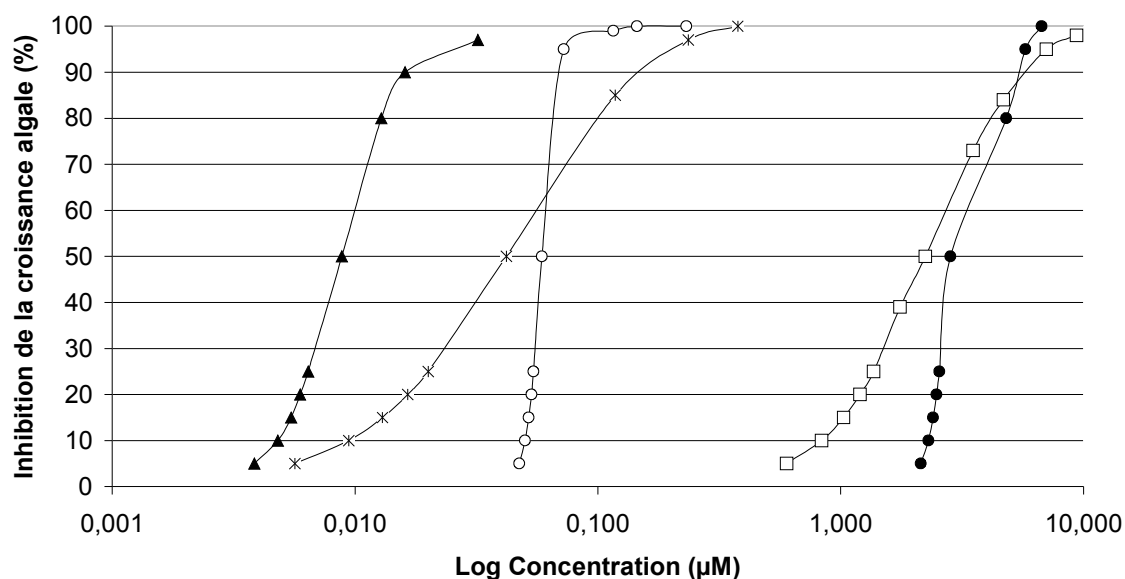
(Valeurs moyennes et intervalles de confiance p=0,05 (entre parenthèses) obtenus lors du test d'inhibition de la croissance par fluorescence de P. subcapitata).

La courbe dose-réponse de l'**alphacyperméthrine** présente une forte pente contrairement à celle obtenue pour le **fipronil** (Figure III-2).

I-3-4 Courbes doses-réponses des produits phytosanitaires étudiés

La figure suivante (III-2) compile et représente l'ensemble des résultats obtenus sur les produits phytosanitaires étudiés seuls en conditions contrôlées. Ces résultats serviront de base dans l'interprétation des données de terrain.

Biotests en conditions contrôlées



—x— Azimsulfuron —o— Oxadiazon —▲— Prétilachlore —□— Fipronil —●— Alphacyperméthrine

Figure III-2: Courbes dose-réponse obtenues suite aux bioessais réalisés sur les produits phytosanitaires utilisés en riziculture.

(Test d'inhibition de la croissance de *P. subcapitata*).

Très peu d'études écotoxicologiques sur algues ont été menées sur les produits phytosanitaires utilisés en Camargue. Les résultats obtenus lors de cette étude peuvent tout de même être comparés à ceux répertoriés sur les fiches Agritox (INRA), présentés ci-dessous. (Tableau III-9)

	Temps d'incubation	CE ₅₀		Algue testée
	heures	µg/l	µM	
Azimsulfuron*	72	12	0,028	<i>Selenastrum sp.</i>
Oxadiazon	120	8,2	0,024	<i>Selenastrum sp.</i>
Prétilachlore	non spécifié	1,3	0,004	non spécifiée
Fipronil	72	68	0,156	<i>Scenedesmus subspicatus</i>
Alphacyperméthrine**	96	> 100	> 0,240	<i>Selenastrum sp.</i>

* Données Dupont/UE ; ** Donnée Agrishell

Tableau III-9: Principales données écotoxicologiques sur algues concernant les produits phytosanitaires étudiés (D'après les fiches Agritox INRA).

Les valeurs de toxicité obtenues lors de notre étude sont systématiquement supérieures à celles mentionnées dans les fiches Agritox, cependant peu de précisions quant aux modes opératoires (milieu de culture, temps d'exposition, paramètre d'effet considéré) sont fournies, le nom de l'algue utilisée étant quelquefois non mentionné.

Une étude menée par Grossmann *et al.* (1992) conclut qu'une inhibition de la croissance algale est obtenue pour des concentrations en herbicides de la famille des sulfonilurées

proche de 1 μM , valeur supérieure à celle observée pour l'azimsulfuron. Plusieurs études menées sur cette famille d'herbicides insistent sur le fait que leur toxicité semble dépendante du pH (Fahl *et al.*, 1995 ; Nyström *et al.*, 1999).

II- Mesure de l'inhibition de l'activité estérasique

Il semblait important de s'intéresser à un autre marqueur d'effet dans la mesure où les métaux et les herbicides sont connus pour affecter certaines activités enzymatiques comme les peroxydases, les uréases (Jung *et al.*, 1995), les catalases (Stauber et Florence, 1987), la β -D-galactosidase (Peterson et Stauber, 1996) et les estérases (Arsenault *et al.*, 1993).

Notre choix s'est porté sur la mesure de l'activité estérasique. Les estérases sont des enzymes communes aux animaux et aux végétaux qui permettent le renouvellement ou 'turn-over' des phospholipides dans les membranes cellulaires. La mesure de l'activité estérasique n'est pas spécifique aux algues en témoignent par exemple les travaux de Torslov (1993) et de Breeuwer *et al.* (1995) respectivement sur les bactéries et les levures. Des mesures de l'activité estérasique ont été menées en laboratoire sur les métaux en utilisant la FDA (Fluorescéine DiAcétate) comme substrat-précurseur de la molécule fluorescente (Arsenault *et al.*, 1993 ; Reiriz *et al.*, 1994 ; Regel *et al.*, 1997, 2002 ; Franklin *et al.*, 2001a et b, 2002) et sur des pesticides en particulier des herbicides (Gilbert *et al.*, 1992) et des HAP(s) (Gala et Giesy, 1994). Cette méthode est également applicable et appliquée à des échantillons environnementaux (Bentley-Mowat, 1982 ; Regel *et al.*, 2002) et à des sédiments (Blaise et Ménard, 1998). De plus la corrélation du taux de conversion de la FDA en fluorescéine et de la photosynthèse établi par Brookes *et al.* (2000) valide l'utilisation de ce test pour l'évaluation des activités métaboliques des communautés algales (Regel *et al.*, 2002).

II-1 Étude de l'inhibition de l'activité estérasique sur *Pseudokirchneriella subcapitata* à partir de solutions standards de métaux et métalloïdes

II-1-1 Effet du cuivre

La variabilité inter-laboratoire a également été vérifiée dans l'étude de l'activité estérasique avec une valeur de 72h-CE_{50R} de **9,8 $\mu\text{g/l}$ (soit 0,154 μM)**, presque deux fois plus élevée que celle obtenue sur l'appareil utilisé à l'Institut Forel en Suisse (16,6 $\mu\text{g Cu/l}$). Le test d'inhibition de l'activité estérasique est légèrement moins sensible que le test de croissance par fluorescence. Les valeurs de 72h-CE_{50R} estimées sont différentes pour les deux tests, et respectivement égales à 9,8 et à 6,1 $\mu\text{g Cu/l}$ (Tableau **III-10**).

Les études recensées dans la littérature préconisent l'utilisation de la mesure de l'activité estérasique comme marqueur d'effet précoce, les temps d'incubation variant de 1 à 24 heures (Snell *et al.*, 1996 ; Franklin *et al.*, 2001 a et b ; Regel *et al.*, 2002). Les travaux de Snell *et al.* (1996) ont mis en évidence l'obtention, pour le cuivre, de valeurs de NOEC et de LOEC identiques pour le test de l'activité estérasique en 1h (concentration finale en FDA de 2,7 μM et temps d'incubation avec le substrat de 5 minutes) et le test d'inhibition de la croissance en

72h sur *Pseudokirchneriella subcapitata*. Cette similitude n'a pas été confirmée par les travaux menés par Franklin *et al.* (2001a et b –tests en 1, 3 et 24h) et Gilbin en 2002 (test 72h).

Les travaux de Franklin *et al.* (2001a) pour une concentration finale en FDA de 25 µM et un temps d'incubation de 5 minutes après ajout du fluorochrome, donnent des résultats de CE₅₀ de 114 ± 49 ; 90 ± 42 et 39 ± 18 µg Cu/l pour des temps d'incubation respectifs de 1, 3 et 24 heures. Dans cette étude, les auteurs ont observé que le tout premier changement physiologique en réponse à une exposition au cuivre est une inhibition de la fluorescence qui traduit une modification de la perméabilité de la membranaire cellulaire à la FDA et/ou une perturbation de l'activité estérasique après seulement 1 heure d'incubation. Après 24h d'incubation, une perte de l'intégrité membranaire (Cid *et al.*, 1996), des modifications cellulaires (taille, potentiel membranaire, diminution du pH intracellulaire) sont clairement mises en évidence ainsi qu'une diminution de la fluorescence de la chlorophylle *a*. Pour des temps d'incubation supérieurs à 48 et 72h aussi bien la division cellulaire que la fluorescence de la chlorophylle *a* sont affectées et inhibées.

II-1-2 Effet du zinc

Les deux sels de zinc ont également été testés sur *P. subcapitata* lors de l'étude de l'inhibition de l'activité estérasique. Il s'avère qu'aucune différence significative n'est notée pour les deux sels de zinc. Pour cette étude, la valeur moyenne de 72h-CE₅₀ de référence pour le zinc est de **58 ± 13 µg Zn/l (soit 0,9 ± 0,2 µM)**. Franklin *et al.* (2001b) obtiennent quant à eux des valeurs moyennes de CE_{50R} pour le zinc respectivement égales à 410 µg Zn/l (195-970) et 100 µg Zn/l (76-129) pour des temps d'incubation de 3 et 24 heures.

<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		
	Inh. croissance	Inh. activité estérasique
	72h-CE ₅₀	
Cu	6,1	9,8
(µg Cu/l)	(5,3 - 6,9)	(9,7 - 9,85)
Zn	36 ± 6	58 ± 13
(µg Zn/l)		

Tableau III-10: Comparaison des résultats de toxicité obtenus pour le cuivre et le zinc sur *P. subcapitata* en étudiant les deux paramètres d'effet en terme de 72h-CE₅₀.

(*n* = 2 et *p* = 0,05)

En se référant au tableau **III-10**, on en conclut que *Pseudokirchneriella subcapitata* est près de six fois plus tolérante au zinc qu'au cuivre. Ce constat est vérifié aussi bien par le test de croissance par fluorescence que par la mesure de l'activité estérasique. Même si ce dernier paramètre est légèrement moins sensible (72h-CE_{50R} de 36 ± 6 et 58 ± 13 respectivement pour les tests d'inhibition de la croissance et de l'activité estérasique) (Tableau **III-10**).

II-1-3 Effet de l'arsenic

Si on considère les deux paramètres d'effet étudiés, la sensibilité de *Pseudokirchneriella subcapitata* est équivalente vis à vis des formes III et V de l'arsenic. Le gradient de toxicité

As(V) > As(III) est respecté et les valeurs de référence obtenues sont proches pour les deux paramètres d'effet testés (Tableau III-11). Par contre, pour les formes méthylées (MMA et DMA), aucune des concentrations testées n'engendre de toxicité, **une stimulation algale** est même observée pour des concentrations de l'ordre de 800 mg As/l.

<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		
	Inh. croissance	Inh. activité estérasiq 72h-CE ₅₀
As V (mg As/l)	0,34 (0,29 - 0,41)	0,36 (0,32 - 0,39)
As III (mg As/l)	5,6 (5,0 - 6,1)	4,9 (3,5 - 5,9)
MMA (mg As/l)	684 (609 - 703)	-
DMA (mg As/l)	1037 (880 - 1305)	-

Tableau III-11: Comparaison des résultats de toxicité obtenus pour les différentes formes de l'arsenic sur *P. subcapitata* en étudiant les deux paramètres d'effet en terme de 72h-CE₅₀. (Valeurs moyennes et intervalle de confiance $p = 0,05$ entre parenthèses)

II-2 Étude de l'inhibition de l'activité estérasiq sur *Chlorella sp.* à partir de solutions standards de métaux et métalloïdes

II-2-1 Effet des métaux et des métalloïdes

II-2-1-1 Effets du cuivre et du zinc

Pour le cuivre et contrairement aux résultats obtenus avec *Pseudokirchneriella subcapitata* (Tableau III-10), le test d'inhibition de l'activité estérasiq conduit sur *Chlorella sp.* est plus sensible que celui de l'inhibition de la croissance (Tableau III-12). En ce qui concerne le zinc et contrairement aux résultats obtenus avec *P. subcapitata*, la sensibilité des deux paramètres d'effet étudiés est identique pour *Chlorella sp.* (Tableau III-12). Cette algue est, de plus, quatre fois plus tolérante au zinc qu'au cuivre.

<i>Chlorella sp.</i>		
	Inh. croissance	Inh. activité estérasiq 72h-CE ₅₀
Cu (µg Cu/l)	8,4 (7,0 - 9,4)	6,6 (4,7 - 8,0)
Zn (µg Zn/l)	246 ± 31	219 ± 7

Tableau III-12: Comparaison des résultats de toxicité obtenus pour le cuivre et le zinc sur *Chlorella sp.* en étudiant les deux paramètres d'effet en terme de 72h-CE₅₀.

($n = 2$ et $p = 0,05$)

II-2-1-2 Effet de l'arsenic

Tout comme pour les résultats obtenus lors de l'étude de l'activité estérasique de *P. subcapitata* (Tableau III-11), aucune réponse toxique n'est observée aux concentrations testées pour les deux composés méthylés de l'arsenic (DMA et MMA). Pour les formes III et V de l'arsenic, les 72h-CE_{50R} estimées lors de l'étude de l'inhibition de l'activité estérasique sont équivalentes aux réponses obtenues par le test d'inhibition de la croissance (Tableau III-13).

	<i>Chlorella sp.</i>	
	Inh. croissance	Inh. activité estérasique 72h-CE ₅₀
As V (mg As/l)	1,6 (0,9 - 2,7)	1,4 (1,1 - 1,7)
As III (mg As/l)	2,3 (1,7 - 3,2)	2,7 (2,3 - 3,0)
MMA (mg As/l)	1,7 (1,3 - 2,1)	-
DMA (mg As/l)	329 (302 - 362)	-

Tableau III-13: Comparaison des résultats de toxicité obtenus pour les différentes formes de l'arsenic sur *Chlorella sp.* en étudiant les deux paramètres d'effet en terme de 72h-CE₅₀. (Valeurs moyennes et intervalle de confiance $p = 0,05$ entre parenthèses)

II-2-2 Effet des produits phytosanitaires

Lors de ces travaux, aucune étude de la toxicité potentielle des produits phytosanitaires du riz n'a été menée sur *Chlorella sp.* de par sa plus grande tolérance aux polluants aussi bien métalliques (mise en évidence dans cette étude) qu'organiques (Kasai et Hatakeyama, 1993 ; Fairchild *et al.*, 1998 ; Sabater *et al.*, 2002). L'étude menée par Kasai et Hatakeyama (1993) sur les mêmes algues que celles choisies pour notre étude, incluait le prétilachlore (herbicide le plus toxique de notre gradient de toxicité).

Fairchild *et al.* (1998), ont quant à eux, obtenu le gradient de sensibilité de certaines espèces algales aux herbicides suivant:

→ *Selenastrum* (= *Pseudokirchneriella*) > *Chlorella* > *Chlamydomonas* > *Microcystis* > *Scenedesmus* > *Anabaena*.

II-3 Étude de l'inhibition de l'activité estérasique sur *Pseudokirchneriella subcapitata* à partir des substances actives des produits phytosanitaires

II-3-1 Modes d'actions des produits phytosanitaires étudiés

De par leur mode d'action ciblé sur les échanges au niveau de canaux ioniques, les deux insecticides ne devraient vraisemblablement pas agir sur une activité enzymatique. Par contre, deux des trois herbicides étudiés (Azimsulfuron et Oxadiazon) ont pour cible moléculaire une enzyme (Tableau III-14) tandis que le Prétilachlore agit sur la synthèse d'acides gras et semble affecter la division cellulaire.

Herbicide	Processus physiologiques perturbés	Cible moléculaire
Azimsulfuron	Biosynthèse des acides aminés	Acétolactate synthase
Oxadiazon	Biosynthèse de la porphyrine	Protoporphyrinogène oxidase
Prétilachlore	Division cellulaire	Synthèse des acides gras à longues chaînes

Tableau III-14: Cibles moléculaires et processus physiologiques affectés par les trois herbicides étudiés selon Schmidt, 1997. (HRAC ‘Classification of Herbicides according to Mode of Action’) et * Schmalfluss *et al.* (2000).

II-3-2 Effet des herbicides

Les tests de mesure de l’activité estérasique ont été réalisés avec les mêmes gammes de concentrations utilisées lors des études de l’inhibition de la croissance algale par fluorescence.

Pour le prétilachlore, aucune toxicité directe n’est observée puisqu’au contraire une stimulation de l’activité estérasique est notée aux concentrations testées (1 à 8 µg/l). Parmi les trois herbicides étudiés, seul ce produit n’affecte pas un mécanisme enzymatique (Tableau **III-14**). Pour les deux autres herbicides, le test d’inhibition de l’activité estérasique est moins sensible pour l’azimsulfuron que le test de mesure de l’inhibition de la croissance par fluorescence (Tableaux **III-15**). On remarque, en effet, que la CE₅ estimée pour l’azimsulfuron lors de l’étude de l’inhibition de l’activité estérasique est similaire à la valeur de référence 72h-CE₅₀ obtenue lors du test de l’inhibition de la croissance algale par fluorescence. En ce qui concerne l’oxadiazon, les valeurs obtenues sont équivalentes à celles observées lors du test d’inhibition de la croissance par fluorescence.

A	Inhibition de la croissance		Inhibition de l'activité estérasique	
	CE ₅		CE ₅	
	µg/l	µM	µg/l	µM
Oxadiazon	16,4 (15,7 - 17,3)	4,75 10 ⁻² (4,5 - 5 10 ⁻²)	16,4 (9 - 19)	4,75 10 ⁻² (2,6 - 5,5 10 ⁻²)
Prétilachlore	1,19 (1,18 - 1,20)	3,82 10 ⁻³ (3,78 - 3,85 10 ⁻³)	-	-
Azimsulfuron	2,4 (1,8 - 3,1)	5,7 10 ⁻³ (4,2 - 7,3 10 ⁻³)	22 (7 - 82)	5,2 10 ⁻² (1,6 10 ⁻² - 0,2)
Fipronil	256 (229 - 285)	0,59 (0,52 - 0,65)	443 (253,5 - 702,5)	1,01 (0,58 - 1,61)
Alphacyperméthrine	890 (733,5 - 980)	2,14 (1,76 - 2,35)	750 (395 - 1156)	1,8 (0,95 - 2,78)

B	Inhibition de la croissance		Inhibition de l'activité estérasique	
	CE ₅₀		CE ₅₀	
	µg/l	µM	µg/l	µM
Oxadiazon	20,3 (20,1 - 20,4)	5,88 10 ⁻² (5,82 - 5,91 10 ⁻²)	22,05 (20 - 24)	6,4 10 ⁻² (5,8 - 6,95 10 ⁻²)
Prétilachlore	2,75 (2,73 - 2,77)	8,82 10 ⁻³ (8,75 - 8,88 10 ⁻³)	-	-
Azimsulfuron	17,8 (14,3 - 29,1)	4,2 10 ⁻² (3,4 - 6,9 10 ⁻²)	77 (58,5 - 98)	0,18 (0,14 - 0,23)
Fipronil	953 (911 - 1004)	2,18 (2,08 - 2,30)	1193 (939 - 1425)	2,73 (2,15 - 3,26)
Alphacyperméthrine	1180 (1127 - 1242)	2,8 (2,7 - 3,0)	1455 (1189,5 - 1664)	3,5 (2,7 - 4,0)

Tableaux III-15 A et B: Comparaison des résultats de toxicité obtenus sur *P. subcapitata* en terme de CE₅ (A) et CE₅₀ (B) lors de l'étude des deux paramètres d'effet. (Valeurs moyennes et intervalles de confiance $p=0,05$ entre parenthèses).

II-3-3 Effet des insecticides

Même si les modes d'action de ces produits ne ciblent pas des mécanismes enzymatiques, on ne note pourtant pas de différence entre les résultats obtenus en étudiant l'inhibition de la croissance par fluorescence et de l'activité estérasique pour le fipronil (Tableaux III-15). Pour l'alphacyperméthrine, le test de l'activité estérasique est légèrement moins sensible (Tableaux III-15).

II-4 Conclusions

Le travail amorcé en Suisse et conduit à Montpellier a permis de mettre en évidence une variabilité inter-laboratoire des réponses, imputable à la sensibilité propre de chacun des appareils de mesure utilisés. Lors des biotests réalisés en conditions contrôlées, une variabilité intra-laboratoire a également été soulignée, elle semble dépendante de la gamme de concentrations testées. En effet, cette variabilité n'est pas mise en évidence lors des tests de

reproductibilité sur des gammes de concentrations identiques et pour des inoculums provenant de repiquages différents.

A ces variabilités inter et intra-laboratoires, qui rendent délicates les comparaisons avec les données de la littérature, viennent s'ajouter des variations de sensibilité fonction des paramètres d'effets étudiés ainsi que des variations inter-espèces. Les principales conclusions résultantes des travaux effectués pour estimer ces deux types de variations seront exposées dans les paragraphes suivants.

Les différentes activités métaboliques des algues étant spécifiques d'une espèce donnée (Sabater *et al.*, 2002), la variabilité inter-espèces a été mise en évidence sur l'ensemble des espèces végétales y compris les algues (Fairchild *et al.*, 1998). Par exemple, les études de Yruela *et al.* (1993 et 1999) démontrent que l'effet du cuivre sur la fluorescence de la chlorophylle *a* est différent d'une espèce végétale à l'autre selon que le cuivre inhibe le flux d'électrons au niveau donneur ou accepteur d'électrons du photosystème impliqué.

Dans le cadre de notre étude, le gradient de toxicité observé pour les métaux et métalloïdes **Cu > Zn > As** est identique pour les deux algues étudiées. Bien que *Chlorella sp.* semble être une espèce algale plus tolérante que *P. subcapitata* aux contaminants métalliques en particulier au zinc (Loez *et al.*, 1995) et à la forme V de l'arsenic et moins tolérante aux formes méthylées de l'arsenic en particulier au MMA. Les résultats obtenus lors de cette étude de laboratoire restent en accord avec le gradient de sensibilité des algues obtenu par Fairchild *et al.* (1998).

En ce qui concerne la sensibilité des deux paramètres d'effet, elle est comparable pour les tests d'inhibition effectués à partir de standards de métaux et de métalloïdes, excepté pour les formes méthylées de l'arsenic qui engendrent aux concentrations testées une stimulation de l'activité estérasique aussi bien avec *P. subcapitata* qu'avec *Chlorella sp.* (Tableaux **III-11** et **13**). Cependant, le test FDA semble être moins sensible pour les composés qui n'affectent pas les activités enzymatiques. Cette hypothèse semble être seulement vérifiée avec le prétilachlore puisque seul ce composé induit une stimulation de l'activité estérasique de *P. subcapitata* aux concentrations testées. Parmi les produits phytosanitaires étudiés, seul l'azimsulfuron présente des 72h-CE₅ et CE₅₀ très différentes de celles obtenues lors du test d'inhibition de la croissance algale par fluorescence. L'étude de l'inhibition de l'activité estérasique est un indicateur précoce de la toxicité, il s'effectue le plus couramment pour des durées d'exposition plus courtes que celle utilisée lors de notre étude (1, 3 voire 24h – Snell *et al.*, 1996 ; Franklin *et al.*, 2001b). Elle est généralement effectuée lors de l'étude de milieux très pollués qui présentent des niveaux de contamination très importants (Regel *et al.*, 2002).

Ces résultats illustrent la complexité des inter-comparaisons entre les différentes données de la littérature de par les différents types de variabilités existantes qu'elles soient inter ou intra-laboratoires, intra ou inter-espèces. A cela s'ajoute les facteurs liés à la procédure, à la nature

Biotests en conditions contrôlées

du milieu de culture, aux indicateurs d'effets spécifiques qui influencent également la réponse des contaminants. Toutes ces remarques devront être prises en compte lors de l'interprétation des réponses toxiques des échantillons de l'environnement de matrice plus complexe que les solutions standards utilisées lors des biotests en conditions contrôlées. Compte tenu des résultats obtenus à partir des solutions standards, les échantillons environnementaux ne seront testés que sur l'algue qui apparaît comme la plus sensible à savoir *Pseudokirchneriella subcapitata*.

RESULTATS

IMPACT DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES ISSUS DE LA RIZICULTURE et ETUDE DE L'INTERACTION

Différents produits phytosanitaires sont utilisés en riziculture afin de protéger la quantité et la qualité de la récolte. Ces pesticides peuvent se retrouver à l'état de traces dans l'environnement. Pour évaluer l'impact de ces substances sur le milieu aquatique, la recherche et l'analyse de résidus de produits phytosanitaires dans les eaux de surface constituent une première étape. D'autres outils sont disponibles pour affiner et améliorer l'évaluation de leur impact sur l'environnement comme les tests écotoxicologiques. Dans cette étude un test chronique d'inhibition de la croissance en 72h sera menée sur *Pseudokirchneriella subcapitata*. Pour les échantillons d'eaux, en cas de détection d'activité toxique, la difficulté est de définir la ou plutôt les molécules responsables de ces effets. C'est pourquoi, une analyse des métaux a été conduite parallèlement à l'analyse des produits phytosanitaires.

Ce travail a été réalisé sur des prélèvements d'eaux de surface provenant de trois sites correspondant à des canaux de drainage issus de trois bassins versants et d'un site situé en amont sur le Rhône (captage des eaux d'irrigation) pour deux années d'étude et sur des prélèvements provenant de deux parcelles seulement pour la seconde année d'étude. Le choix des périodes de prélèvement et des sites a été fait en concertation avec le Centre Français du Riz et la Tour du Valat. Les dates d'échantillonnage correspondent aux périodes de traitements.

I- Résultats de la campagne 2001

Au cours d'une première étude effectuée en 2001, nous avons recherché l'Azimsulfuron, le Prétalachlore, l'Oxadiazon, le Fipronil et l'Alphacyperméthrine dans les eaux de captage (prélèvement dans le Rhône-Rh) et dans les canaux de drainage de trois bassins versants: Albaron (Al), Fumemorte (F) et Grand-Mar (GM). Pour chaque point, trois prélèvements d'eaux ont été effectués, le choix des dates a été fait en fonction des interventions phytosanitaires en riziculture:

- Le 9 Mai 2001 – Traitements herbicides en présemis notés *1,
- Le 11 Juin 2001 – Traitements herbicides post-semis et insecticides sur chiromones (*2),
- Le 7 Août 2001 – Traitements insecticides sur pyrales (*3).

En parallèle de l'analyse des résidus de produits phytosanitaires, des biotests ainsi qu'une analyse de métaux ont été effectués sur les mêmes échantillons. Des métaux peuvent être présents dans certains 'métallo-pesticides' ou en tant qu'impuretés dans certains produits phytosanitaires (Gimeno-Garcia *et al.*, 1996) et sont susceptibles de s'accumuler et de se retrouver dans les sols des rizières.

I-1 Analyse de résidus de produits phytosanitaires

Dans toutes les eaux analysées, les concentrations en azimsulfuron sont inférieures à la limite de quantification de 0,2 nM. Il en est de même pour les concentrations en fipronil et en alphacyperméthrine inférieures à leur limite de quantification respectivement de 0,05 et de 0,12 nM.

Dans les eaux du Rhône, les concentrations sont inférieures au seuil de quantification de chacun des pesticides recherchés pour chaque date de prélèvement.

La figure suivante (Figure IV-1) présente les résultats des analyses de résidus de produits phytosanitaires obtenus sur les trois canaux de drainage en 2001.

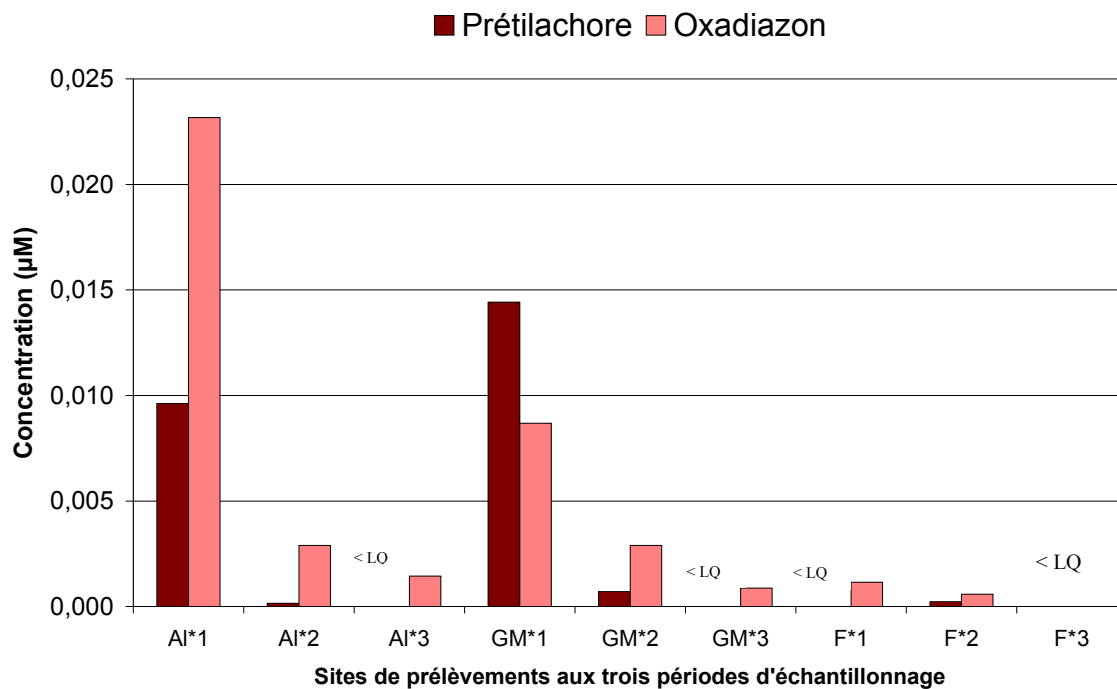


Figure IV-1: Concentrations en Prétilachlore et en Oxadiazon (µM) dans les eaux issues des trois canaux de drainage (Albaron, Grand-Mar et Fumemorte) en 2001. (*1:9mai ; *2:11juin et *3:7août ; < LQ: inférieur à la limite de quantification).

Sur les sites d’Albaron (Al) et de Grand-Mar (GM), des concentrations en oxadiazon respectivement de 0,023 et 0,009 µM ont été observées sur les eaux prélevées au mois de mai. Ces concentrations décroissent à 0,003 µM au mois de juin pour atteindre une concentration inférieure ou égale à 0,001 µM au mois d’août. Sur ces mêmes sites, des concentrations en prétilachlore respectivement de 0,0096 et 0,014 µM ont été observées sur les eaux prélevées au mois de mai. Ces concentrations décroissent au mois de juin pour atteindre une concentration inférieure au seuil de quantification (<0,064 nM) au mois d’août.

Sur le site de Fumemorte (F), des concentrations beaucoup plus faibles ont été observées aussi bien pour le prétilachlore que l’oxadiazon. Le prétilachlore est quantifié au mois de juin (0,0002 µM) et l’oxadiazon en mai et juin avec des concentrations respectives de 0,0012 et 0,0006 µM.

*Impact des produits phytosanitaires issus de la riziculture
et étude de l'interaction*

L'oxadiazon semble avoir une persistance plus importante que le prétilachlore, ceci reste en accord avec ses propriétés chimiques. Il est, en effet, encore quantifié dans les prélèvements du mois d'août des sites d'Albaron et de Grand-Mar, alors que les concentrations en prétilachlore sont inférieures à sa limite de quantification.

I-2 Analyse des métaux

Pour l'ensemble des métaux recherchés, les résultats n'indiquent pas de différences majeures entre les différents prélèvements (Tableau IV-1). Les eaux du Rhône présentent les plus faibles concentrations en métaux en particulier pour le Mn. Cet élément est présent en fortes concentrations pour le prélèvement de juin sur les sites d'Albaron et de Fumemorte mais il ne présente pas de toxicité pour les algues (Tableau I-7). Le cuivre, le zinc et l'arsenic étudiés pour leur toxicité potentielle présentent des concentrations inférieures à leurs 72h-CE₅₀ de référence et leurs concentrations respectives ne sont pas différentes sur les quatre sites aux trois dates d'échantillonnage.

	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Pb
Limite de détection	0,0001	0,00003	0,0004	0,00005	0,0001	0,0001	0,00001
	µM						
Al*1	0,4	0,005	0,05	0,04	0,03	0,04	0,0007
Al*2	1,1	0,007	0,05	0,04	0,06	0,06	0,0006
Al*3	0,3	0,004	0,04	0,02	0,08	0,04	0,0004
F*1	0,5	0,006	0,05	0,03	0,02	0,04	0,0002
F*2	1,0	0,007	0,05	0,03	0,02	0,05	0,0001
F*3	0,3	0,004	0,04	0,02	0,03	0,03	0,0002
GM*1	0,3	0,004	0,04	0,04	0,02	0,03	0,0012
GM*2	0,5	0,004	0,04	0,03	0,13	0,04	0,0003
GM*3	0,7	0,004	0,04	0,02	0,02	0,03	0,0002
Rh*1	0,05	0,003	0,02	0,02	0,02	0,02	0,0003
Rh*2	0,08	0,003	0,02	0,02	0,02	0,02	0,0002
Rh*3	0,03	0,003	0,02	0,02	0,01	0,02	0,0001

Tableau IV-1: Concentrations des principaux métaux (µM) dans les eaux issues des trois canaux de drainage et du Rhône pour les trois dates d'échantillonnage en 2001. (*1:9mai ; *2:11juin et *3:7août).

I-3 Étude de la réponse des eaux après application sur bioessais

I-3-1 Étude de l'inhibition de la croissance de Pseudokirchneriella subcapitata par fluorescence

Aucun des échantillons n'est toxique pour *Pseudokirchneriella subcapitata* excepté ceux prélevés sur les sites de Grand-Mar et d'Albaron en mai (*1). GM*1 présente une toxicité directe (92 ± 2% d'inhibition de la croissance algale) tandis que la réponse toxique de Al*1 est plus faible (39 ± 5% d'inhibition de la croissance algale) (Tableau IV-2). Les eaux des autres échantillons engendrent une stimulation de la croissance algale.

*Impact des produits phytosanitaires issus de la riziculture
et étude de l'interaction*

Pour les échantillons toxiques, les biotests ont été effectués à différentes dilutions de façon à pouvoir estimer par le logiciel Regtox6 (n=3) la dilution nécessaire pour obtenir une inhibition de 50% de la croissance. Les concentrations en produits phytosanitaires, en cuivre et en zinc présents dans les échantillons dilués sont estimées pour GM*1 et AI*1 (Tableau IV-2). En ce qui concerne les produits phytosanitaires, si on considère les concentrations initiales détectées et si on compare les résultats issus des dilutions avec les 72h-CE₅₀ de référence (respectivement de 8,8 et 58,8 10⁻³ µM pour le prétilachlore et l'oxadiazon), on en conclut que le prétilachlore peut être impliqué dans la réponse toxique observée sur les deux échantillons. Les concentrations en oxadiazon (9 et 23 10⁻³ µM pour GM et AI) sont nettement inférieures à la 72h-CE_{50R} de ce composé. Par contre, le cuivre comme le zinc ne semblent pas intervenir dans la toxicité observée au regard de leurs concentrations initiales (Tableau IV-2).

	Inhibition de la croissance		Conc. init (µM)				Facteur de dilution (CE ₅₀)	Conc. (µM) après dilution				
	%		Prétilachlore	Oxadiazon	Cuivre	Zinc		Prétilachlore	Oxadiazon	Cuivre	Zinc	
GM*1	92 ± 2		0,0140	0,009	0,04	0,02	2,2	0,0067	0,00405	0,018	0,009	
AI*1	39 ± 5		0,0096	0,023	0,04	0,03	éch. naturel	0,0096	0,0023	0,04	0,03	
							CE _{50R} (µM)					
							8,8 10 ⁻³	58,8 10 ⁻³	0,096	0,56		
							(8,75 - 8,9 10 ⁻³)	(58,2 - 58,9 10 ⁻³)	(0,08 - 0,11)	+/- 0,10		

Tableau IV-2: Pourcentages d'inhibition de la croissance par fluorescence de *P. subcapitata* des deux échantillons toxiques en 2001 (GM*1 et AI*1).

Concentrations initiales en prétilachlore, en oxadiazon, en cuivre et en zinc (µM) et facteurs de dilution nécessaires à l'obtention de 50% d'inhibition de la croissance algale.

Comparaison des concentrations en prétilachlore, en oxadiazon, en cuivre et en zinc (µM) résultantes de cette dilution et des 72h-CE₅₀ de référence.

En conclusion, la réponse toxique obtenue sur les eaux provenant des sites de Grand-Mar et d'Albaron au mois de mai ne peut être expliquée par les métaux. Les concentrations mesurées sont systématiquement inférieures aux 72h-CE_{50R}. Seul le prétilachlore pourrait être impliqué dans l'inhibition observée (Tableau IV-2). Néanmoins, la recherche de polluants dans les échantillons n'est pas exhaustive, d'autres composés non détectés peuvent également être actifs. De ce fait, l'étude d'autres paramètres peut nous apporter des éléments complémentaires pour l'interprétation des résultats de toxicité.

I-3-2 Autres paramètres d'effet

L'étude de l'inhibition de l'activité estérasiqne n'a pas pu être menée lors de la première campagne d'échantillonnage. Néanmoins, la mesure de l'absorbance à 440 nm, qui permet d'estimer la biomasse algale, a été étudiée. Deux échantillons (GM*1 et AI*1) à réponse toxique ont été mis en évidence. Ils présentent respectivement une diminution de la densité cellulaire de 61% et 11% par rapport aux contrôles. Ce test donne des résultats similaires à la mesure du contenu en chlorophylle *a* par fluorescence et n'apporte pas d'informations supplémentaires pour l'interprétation des résultats de toxicité directe.

II- Résultats de la campagne 2002

La campagne menée en 2002 a eu pour objectifs, d'une part de vérifier si les concentrations en produits phytosanitaires et leur évolution seraient similaires à celles observées en 2001, et d'autre part d'étudier le devenir de ces cinq composés sur deux parcelles individualisées Berthe (B) et Agon (Ag) ne subissant pas les mêmes traitements phytosanitaires (respectivement parcelle dite biologique et non biologique). De plus un autre paramètre d'effet a été testé lors de cette nouvelle campagne 2002, il s'agit de l'étude de l'activité estérasique de *P. subcapitata*.

Les prélèvements sur les canaux de drainage et le Rhône sont effectués avec un rythme d'échantillonnage plus soutenu qu'en 2001 à raison de deux par mois de la mi-mai à la fin août et à raison de un par semaine pour les deux parcelles (Tableau II-6).

II-1 Analyse de résidus de produits phytosanitaires

II-1-1 Canaux de drainage et Rhône

Dans tous les échantillons analysés, les concentrations en azimsulfuron, en fipronil et en alphacyperméthrine sont inférieures à la limite de quantification de 0,2 nM commune aux trois composés.

Comme en 2001, les concentrations dans les eaux du Rhône sont inférieures au seuil de quantification de chacun des pesticides recherchés pour l'ensemble des dates d'échantillonnage. La figure suivante (Figure IV-2) présente les résultats d'analyse de résidus de produits phytosanitaires obtenus sur les canaux de drainage en 2002.

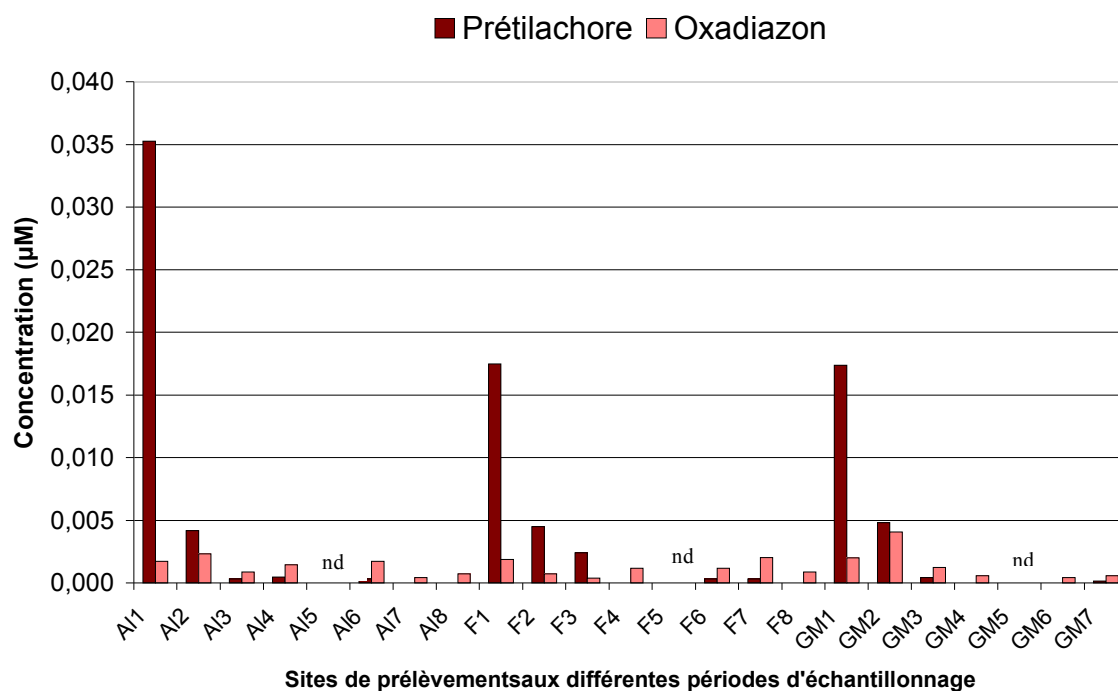


Figure IV-2: Concentrations en Prétilachlore et en Oxadiazon (μM) dans les eaux issues des trois canaux de drainage (Albaron, Fumemorte et Grand-Mar) en 2002. (nd: non déterminé).

*Impact des produits phytosanitaires issus de la riziculture
et étude de l'interaction*

Sur les trois canaux de drainage, Fumemorte, Grand-Mar et Albaron, les concentrations en prétilachlore et en oxadiazon sont du même ordre de grandeur et leurs évolutions sont similaires. En 2001, le site de Fumemorte présentait des concentrations nettement plus faibles en ces deux produits phytosanitaires par rapport aux sites d'Albaron et de Grand-Mar. Cette différence n'a pas été observée au cours de cette campagne.

Les concentrations en prétilachlore varient de 0,017 (GM et F) à 0,035 µM (Al) dans les prélèvements du 17 mai et diminuent jusqu'à une concentration voisine de 0,003 µg/l pour les trois canaux le 31 mai. Cette décroissance de la concentration en prétilachlore se poursuit au cours des mois de juin et juillet pour atteindre des concentrations voisines ou inférieures à la limite de quantification fin août. Cette évolution est similaire à celle que nous avons pu observer en 2001.

Les concentrations en oxadiazon sont voisines de 0,003 µM pour les trois sites dans les prélèvements du mois de mai, elles diminuent progressivement au cours des mois de juillet et août (concentration voisine de 0,0014 µg/l). Comme nous l'avons déjà observé en 2001, l'oxadiazon persiste plus longtemps que le prétilachlore.

II-1-2 Parcelles

Tout comme pour les canaux de drainage, les concentrations en azimsulfuron, en fipronil et en alphacyperméthrine sont inférieures, pour l'ensemble des échantillons étudiés, à la limite de quantification de 0,2 nM commune aux trois composés.

Sur la parcelle B à traitement biologique, seule la présence de prétilachlore a été détectée. Les concentrations comprises entre 0,001 et 0,004 µM début juin, sont proches ou inférieures, à la limite de quantification dès fin juin (Figure IV-3).

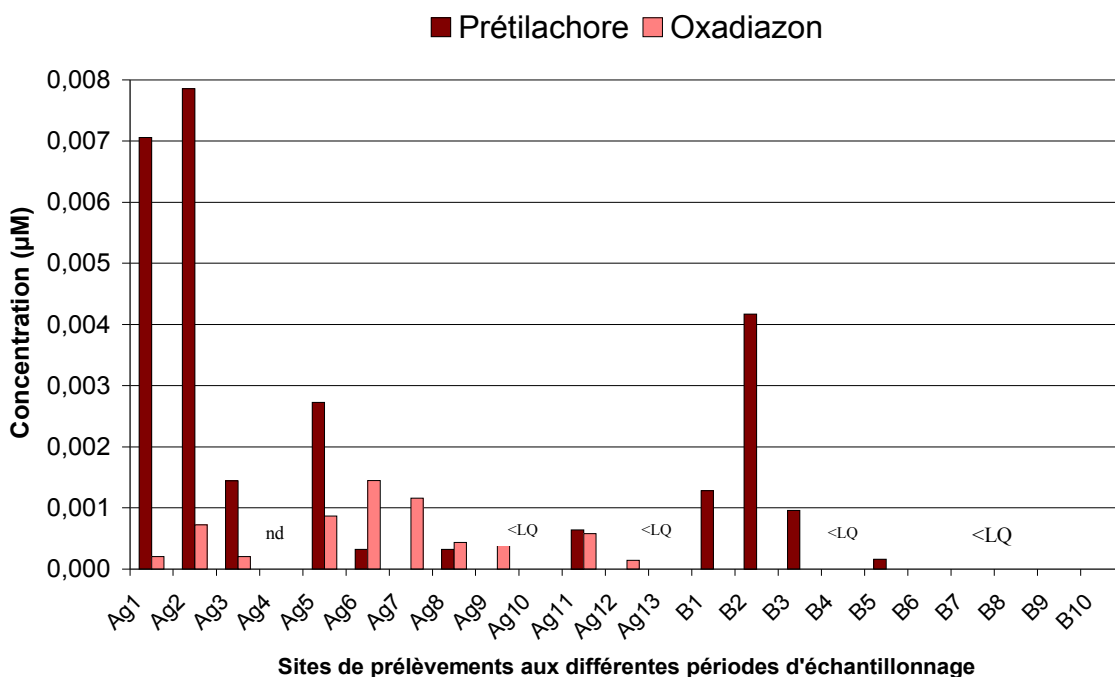


Figure IV-3: Concentrations en Prétilachlore et en Oxadiazon (µM) dans les eaux issues des deux rizières (Agon et Berthe) en 2002.

(*nd: non déterminé ; <LQ: inférieur à la limite de quantification*).

Sur la parcelle Ag qui subit un traitement classique (non biologique), les concentrations en prétilachlore sont comprises entre 0,007 et 0,008 μM dans les prélèvements du 17 et 24 mai et diminuent assez rapidement (0,003 μM le 31 mai) pour atteindre des concentrations proches ou inférieures à la limite de quantification dès fin juin. Cette évolution est similaire à celle que nous observons sur les prélèvements des canaux de drainage. Pour l'oxadiazon, les concentrations varient de 0,0002 à 0,0014 μM du mois de mai à mi-juillet. Les concentrations diminuent au mois d'août pour être, au delà de cette date, inférieures à la limite de quantification.

II-2 Analyse des métaux

Les résultats des analyses de métaux effectuées en 2002 sont reportés respectivement dans les tableaux **IV-3A** pour les canaux de drainage et le Rhône et dans **IV-3B** pour les deux parcelles. Ils concernent exclusivement les échantillons présentant une réponse toxique.

Pour l'ensemble des métaux recherchés, les résultats obtenus sur les canaux de drainage et le Rhône n'indiquent pas de différence majeure entre sites et pour les différentes dates de prélèvements (excepté pour les concentrations en cuivre mesurées dans A11 et en zinc dans Rh1). Les concentrations mesurées sont, par ailleurs proches de celles déterminées l'année dernière excepté pour le zinc qui présente des concentrations dix fois plus élevées en 2002.

Les résultats obtenus dans les parcelles d'étude n'indiquent pas de différence majeure pour les différentes dates de prélèvement pour l'ensemble des métaux étudiés à l'exception du cuivre qui présente des concentrations deux à quatre fois plus importantes que celles mesurées dans les eaux issues des canaux et dans une moindre mesure de l'arsenic pour les échantillons B4 et Ag4 à 7. Une concentration exceptionnellement élevée en Ni se distingue également dans l'échantillon Ag4. Les concentrations plus élevées en cuivre sont vraisemblablement la conséquence de l'installation des rizières sur d'anciennes zones viticoles (Allard *et al.*, 2001 ; Mathevet *et al.*, 2002). à sol riche en cuivre (utilisation massive de bouillie bordelaise et accumulation de cuivre dans les sols) (Besnard, 1999 ; Chaignon, 2001).

*Impact des produits phytosanitaires issus de la riziculture
et étude de l'interaction*

Tableaux IV-3 A et B: Concentrations des principaux métaux (μM) dans les eaux issues des trois canaux de drainage et du Rhône (A) et des deux rizières (B) en 2002 pour les échantillons présentant une réponse toxique.

(*nd: non déterminé et <LD: inférieur à la limite de détection*).

A	Cd	Co	Ni	Cu	Zn	As	Pb
Limite de détection	0,0001	0,00002	0,0002	0,00003	0,0001	0,0001	0,00001
μM							
AI1	0,0003	0,002	0,03	0,14	0,33	0,03	0,0001
AI2	0,0003	0,002	0,04	0,06	0,37	0,03	0,00005
AI3	0,0004	0,004	0,04	0,04	0,27	0,04	< LD
AI4	0,0002	0,004	0,03	0,04	0,31	0,06	0,00006
AI5	0,0002	0,003	0,03	0,07	0,21	0,03	0,0002
AI6	0,0004	0,004	0,04	0,04	0,42	0,05	0,00003
AI7	0,0003	0,003	0,03	0,03	0,27	0,03	0,00009
F1	0,0008	0,003	0,04	0,05	0,21	0,03	0,00002
F2	0,0003	0,004	0,04	0,06	0,21	0,03	0,00003
F3	0,0002	0,004	0,04	0,03	0,25	0,04	< LD
F4	0,0005	0,005	0,07	0,05	0,35	0,05	0,0003
F5	0,0003	0,003	0,04	0,03	0,32	0,05	0,00008
F6	0,0004	0,004	0,03	0,05	0,36	0,05	0,00001
GM1	0,0003	0,004	0,03	0,04	0,23	0,03	0,00007
GM2	0,0003	0,004	0,04	0,06	0,18	0,03	< LD
GM3	0,0003	0,004	0,03	0,03	0,30	0,04	< LD
GM4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GM5	0,0004	0,003	0,04	0,07	0,15	0,03	0,0005
GM6	0,0006	0,004	0,04	0,04	0,27	0,05	0,0003
GM7	0,0003	0,004	0,04	0,06	0,27	0,03	< LD
Rh1	0,0004	0,003	0,04	0,03	0,88	0,01	0,0008
Rh2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Rh3	0,0003	0,003	0,02	0,05	0,23	0,01	< LD
Rh4	0,0005	0,002	0,03	0,07	0,38	0,02	< LD
B	Cd	Co	Ni	Cu	Zn	As	Pb
Limite de détection	0,0001	0,00002	0,0002	0,00003	0,0001	0,0001	0,00001
μM							
Ag1	0,0002	0,003	0,05	0,22	0,24	0,03	0,00002
Ag2	0,001	0,005	0,05	0,38	0,31	0,03	0,0005
Ag3	0,001	0,003	0,04	0,24	0,36	0,03	0,00007
Ag4	0,0004	0,007	0,12	0,40	0,34	0,08	0,00007
Ag5	0,0002	0,003	0,03	0,31	0,26	0,07	< LD
Ag6	0,0001	0,004	0,04	0,10	0,35	0,06	0,00008
Ag7	0,0003	0,005	0,05	0,16	0,28	0,07	0,00005
Ag8	0,0008	0,005	0,03	0,11	0,19	0,03	< LD
Ag9	0,0003	0,005	0,05	0,10	0,35	0,05	0,0003
B1	0,0006	0,003	0,03	0,11	0,18	0,01	0,00001
B2	0,0002	0,004	0,03	0,15	0,34	0,02	0,00002
B3	0,0004	0,003	0,03	0,26	0,24	0,03	0,00008
B4	0,0005	0,004	0,04	0,40	0,51	0,12	0,0003
B5	0,0002	0,004	0,03	0,18	0,44	0,05	0,00005
B6	0,0002	0,002	0,03	0,12	0,44	0,03	< LD
B10	0,0002	0,003	0,04	0,14	0,44	0,04	0,0001

*Impact des produits phytosanitaires issus de la riziculture
et étude de l'interaction*

La gamme des concentrations en arsenic s'étend respectivement de 0,03 à 0,08 µM et de 0,01 à 0,12 µM dans les parcelles Ag et B. Les plus fortes concentrations sont observées de juin à mi-juillet et de fin juin à mi-juillet respectivement pour les échantillons d'eaux issues des parcelles Ag et B. Les concentrations en cuivre varient de 0,10 à 0,40 µM dans les eaux issues des parcelles. Les concentrations les plus élevées en cuivre sont notées dans les échantillons de la parcelle Ag prélevés de mai à mi-juin et de mi-juin à mi-juillet dans ceux issus de la parcelle B. Les concentrations en cuivre sont alors égales ou supérieures à la CE₅₀ de référence du cuivre pour le test d'inhibition de la croissance algale (0,08 – 0,11 µM). Cet élément devra être considéré dans l'interprétation des résultats de toxicité des échantillons prélevés sur les deux parcelles. Par ailleurs, le cuivre et l'arsenic présentent des concentrations supérieures à celles mesurées dans les canaux de drainage et le Rhône. On note 3 à 5 fois plus de cuivre et 1,5 à 3 fois plus d'arsenic dans les échantillons d'eaux issues de ces deux parcelles.

II-3 Étude de la réponse des eaux après application sur bioessais

*II-3-1 Étude de la réponse toxique sur *Pseudokirchneriella subcapitata* des eaux issues du Rhône et des canaux de drainage*

II-3-1-1 Inhibition de la croissance par fluorescence

Les résultats du test d'inhibition de la croissance algale effectués sur les échantillons des eaux provenant du Rhône et des trois canaux de drainage sont présentés dans la figure IV-4.

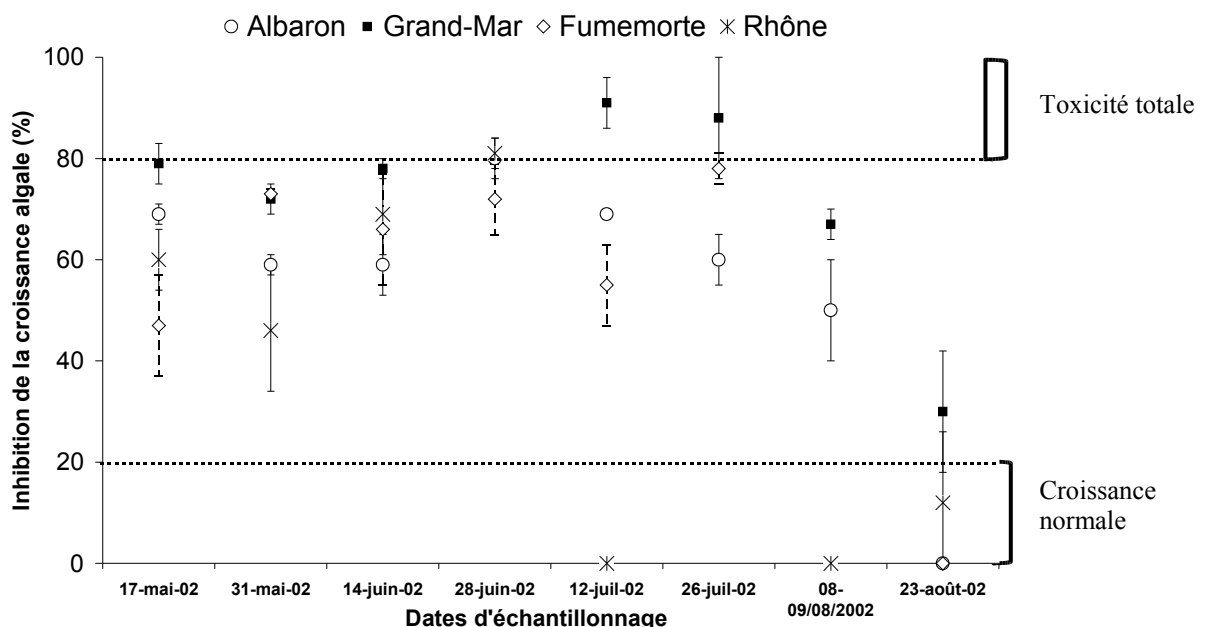


Figure IV-4: Toxicité des échantillons naturels d'eaux issues des trois canaux de drainage et du Rhône en 2002, exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance par fluorescence de *P. subcapitata*.

Aucune différence n'est observée au niveau de la réponse toxique des eaux du Rhône et des eaux des canaux de drainage pour les prélèvements de mai à fin juin (pourcentages

*Impact des produits phytosanitaires issus de la riziculture
et étude de l'interaction*

d'inhibition supérieurs à 50%). La toxicité des eaux du Rhône diminue au mois de juillet pour aboutir à une stimulation algale alors que les eaux issues des canaux de drainage sont encore toxiques. Cette toxicité est observée jusqu'à début août (Figure IV-4).

Les concentrations en prétilachlore, en oxadiazon ainsi qu'en cuivre et en zinc résultantes des dilutions nécessaires pour obtenir une inhibition partielle de la croissance sont estimées pour les échantillons présentant une réponse toxique et présentées dans le tableau IV-4.

	Inhibition de la croissance %	Conc. init (µM)				Facteur de Dilution (CE ₅₀)	Conc. (µM) après dilution			
		Prétilachlore	Oxadiazon	Cuivre	Zinc		Prétilachlore	Oxadiazon	Cuivre	Zinc
GM1*	79 ± 4	0,0174	0,0020	0,04	0,23	2,6	0,0067	0,0009	0,02	0,09
GM2*	72 ± 3	0,0048	0,0041	0,06	0,18	2	0,0024	0,0020	0,03	0,09
GM3	78 ± 2	0,0004	0,0012	0,03	0,30	1,8	0,0002	0,0006	0,01	0,16
GM4*	91 ± 5	< LQ	0,0006	nd	nd	2,6	< LQ	0,0002	nd	nd
GM5*	88 ± 12	nd	nd	0,07	0,15	1,7	nd	nd	0,04	0,09
GM6*	67 ± 3	< LQ	0,0004	0,04	0,27	1,2	< LQ	0,1	0,03	0,23
GM7	30 ± 12	0,0002	0,0006	0,06	0,27	1,3	0,0001	0,0003	0,05	0,21
F1	47 ± 10	0,0175	0,0019	0,05	0,21	1,35	0,0122	0,0013	0,04	0,16
F2*	73 ± 1	0,0045	0,0007	0,06	0,21	2,5	0,0019	0,0003	0,02	0,08
F3	66 ± 11	0,0024	0,0004	0,03	0,25	4	0,0006	0,00009	0,01	0,06
F4	72 ± 7	< LQ	0,0012	0,05	0,35	2,4	< LQ	0,0006	0,02	0,14
F5*	55 ± 8	nd	nd	0,03	0,32	1,6	nd	nd	0,02	0,20
F6*	78 ± 3	0,0003	0,0012	0,05	0,36	2,7	0,0001	0,0006	0,02	0,13
AI1	69 ± 2	0,0353	0,0017	0,14	0,33	1,6	0,0218	0,0012	0,09	0,21
AI2	59 ± 2	0,0042	0,0023	0,06	0,37	2,1	0,0019	0,0012	0,03	0,18
AI3	59 ± 6	0,0003	0,0009	0,04	0,27	1,5	0,0022	0,0006	0,03	0,18
AI4	80 ± 4	0,0005	0,0014	0,04	0,31	4,35	0,0001	0,0003	0,01	0,07
AI5*	69 ± 1	nd	nd	0,07	0,21	2,3	nd	nd	0,03	0,09
AI6	60 ± 5	0,0003	0,0017	0,04	0,42	2,1	0,0002	0,0009	0,02	0,20
AI7	50 ± 10	< LQ	0,0004	0,03	0,27	ech. naturel	< LQ	0,0004	0,04	0,27
Rh1	60 ± 6	< LQ	< LQ	0,03	0,88	1,2	< LQ	< LQ	0,02	0,73
Rh2	46 ± 12	< LQ	< LQ	nd	nd	1,1	< LQ	< LQ	nd	nd
Rh3	69 ± 8	< LQ	< LQ	0,05	0,23	1,7	< LQ	< LQ	0,03	0,13
Rh4	81 ± 3	< LQ	< LQ	0,07	0,38	3,85	< LQ	< LQ	0,02	0,10

CE _{50R} (µM)			
8,8 10 ⁻³	58,8 10 ⁻³	0,096	0,56
(8,75 - 8,9 10 ⁻³)	(58,2 - 58,9 10 ⁻³)	(0,08 - 0,11)	+/- 0,10

Tableau IV-4: Pourcentages d'inhibition de la croissance par fluorescence de *P. subcapitata* des échantillons naturels toxiques issus des trois canaux de drainage et du Rhône en 2002.

Concentrations initiales en prétilachlore, en oxadiazon, en cuivre et en zinc (µM) et facteurs de dilution nécessaires à l'obtention de 50% d'inhibition de la croissance algale.

Comparaison des concentrations en prétilachlore, en oxadiazon, en cuivre et en zinc (µM) résultantes de cette dilution et des 72h-CE₅₀ de référence.

(*: réponse très différente de celle des eaux du Rhône ; nd: non déterminé ; < LQ: inférieur à la limite de quantification).

Seules les concentrations initiales en prétilachlore dans les échantillons GM1, F1 et AI1 (respectivement 0,0174, 0,0175 et 0,0353 µM) sont supérieures à sa CE₅₀ de référence (8,8 10⁻³ µM) et peuvent expliquer la toxicité observée. Pour Rh1 et AI1, respectivement les concentrations en zinc (0,88 µM) et en cuivre (0,14 µM) sont supérieures à leur CE_{50R} respectives (0,08 – 0,11 µM et 0,56 ± 0,10 µM) (Tableau IV-4).

*Impact des produits phytosanitaires issus de la riziculture
et étude de l'interaction*

Si on considère les concentrations résultantes des dilutions nécessaires pour obtenir l'inhibition partielle de croissance, seules les concentrations en prétilachlore obtenues dans A11 et F1 (respectivement 0,0218 et 0,0122 μM) restent supérieures à sa $\text{CE}_{50\text{R}}$, alors que celle de GM1 est inférieure (0,0067 μM) à cette valeur. Les concentrations en zinc et en cuivre dans respectivement Rh1 et A11 (0,09 et 0,73 μM) sont également proches de leurs $\text{CE}_{50\text{R}}$ respectives. Cependant pour les autres échantillons qui présentent une réponse toxique très différente (*) de celle mesurée sur les eaux du Rhône, aucune des concentrations estimées aussi bien en prétilachlore, en oxadiazon, en zinc et en cuivre ne peuvent expliquer les réponses toxiques observées (Tableau IV-4).

II-3-1-2 Inhibition de l'activité estérasiq

En considérant l'inhibition d'une activité enzymatique comme autre paramètre d'effet, les réponses toxiques des échantillons d'eaux issus des canaux de drainage et du Rhône sont totalement différentes de celles obtenues lors de l'étude de l'inhibition de la croissance (Figures IV-5 et 4).

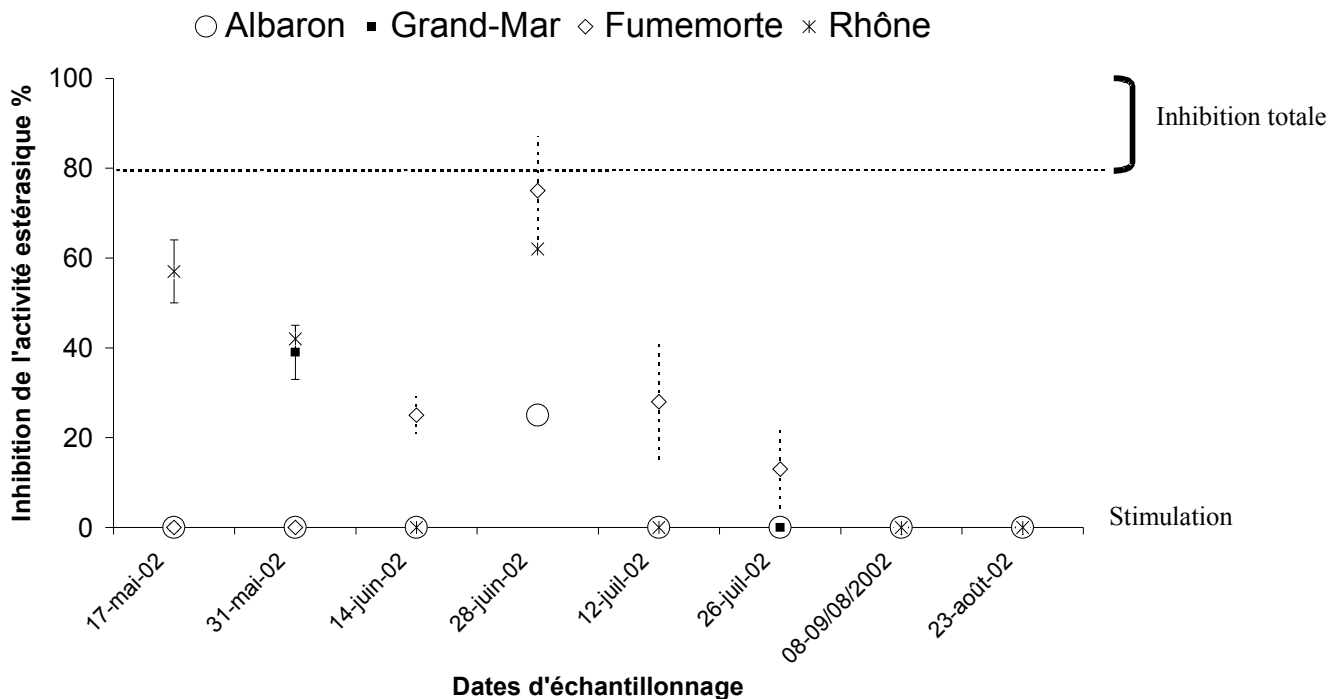


Figure IV-5: Toxicité des échantillons naturels d'eaux échantillonnés dans les trois canaux de drainage et le Rhône en 2002, exprimée en pourcentage d'inhibition de l'activité estérasiq de *P. subcapitata*.

Les échantillons à réponses toxiques sont moins nombreux, ils concernent néanmoins les mêmes échantillons que ceux qui présentent une inhibition de la croissance (Tableau IV-5).

*Impact des produits phytosanitaires issus de la riziculture
et étude de l'interaction*

	Inhibition de l'activité estérasique	Inhibition de la croissance
	%	%
GM2	39 ± 6	72 ± 3
F3	25 ± 4	66 ± 11
F4	75 ± 12	72 ± 7
F5	28 ± 14	55 ± 8
F6	13 ± 9	78 ± 3
Al4	25 ± 1	80 ± 4
Rh1	57 ± 7	60 ± 6
Rh2	42 ± 3	46 ± 12
Rh4	62 ± 2	81 ± 3

Tableau IV-5: Comparaison des pourcentages d'inhibition de la croissance par fluorescence et d'inhibition de l'activité estérasique de *P. subcapitata* obtenus sur les échantillons naturels toxiques communs aux deux tests. Échantillons issus des trois canaux de drainage et du Rhône en 2002.

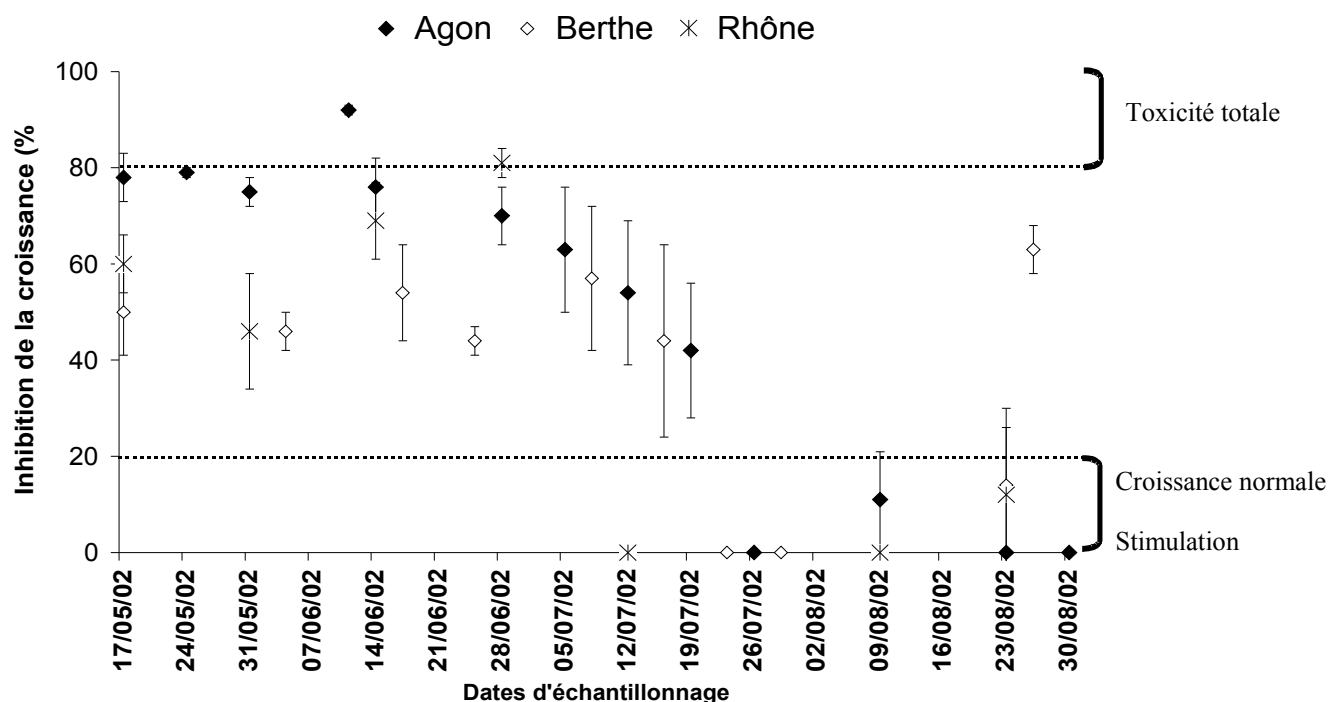
Si on compare les réponses toxiques obtenues, sur les eaux issues des canaux de drainage et du Rhône, lors de l'étude de l'inhibition de la croissance et de l'activité estérasique, seuls les échantillons F4, Rh1, Rh2 et Rh4 possèdent des pourcentages d'inhibition proches. Ces résultats permettent de conclure que le ou les composés responsables de l'inhibition de la croissance possèdent un mécanisme d'action agissant sur l'activité enzymatique des estérases, ce qui semblerait exclure le prétilachlore à mode d'action non enzymatique. Pour les autres échantillons à réponse toxique (GM2, F3, F5 et Al4), les pourcentages d'inhibition obtenus lors de l'étude de l'activité estérasique sont systématiquement inférieurs à ceux obtenus lors de l'étude de l'activité estérasique. On peut en déduire que plusieurs composés sont impliqués dans la réponse toxique et que peu visent l'activité estérasique.

II-3-2 Étude de la réponse toxique sur Pseudokirchneriella subcapitata des eaux issues des parcelles rizicoles

II-3-2-1 Inhibition de la croissance algale

Les résultats du test d'inhibition de la croissance algale effectué sur les échantillons d'eaux des parcelles Berthe (B) et Agon (Ag) sont présentés dans la figure IV-6, sont également inclus dans cette figure les résultats obtenus sur les eaux du Rhône.

Figure IV-6: Toxicité des échantillons naturels d'eaux échantillonnées dans les deux rizières et le Rhône en 2002, exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance de *P. subcapitata* par fluorescence.



Entre mi-mai et mi-juin, une plus forte toxicité est notée pour la parcelle non biologique, période qui correspond à l'application des herbicides. Une inhibition partielle de la croissance algale (50%) est tout de même observée pour la parcelle dite biologique (B) sur la même période, les résultats étant significativement différents sur les deux parcelles. Les résultats obtenus sur B sont corrélés avec la réponse toxique des eaux du Rhône analysées durant la même période. Ceux obtenus pour la parcelle à traitement classique (Ag) sont, par ailleurs, différents de la réponse du Rhône. A partir de fin juillet, il n'y a plus de différence significative entre les deux parcelles et leur réponse toxique diminue progressivement. Dès fin juillet et jusqu'à la fin des prélèvements, une croissance normale est observée, excepté pour un point particulier le 26 août qui présente une réponse toxique de 63%.

Si on compare les 72h-CE₅₀ de référence et les concentrations en prétilachlore, oxadiazon, cuivre et zinc présentes dans les échantillons naturels, on note que le cuivre est systématiquement en concentration totale suffisante pour expliquer la toxicité observée aussi bien dans la parcelle Ag que dans B (Tableau IV-6). Les concentrations en produits phytosanitaires sont quant à elles systématiquement inférieures à leur 72h-CE₅₀ de référence. La concentration en zinc mesurée dans l'échantillon B4 peut elle aussi expliquer la toxicité observée. Si on se réfère aux concentrations estimées après la dilution nécessaire pour obtenir 50% d'inhibition de la croissance (Tableau IV-6), ni les concentrations en produits phytosanitaires ni celles en zinc peuvent expliquer les réponses toxiques observées sur les eaux des deux parcelles. Par contre, seules les concentrations estimées en cuivre, sur les

Impact des produits phytosanitaires issus de la riziculture
et étude de l'interaction

	Inhibition de la croissance		Conc. init (µM)				Facteur de Dilution (CE ₅₀)	Conc. (µg/l) après dilution		Conc. (µM) après dilution	
	%	Prétilachlore	Oxadiazon	Cuivre	Zinc	Prétilachlore		Oxadiazon	Cuivre	Zinc	
Ag1	78 ± 5	0,0071	0,0002	0,22	0,24	2,9	0,0026	0,0006	0,08	0,08	
Ag2	79 ± 1	0,0079	0,0007	0,38	0,31	4,35	0,0019	0,0002	0,09	0,07	
Ag3	75 ± 3	0,0014	0,0002	0,24	0,36	2,6	0,0006	0,00009	0,09	0,14	
Ag4	92 ± 1	< LQ	< LQ	0,40	0,34	4	nd	nd	0,10	0,08	
Ag5	76 ± 6	0,0027	0,0009	0,31	0,26	2,2	0,0013	0,0003	0,14	0,12	
Ag6	70 ± 6	0,0003	0,0014	0,10	0,35	1,6	0,0002	0,0009	0,06	0,22	
Ag7	63 ± 13	< LQ	0,0012	0,16	0,28	1,4	< LQ	0,0009	0,11	0,20	
Ag8	54 ± 15	0,0003	0,0004	0,11	0,19	1,1	0,0003	0,0003	0,10	0,17	
Ag9	42 ± 14	< LQ	0,0004	0,10	0,35	1,15	< LQ	0,0003	0,09	0,31	
B1	50 ± 9	0,0013	< LQ	0,11	0,18	1,2	0,00096	< LQ	0,09	0,15	
B2	46 ± 4	0,0042	< LQ	0,15	0,34	1,1	0,0038	< LQ	0,14	0,31	
B3	54 ± 10	0,0010	< LQ	0,26	0,24	1,6	0,0006	< LQ	0,16	0,15	
B4	44 ± 3	< LQ	< LQ	0,40	0,51	1,2	< LQ	< LQ	0,33	0,43	
B5	57 ± 15	0,0002	< LQ	0,18	0,44	1,2	0,0001	< LQ	0,15	0,37	
B6	44 ± 20	< LQ	< LQ	0,12	0,44	1,4	> LQ	< LQ	0,09	0,31	
B10	63 ± 5	< LQ	< LQ	0,14	0,44	2,4	> LQ	< LQ	0,06	0,18	

CE _{50R} (µM)			
8,8 10 ⁻³	58,8 10 ⁻³	0,096	0,56
(8,75 - 8,9 10 ⁻³)	(58,2 - 58,9 10 ⁻³)	(0,08 - 0,11)	+/- 0,10

échantillons des deux parcelles, peuvent expliquer la toxicité observée pour la plupart d'entre eux, excepté pour Ag1, Ag6 et B10 qui présentent des concentrations après dilution légèrement inférieures à la CE_{50R} du cuivre (Tableau IV-6).

Tableau IV-6: Pourcentages d'inhibition de la croissance par fluorescence de *P. subcapitata* des échantillons naturels toxiques issus des deux parcelles en 2002. Concentrations initiales en prétilachlore, en oxadiazon, en cuivre et en zinc (µM) et facteurs de dilution nécessaires à l'obtention de 50% d'inhibition de la croissance algale. Comparaison des concentrations en prétilachlore, en oxadiazon, en cuivre et en zinc (µM) résultantes de cette dilution et des 72h-CE₅₀ de référence. (< LQ: inférieur à la limite de quantification).

II-3-2-2 Inhibition de l'activité estérasiq

Une stimulation ou une activité estérasiq comparable à celle des eaux du Rhône est mise en évidence pour la majorité des échantillons recueillis sur les deux parcelles (Figure IV-7). Seuls les échantillons prélevés de mi-mai à mi-juin présentent une réponse toxique en particulier l'échantillon prélevé fin mai sur Ag dans lequel l'inhibition de l'activité estérasiq est supérieure à 50%. Comme pour les canaux de drainage, les réponses toxiques observées lors de l'étude de l'activité estérasiq sont différentes de celles obtenues lors de l'étude de l'inhibition de la croissance (Figures IV-7 et 6).

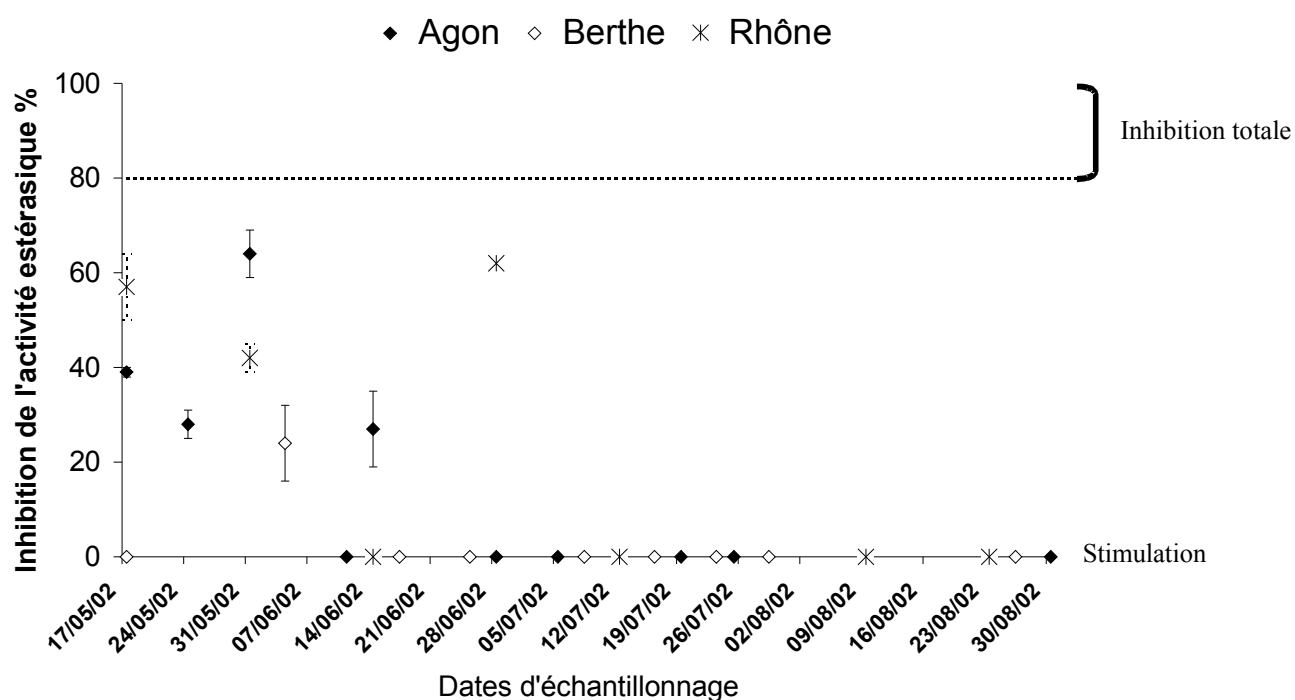


Figure IV-7: Toxicité des échantillons naturels d'eaux échantillonnées dans les deux rizières et le Rhône en 2002, exprimée en pourcentage d'inhibition de l'activité estérasique de *P. subcapitata*.

Si on compare les réponses obtenues dans les études respectives de l'inhibition de l'activité estérasique et de la croissance, on peut en déduire que, le ou les composés impliqués dans la toxicité observée de l'échantillon Ag3, semblent agir sur l'activité estérasique (Tableau IV-7). Pour tous les autres échantillons, de la parcelle Ag, à réponse toxique, le pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique proche de 30% est systématiquement inférieur à celui mesuré pour l'inhibition de la croissance (75 à 80%). Il en est de même pour le seul échantillon de la parcelle biologique à réponse enzymatique toxique inférieure à 50% d'inhibition.

	Inhibition de l'activité estérasique %	Inhibition de la croissance %
Ag1	39 ± 6	78 ± 5
Ag2	28 ± 3	79 ± 1
Ag3	64 ± 5	75 ± 3
Ag5	27 ± 8	76 ± 6
B2	24 ± 8	46 ± 4
Rh1	57 ± 7	60 ± 6
Rh2	42 ± 3	46 ± 12
Rh4	62 ± 2	81 ± 3

Tableau IV-7: Comparaison des pourcentages d'inhibition de la croissance par fluorescence et d'inhibition de l'activité estérasique de *P. subcapitata* obtenus sur les échantillons naturels toxiques communs aux deux tests. Échantillons issus des deux rizières et du Rhône en 2002.

II-3-3 Conclusions

L'évolution des concentrations en produits phytosanitaires est similaire à celle observée en 2001 avec toutefois des concentrations en prétilachlore beaucoup plus élevées en mai 2002 et des concentrations plus importantes sur le site de Fumemorte par rapport à 2001. Comme en 2001, l'oxadiazon persiste plus longtemps que le prétilachlore.

En ce qui concerne l'écotoxicologie, les résultats obtenus en 2002 sont très différents de ceux de 2001. La plupart des échantillons testés en 2002 présentent une réponse plus ou moins toxique alors qu'en 2001 seulement deux échantillons étaient positifs début mai sur le site de Grand-Mar et d'Albaron. De plus, les eaux du Rhône présentaient une stimulation algale en 2001 alors qu'en 2002 seuls les échantillons prélevés à partir de mi-juillet jusqu'à fin août sont non actifs. Ces variations peuvent être dues à la différence de sensibilité des appareils utilisés, les résultats 2001 ont été obtenus à l'Institut Forel (Suisse) alors que les échantillons prélevés en 2002 ont été étudiés à Montpellier.

Les concentrations en produits phytosanitaires mesurées en 2002 dans les canaux de drainage et le Rhône ne peuvent pas expliquer la toxicité observée sur l'ensemble des échantillons à réponse toxique. Même si les concentrations initiales en prétilachlore sont supérieures à sa 72h-CE_{50R} pour certains échantillons (GM1 et A11), ce composé ne peut être responsable de l'ensemble des réponses toxiques observées. Il en est de même pour le cuivre et le zinc présents en concentrations suffisantes pour expliquer la réponse toxique, seulement dans les échantillons A11 et Rh1 respectivement. Par contre, la présence du cuivre, en concentration totale systématiquement supérieure à sa CE₅₀ de référence, dans les eaux des deux parcelles, peut expliquer la toxicité observée pour l'ensemble des échantillons à réponse toxique. Si on considère, de plus, les concentrations estimées après dilution, elles sont quasiment toutes incluses dans l'intervalle des valeurs de cuivre engendrant une inhibition partielle, ce qui semble confirmer sa contribution à la toxicité observée dans les échantillons d'eaux issues des deux parcelles. Le cuivre mesuré dans les eaux des parcelles semble être peu complexé et facilement biodisponible pour les organismes aquatiques. Néanmoins, l'étude de la spéciation de ces eaux reste à faire pour confirmer cette hypothèse et mettre en évidence la présence de formes biodisponibles du cuivre susceptibles d'être responsables de la toxicité observée sur les eaux issues des rizières, les concentrations totales n'étant pas des données suffisantes pour conclure à sa seule implication dans la réponse toxique de ces eaux.

Les résultats obtenus sur certains échantillons (F4, Rh1, Rh2, Rh4 et Ag3) suggèrent que les contaminants impliqués dans la toxicité globale possèdent des mécanismes d'action agissant sur l'activité estérasique (% d'inhibition de la croissance similaire au % d'inhibition de l'activité estérasique) ce qui semblerait exclure le prétilachlore qui n'a pas d'effet sur l'activité estérasique de *P. subcapitata* aux concentrations testées. Ces résultats soulignent que d'autres contaminants non recherchés et non détectés lors des analyses entreprises lors de cette étude contribuent à la toxicité des échantillons issus du Rhône et des eaux issues de la riziculture camarguaise, sans oublier les produits de dégradation. En effet, la présence et la

contribution de divers produits phytosanitaires susceptibles d'être utilisés en riziculture traditionnelle (Okamura *et al.*, 2002) ne peuvent être négligées. De plus, d'autres produits phytosanitaires utilisés en agriculture peuvent également être présents en concentrations non négligeables dans les eaux de l'ensemble des canaux d'irrigation et de drainage qui sillonnent la Camargue. On peut citer sans être exhaustif, les herbicides de la famille des triazines, des sulfonilurées (autre que l'azimsulfuron) connus pour affecter les organismes primaires. (Kasai et Hatakemaya, 1993 ; Källqvist et Romstad, 1994 ; Peterson *et al.*, 1994 ; Gaggi *et al.*, 1995 ; Fahl *et al.*, 1995 ; Caux *et al.*, 1996 ; Fairchild *et al.*, 1998 ; Nyström et Blanck, 1998 ; Graymore *et al.*, 2001 ; Sabater *et al.*, 2002 ; Rioboo *et al.*, 2002). De plus, les eaux du Rhône qui constituaient notre 'référence' lors de cette étude (eaux d'irrigation) présentent une activité toxique non négligeable, même si tous les composés étudiés sont présents à des concentrations inférieures à leurs limites de quantification respectives. De par le 'bruit de fond' des eaux du Rhône, on peut également penser que les contaminants responsables de la toxicité possèdent une origine mixte. Ils peuvent avoir pour origine les diverses activités agricoles présentes en Camargue mais également provenir de la vallée du Rhône plus industrialisée. Des études récentes menées en Camargue (étang du Vaccarès en particulier) et sur le Rhône (Roche *et al.*, 2000, 2002 ; Pointet et Milliet, 2000) mettent en évidence la présence de DDT, DDE, dieldrine, lindane (insecticides organochlorés), de PCB(s) et de HAP (s), contaminants déjà retrouvés en 1973 par Herteaux *et al.*. Ces résultats soulignent une utilisation prolongée de produits phytosanitaires interdits comme la dieldrine en agriculture ainsi que l'influence de la contamination atmosphérique qui apporte des polluants-types de l'activité industrielle (PCB(s), HAP(s)) présente non loin de l'étang du Vaccarès (rejets dans le Rhône ; complexe pétrochimique de Fos/Mer par exemple) (Roche *et al.*, 2000, 2002 ; Pointet et Milliet, 2000). L'ensemble de ces composés peut être potentiellement très toxique pour la communauté algale et soulève le problème de la protection des étangs de la réserve naturelle de Camargue (le Vaccarès en particulier).

Cette étude démontre toute la complexité de l'étude de la toxicité d'échantillons environnementaux de par la diversité des contaminants présents dans les eaux et susceptibles d'agir conjointement et de contribuer à la toxicité globale. Cet aspect nous a amené à étudier en laboratoire des associations de pesticides et leurs interactions possibles, en se limitant aux trois herbicides et à des mélanges simples de deux composés.

III- Étude de l'interaction

Même si le couplage des résultats analytiques et de toxicité nous amènent à penser que les produits phytosanitaires utilisés en riziculture et étudiés semblent peu responsables des réponses toxiques observées, nous nous sommes préoccupé des interactions possibles entre ces produits phytosanitaires en se focalisant essentiellement sur les herbicides, les insecticides n'étant pas détectés et leurs CE₅₀ respectives étant bien supérieures aux concentrations attendues dans les échantillons environnementaux.

III-1 Étude de différents mélanges binaires d'herbicides

Les trois herbicides étudiés induisant des réponses différentes sur la croissance de *Pseudokirchneriella subcapitata*, cette dernière a été évaluée par fluorescence après 72h d'exposition à différentes concentrations d'azimsulfuron, d'oxadiazon et de prétilachlore associés en mélanges binaires.

III-1-1 Résultats des différentes associations binaires d'herbicides

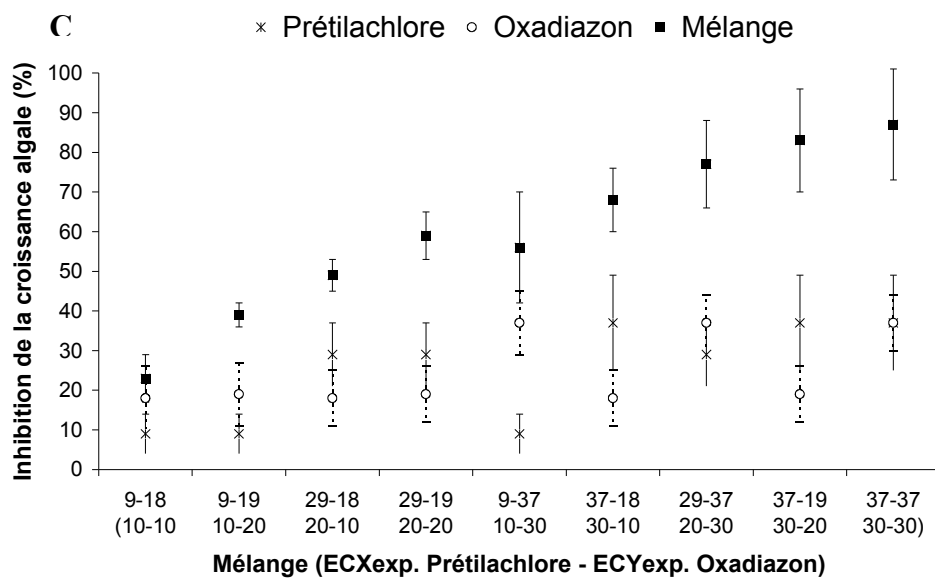
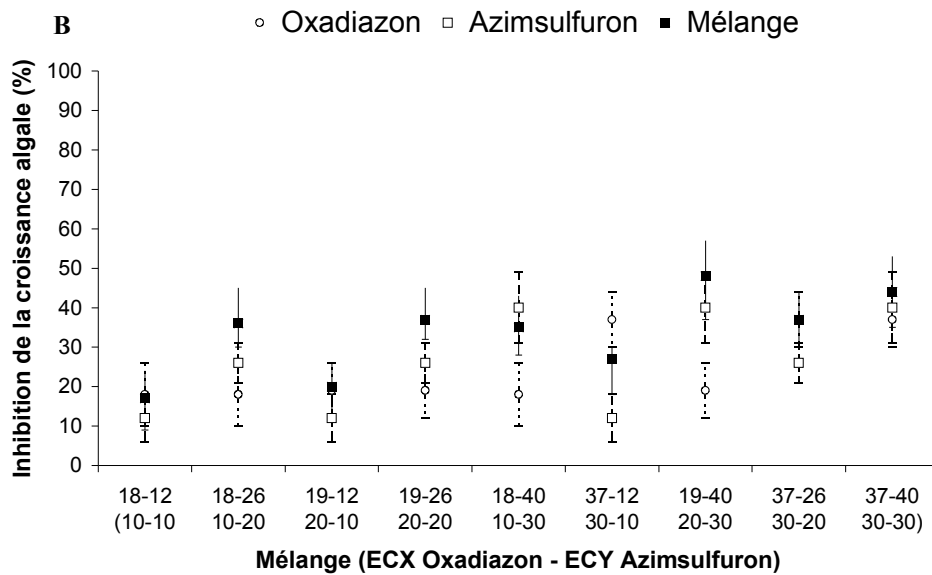
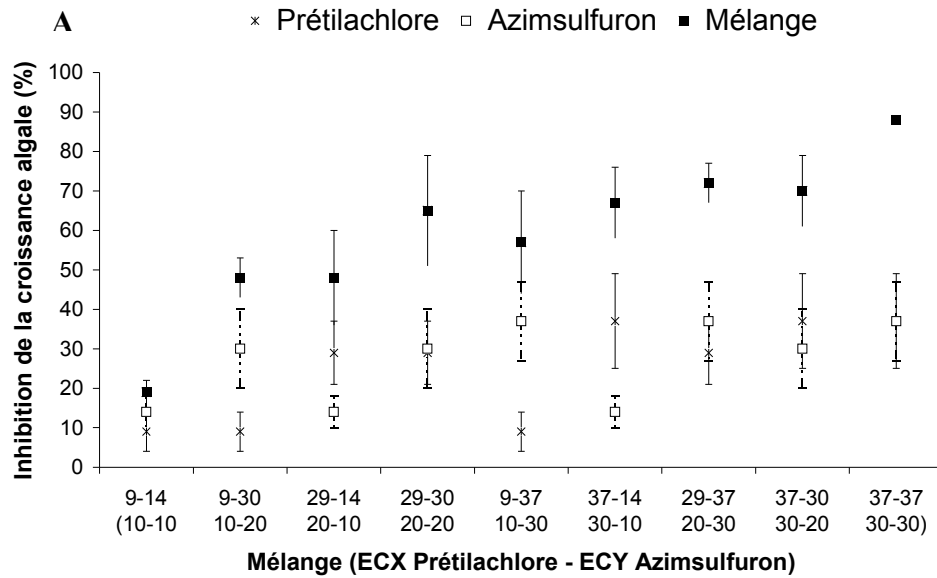
Les figures (Figures IV-8 A, B et C) présentent les résultats de toxicité, issus de mélanges binaires d'herbicides, exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance de *P. subcapitata* mesuré par fluorescence. Les mélanges binaires étudiés le sont pour diverses associations de concentrations respectivement de prétilachlore et d'azimsulfuron (A), d'oxadiazon et d'azimsulfuron (B) et de prétilachlore et d'oxadiazon (C). La composition du mélange est exprimée en fonction de l'effet attendu des substances considérées individuellement. Par exemple l'association 20-30 du mélange des herbicides X et Y, correspondra à la concentration en X entraînant une inhibition de la croissance de 20% et une concentration en Y engendrant une CE₃₀ lorsque chacun des deux herbicides est considéré seul. Dans l'hypothèse d'un effet synergique, les concentrations engendrant des effets supérieurs à 50% d'inhibition ne seront pas testées en mélange pour éviter une saturation de la mesure de la fluorescence.

Des essais préliminaires ont permis de déterminer l'erreur imputable à la variabilité intrinsèque du test à partir de 6 réplicats, cette erreur relative sera systématiquement reportée lors de l'étude des différents mélanges.

Les concentrations de chacun des pesticides étudiés seuls engendrent un effet réellement mesuré sensiblement différent de l'effet théorique attendu (10, 20 et 30%). Les effets réellement obtenus sont portés sur les figures en parallèle des effets théoriques inscrits entre parenthèse.

Figures IV-8 A, B et C: Inhibition de la croissance algale de *P. subcapitata* pour différentes combinaisons de concentrations du mélange Prétilachlore/Azimsulfuron (A), du mélange Oxadiazon/Azimsulfuron (B) et du mélange Prétilachlore/Oxadiazon (C). Entre parenthèses, les effets théoriques attendus confrontés aux effets réellement mesurés.

Impact des produits phytosanitaires issus de la riziculture
et étude de l'interaction



*Impact des produits phytosanitaires issus de la riziculture
et étude de l'interaction*

La symétrie est respectée entre les associations « inversées » pour les trois mélanges étudiés ce qui traduit que, pour chacune des combinaisons, aucun des deux herbicides n'impose son effet sur la toxicité globale du mélange en association binaire.

Dans l'environnement, en présence de plusieurs contaminants, des interactions entre contaminants aussi bien qu'une absence totale d'interaction peuvent être attendues. Les résultats de la toxicité résultante des associations binaires d'herbicides seront exprimés dans les chapitres suivants en considérant l'une ou l'autre des hypothèses.

III-1-2 Expressions des résultats en présence d'interactions: Formule d'Abbott

L'interaction entre deux herbicides peut être caractérisée grâce à la détermination d'un ratio d'inhibition (RI) (adapté de Gisi, 1996) qui représente la comparaison entre l'effet estimé du mélange (TIM) et la réponse observée (EIM). Si la valeur du RI (EIM/TIM) est supérieure à 1, cela signifie que la toxicité du mélange est supérieure à la toxicité estimée donc que l'interaction entre les deux herbicides est de type *synergique*. A l'inverse, si la valeur du RI est inférieure à 1, l'effet du mélange sur la croissance de *P. subcapitata* est moins important que ce qui est attendu. L'effet du mélange est inférieur à la somme des effets des herbicides appliqués séparément. L'interaction entre les deux herbicides est alors de type *antagoniste*. Enfin, si le RI est égal à 1, l'interaction entre les deux polluants est de type *additif*.

Sont reportés dans le tableau suivant (Tableau IV-7), les ratios d'inhibition calculés pour l'ensemble des combinaisons de concentrations testées pour les trois mélanges d'herbicides étudiés: Prétalachlore/Azimsulfuron – Oxadiazon/Azimsulfuron et Prétalachlore/Oxadiazon.

MELANGE (ECX-ECY)	10-10	10-20	20-10	20-20	10-30	30-10	20-30	30-20	30-30
	- PRETILACHLORE & AZIMSULFURON -								
Ratio d'Inhibition	1,0 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,4	1,8 ± 0,4	1,5 ± 0,4	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,02
	- OXADIAZON & AZIMSULFURON -								
RI	0,9 ± 0,4	1,3 ± 0,3	0,7 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,95 ± 0,2	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2
	- PRETILACHLORE & OXADIAZON -								
RI	1,2 ± 0,3	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,4	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,3	1,9 ± 0,3	1,7 ± 0,3

Tableau IV-7: Résultats des Ratio d'Inhibition (RI) obtenus pour les diverses associations de concentrations des différents mélanges d'herbicides étudiés.

Lorsque *P. subcapitata* est exposée pendant 72h à des mélanges binaires incluant le prétilachlore, tous les RI déterminés sont supérieurs à 1, ce qui traduit une interaction de type synergique pour toutes les associations de concentrations testées aussi bien avec l'azimsulfuron (RI compris entre 1,0 et 1,8 ± 0,2) qu'avec l'oxadiazon (RI compris entre 1,2 et 1,9 ± 0,3). Dans le cas du mélange oxadiazon/azimsulfuron, une interaction de type additif (RI = 1) voire antagoniste (RI légèrement inférieur à 1) pour certaines associations de concentrations (effets expérimentaux attendus: 20-10 et 30-10) a été, au contraire, notée.

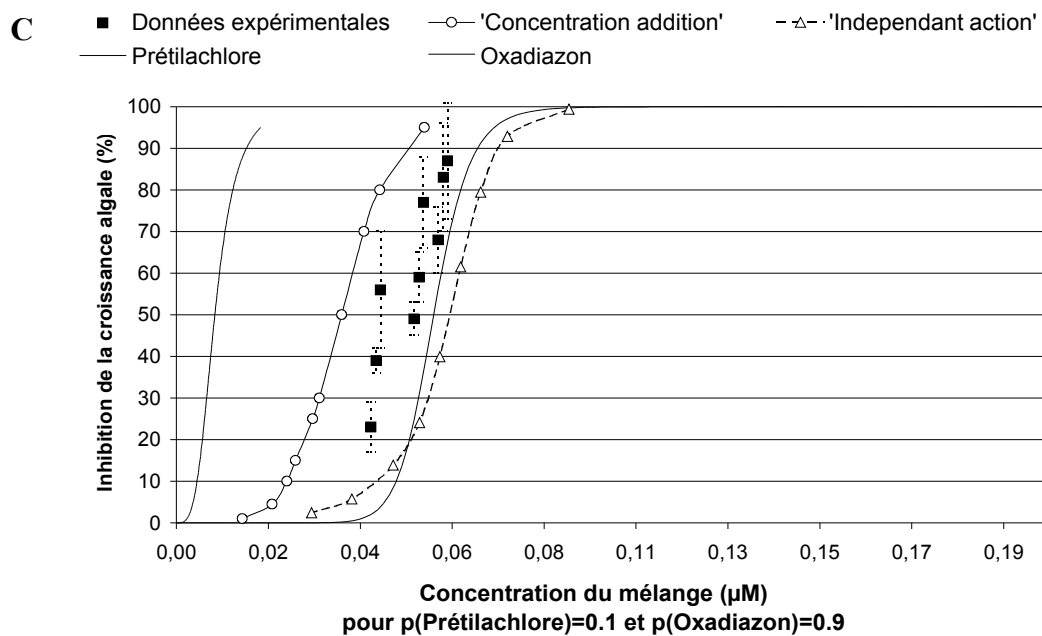
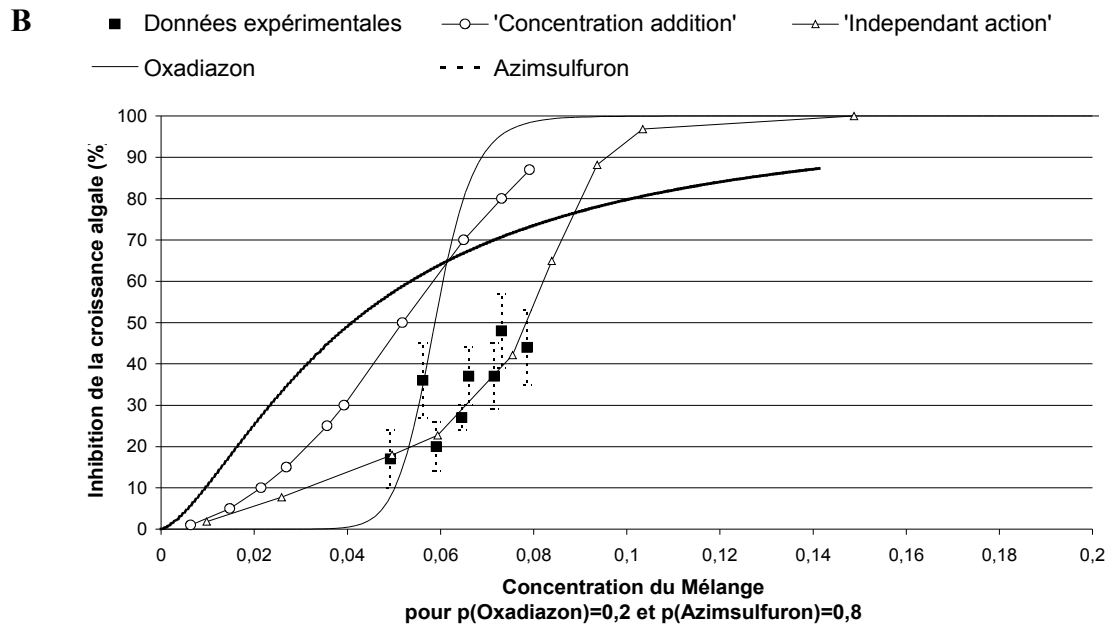
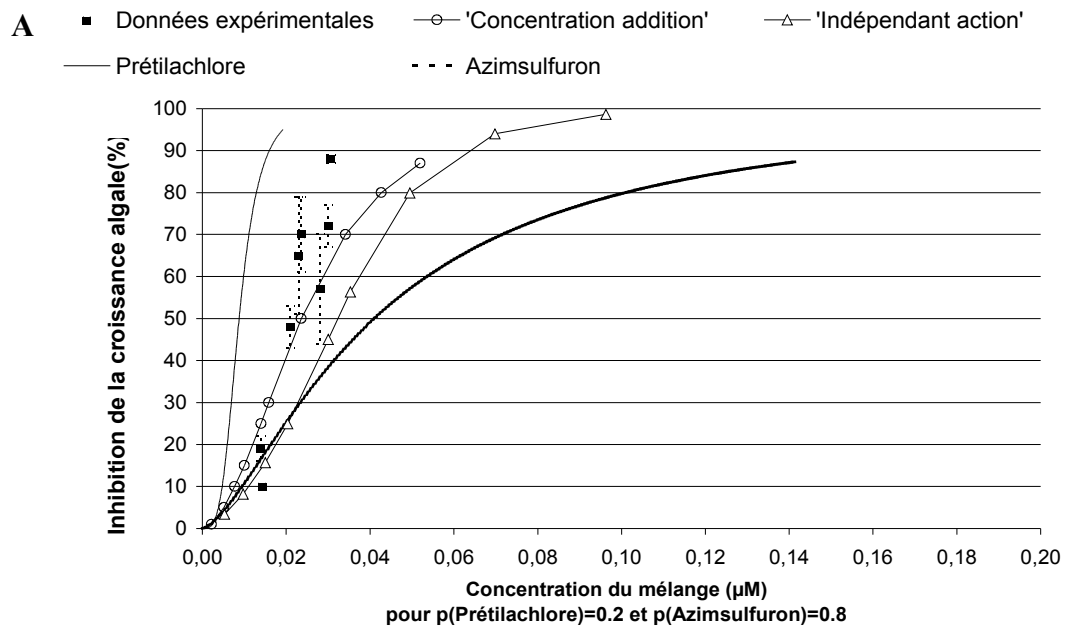
III-1-3 Expressions des résultats en absence d'interaction: Modèles prédictifs

Les deux modèles classiquement utilisés pour prédire la toxicité de mélanges complexes en absence d'interaction reprennent les concepts d'addition des doses ('Concentration Addition-CA') et d'addition des effets/réponses ('Independant Action-IA'). Ces modèles sont basés sur l'hypothèse que chacun des composés du mélange possède respectivement le même mode d'action et des modes d'action différents. On rappelle que deux des herbicides étudiés ont pour cible moléculaire une enzyme, l'oxadiazon et l'azimsulfuron agissant respectivement sur la protoporphyrinogène oxidase et l'acétolactate synthase tandis que le prétilachlore agit sur la synthèse des acides gras à longues chaînes.

Sont reportées dans les figures suivantes (Figures **IV-9 A B et C**), les données expérimentales de toxicité observées pour l'ensemble des combinaisons de concentrations testées pour les trois mélanges d'herbicides étudiés: Prétilachlore/Azimsulfuron – Oxadiazon/Azimsulfuron et Prétilachlore/Oxadiazon aux proportions respectives de 0,2 - 0,8 (Oxadiazon-Prétilachlore et Azimsulfuron) et de 0,1 - 0,9 (Prétilachlore et Oxadiazon).

Figures IV-9 A, B et C: Données expérimentales obtenues lors de l'étude de l'inhibition de la croissance algale de *P. subcapitata* pour différentes combinaisons de concentrations du mélange Prétilachlore/Azimsulfuron (**A**), du mélange Oxadiazon/Azimsulfuron (**B**) et du mélange Prétilachlore/Oxadiazon (**C**) en comparaison avec les données issues des deux modèles de prédiction de la toxicité de mélanges complexes (CA et IA) pour des proportions données en chacun des composés et les courbes dose-réponse individuelles.

Impact des produits phytosanitaires issus de la riziculture
et étude de l'interaction



Dans le cas du mélange Oxadiazon/Azimsulfuron, les données expérimentales de toxicité suivent les valeurs prédites par le modèle IA. Au contraire, les mélanges binaires incluant le prétilachlore fournissent des données expérimentales majoritairement supérieures aux valeurs de toxicité estimées par le modèle IA.

Dans le cas du mélange Prétilachlore/Azimsulfuron, l'effet du mélange semble suivre les prédictions du modèle IA pour les faibles doses et tendre vers le modèle CA pour des concentrations plus élevées voire vers des valeurs supérieures à celles prédites par le modèle additif.

En ce qui concerne, le mélange Prétilachlore/Oxadiazon, les données expérimentales ne s'intègrent dans aucun des deux modèles prédictifs de toxicité, le modèle d'action indépendante sous-estime la toxicité tandis que l'autre la surestime.

III-2 Conclusions générales

Les résultats de toxicité obtenus sur les échantillons naturels ont été mis en relation avec les résultats analytiques issus des dosages de résidus des produits phytosanitaires étudiés et de l'analyse des principaux métaux lourds détectés. Il en ressort que les concentrations en résidus de produits phytosanitaires ne peuvent pas expliquer la toxicité observée pour l'ensemble des échantillons présentant une réponse toxique. Seuls le prétilachlore et l'oxadiazon sont quantifiés dans les échantillons étudiés aussi bien au niveau des parcelles que des canaux de drainage avec des concentrations supérieures dans les eaux issues des canaux de drainage.

Même si le prétilachlore est présent à des concentrations susceptibles d'être toxiques (>72h-CE₅₀ de référence) dans certains échantillons issus des canaux de drainage, cette remarque n'est cependant, pas systématiquement valable, pour l'ensemble des échantillons présentant une réponse toxique. Par contre, la présence du cuivre en concentrations systématiquement supérieures à sa CE₅₀ de référence dans les eaux issues des deux parcelles expérimentales, peut être susceptible d'engendrer les réponses toxiques mesurées de mi-mai à mi-juillet.

Cependant, le 'bruit de fond' des eaux d'irrigation du Rhône est important. Il correspond à la réponse toxique de ces eaux, servant à l'irrigation ultérieure des rizières via les canaux, bien qu'aucun des produits phytosanitaires recherchés n'ait été détecté (<limites de quantification) et que les concentrations en métaux ne soient pas significativement différentes de celles mesurées dans les trois canaux de drainage. Il en résulte que l'interprétation finale des résultats de la toxicité observée dans les eaux issues des canaux de drainage et des rizières, doit tenir compte de la réponse des eaux du Rhône ainsi que de la présence de métabolites de dégradation, de composés non détectés (limites de quantification ou contaminants non recherchés) et des effets synergiques et/ou antagonistes résultant de l'association des différents pesticides étudiés (article en préparation).

Les résultats obtenus lors de l'étude des mélanges tendent à montrer qu'ils sont fonction des concentrations testées. Cette tendance devra être affinée et approfondie en étudiant des mélanges de deux herbicides pour des effets plus faibles (proches de la LOEC et/ou du NOEC) pour chaque produit considéré seul.

RESULTATS

***SPÉCIATION, BIODISPONIBILITÉ ET TOXICITÉ
DU CUIVRE ET DU ZINC:
Suivi expérimental du dispositif Solepur***

I- Caractérisation physico-chimique

Les échantillons prélevés sur le dispositif Solepur, ont dans un premier temps été caractérisés (ions majeurs, carbone organique dissous COD, métaux traces) en considérant les variations:

- dues à l'apport de métaux via des épandages de lisiers de porcs par l'étude de deux parcelles expérimentales (l'une ayant subi un épandage massif de lisiers - Traitée-TR et l'autre sans apport - Témoin-TE),
- temporelles lors du suivi régulier de deux saisons de drainage sur la parcelle TR.

L'étude de l'évolution des caractéristiques physico-chimiques et des concentrations métalliques a été confrontée aux résultats obtenus depuis l'arrêt des épandages par l'équipe du Cemagref de Rennes qui suit mensuellement le dispositif depuis 1993 et aux résultats obtenus par L'Herroux (1997) qui a étudié l'évolution des concentrations métalliques des eaux de drainage de 1993 à 1997 pour le manganèse, le cobalt et le cadmium et de 1995 à 1997 pour le cuivre et le zinc.

I-1 Suivi ponctuel des eaux de drainage issues des deux parcelles expérimentales: TR et TE

I-1-1 Caractérisation physico-chimique

Les eaux de drainage des parcelles TR et TE ont été caractérisées lors de deux prélèvements, réalisés *in situ* en janvier 2001 et en janvier 2002 (Tableau V-1). Les eaux de la parcelle traitée ont un pH stable légèrement moins acide (1 unité pH) que celui des eaux de la parcelle témoin. On remarque également que la charge globale des eaux est plus faible sur la parcelle TE (conductivité moyenne de 180 $\mu\text{S}/\text{cm}$) que sur la parcelle TR (460 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Les concentrations en potassium, sulfates et nitrates, apportés par les lisiers pendant les campagnes d'épandages, restent plus élevées dans les eaux issues de TR. Il en est de même pour le carbone organique dissous, avec des concentrations de 7,25 et 9,56 mg C/l dans les eaux issues de TR contre 2,35 et 3,07 mg C/l dans celles de TE. Les autres ions présentent des concentrations comparables dans les deux parcelles (Tableau V-1).

	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	pH	Cond	COD
	mM									$\mu\text{S}/\text{cm}$ 25°C	mg C/l
Parcelle traitée											
2001	1,80	0,45	0,31	0,26	0,57	1,12	0,48	0,63	6,1	437	7,25
2002	1,64	0,4	0,59	0,34	0,66	1,77	0,25	0,28	6,6	486	9,56
Parcelle témoin											
2001	0,04	0,46	0,37	0,07	< LD	0,36	0,51	0,34	5,4	157	2,35
2002	0,04	0,34	0,90	0,12	0,09	0,58	0,31	0,41	5,1	202	3,07

Tableau V-1: Caractérisation physico-chimique et concentrations en Carbone Organique Dissous (mg C/l) des eaux de drainage des parcelles TR et TE (Janvier 2001 et 2002) (< LD: inférieur à la limite de détection).

I-1-2 Concentrations en métaux (cuivre, zinc, manganèse) et métalloïde (arsenic)

Les concentrations en métaux et métalloïdes des eaux de drainage prélevées *in situ* sur les parcelles TR et TE ont été mesurées par ICP-MS et sont reportées dans le tableau suivant (Tableau V-2).

	Cu	Zn	Mn	As
μM				
Parcelle traitée				
2001	0,05	0,15	2,36	0,013
2002	0,04	0,04	0,58	0,017
Parcelle témoin				
2001	0,12	0,38	4,42	0,017
2002	0,02	0,12	0,43	0,020

Tableau V-2: Concentrations totales en cuivre, zinc, manganèse et arsenic (μM) dans la phase dissoute des eaux de drainage des parcelles TR et TE (Janvier 2001 et 2002).

Les plus fortes concentrations mesurées sont celles du manganèse en 2001, elles restent néanmoins très inférieures à la valeur moyenne de 0,27 mM reportée par l'Herroux (1997) sur les eaux de drainage de TR prélevées durant quatre années de drainage (de 1993 à 97). L'Herroux donnait une valeur moyenne de 0,9 μM de Mn pour les eaux de la parcelle témoin, valeur deux fois plus élevée que celle mesurée en 2002. Les plus fortes variations de concentrations entre 2001 et 2002 sont également notées pour cet élément aussi bien dans les eaux de drainage issues de TR que de TE.

Les plus faibles concentrations sont notées pour l'élément arsenic aussi bien dans les eaux de drainage de TR que de TE et les concentrations mesurées sont similaires pour les deux années. Les concentrations extrêmement faibles en cuivre sont du même ordre de grandeur dans les eaux des deux parcelles pour les deux années de suivi. Elles sont équivalentes aux valeurs moyennes mesurées par L'Herroux aussi bien pour TR (0,06 μM) que pour TE (0,01 μM).

Les concentrations en zinc ont diminué entre 2001 et 2002. Elles sont légèrement supérieures dans la parcelle témoin et du même ordre de grandeur que la valeur moyenne de 0,26 μM reportée par l'Herroux. Elles sont par contre nettement plus faibles que celles mesurées lors de l'arrêt des épandages dans les eaux de drainage de TR (valeur moyenne de 1 μM obtenue pour deux saisons de drainage entre 1995 et 97).

I-2 Suivi régulier de deux années de drainage sur la parcelle traitée

Deux années de drainage relativement atypiques en terme de volume d'eau drainée ont été suivies en 2000-2001 et en 2001-2002. Elles sont respectivement les saisons les plus pluvieuses et sèches actuellement enregistrées sur le site de Solepur depuis 1993. Pour la première période de drainage, la lame d'eau drainée a été de 2000 m^3 et est inférieure à 500 m^3 pour la seconde période (Figure II-4). En 2000-2001, le drainage cumulé a été de 610 mm pour 140 mm en 2001-2002 (au lieu de 300 - 400 mm pour une année moyenne).

Depuis l'arrêt des épandages en 1996, on observe une tendance à la diminution des concentrations de l'ensemble des cations (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} et Ca^{2+}) et des anions analysés (Cl^- ,

NO₃⁻ et SO₄²⁻) (Martinez et Peu, 1999-2000b). Cette tendance reste confirmée pour les deux années de drainage suivies (2000-2001 et 2001-2002).

Les analyses ont porté sur une séquence de 14 échantillons pour la saison de drainage 2000-2001 et de 5 pour celle de 2001-2002. Les caractéristiques physico-chimiques des eaux de drainage sont présentées dans le tableau V-3.

Saisons de drainage	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻
	mM							
2000-2001 n = 14	2,1 ± 0,1 (2,0 - 2,3)	0,5 ± 0,03 (0,49 - 0,58)	0,4 ± 0,02 (0,33 - 0,38)	0,3 ± 0,02 (0,27 - 0,33)	0,8 ± 0,1 (0,6 - 1,0)	1,2 ± 0,3 (0,8 - 1,6)	0,7 ± 0,2 (0,4 - 1,0)	0,6 ± 0,2 (0,4 - 1,1)
2001-2002 n = 5	1,4 ± 0,4 (1,1 - 1,7)	0,4 ± 0,1 (0,3 - 0,5)	0,3 ± 0,1 (0,2 - 0,3)	nd nd	0,6 ± 0,1 (0,4 - 0,7)	0,8 ± 0,2 (0,6 - 0,9)	0,45 ± 0,2 (0,3 - 0,7)	0,4 ± 0,01 (0,3 - 0,4)

Tableau V-3: Caractérisation physico-chimique des eaux de drainage issues de la parcelle soumise à épandage et collectées entre octobre 2000 et mars 2002. (*Moyenne ± écart-type, intervalle valeurs min-max, nd: non déterminé*).

Les ions dominants sont identiques quelle que soit la période étudiée, à savoir, le potassium, les sulfates et les nitrates. Ces ions ont été apportés par les lisiers sans transformation biologique pour les deux premiers et les nitrates proviennent de l'oxydation des ions NH₄⁺ notamment et de la matière organique azotée.

Les concentrations en métaux mesurées en 2000-2002 (Tableau V-4) sont de l'ordre de 0,15 µM pour le zinc et de 0,08 µM pour le cuivre. Depuis l'arrêt des épandages, une tendance à la diminution des concentrations métalliques en zinc est observée sur le dispositif Solepur. L'Herroux (1997) notait en effet une concentration en zinc supérieure à 1,5 µM. Pour le cuivre, des variations de 0,02 à 0,09 µM, équivalentes à celles mesurées en 2000-2002, avaient été observées.

Saisons de drainage	2000-2001	2001-2002
	n=14	n=5 et 3*
Cu (µM)	0,07 ± 0,02 (0,06 - 0,1)	0,08 ± 0,03* (0,04 - 0,1)
Zn (µM)	0,15 ± 0,04 (0,07 - 0,25)	0,11 ± 0,03 (0,07 - 0,13)

Tableau V-4: Concentrations en cuivre et zinc total (µM) dans les eaux de drainage collectées au cours de la période 2000–2002 dans la parcelle soumise à épandage. (*Moyenne ± écart-type, intervalle valeurs min-max*)

I-3 Caractérisation des solutions de sol

De par les faibles concentrations en cuivre et en zinc mesurées dans les eaux de drainage, il a été décidé de mettre davantage l'accent sur les eaux liées du sol potentiellement plus concentrées en métaux. Les conditions d'extraction ont été présentées et détaillées dans le tableau II-

9. Les chapitres suivants vont illustrer les principaux résultats obtenus sur les solutions de sol issues exclusivement de la parcelle traitée, en terme de distribution des ions majeurs, des métaux et des métalloïdes totaux.

I-3-1 Caractérisation physico-chimique

La distribution des éléments majeurs a été étudiée dans des solutions de sol extraites à partir d'échantillons de sol sec des horizons 0-20 et 40-60 cm prélevés en 1996 (arrêt des épandages) et en 1999 sur la parcelle TR. Les ions majeurs extraits des sols montrent des concentrations qui varient dans le temps et avec la profondeur (Tableau V-5).

Horizons	1996		1999	
	0-20cm	40-60cm	0-20cm	40-60cm
Cl ⁻ (mM)	1,04	1,33	0,88	1,06
SO ₄ ²⁻ (mM)	0,52	0,46	0,47	0,33
Ca ²⁺ (mM)	0,64	0,32	1,87	0,47
Na ⁺ (mM)	0,87	1,00	0,36	0,52
Mg ²⁺ (mM)	0,72	0,74	1,36	0,59
COD (mg C/l)	433,0	114,5	nd	35,1

Tableau V-5: Caractéristiques physico-chimiques et concentrations en Carbone Organique Dissous (mg C/l) des solutions de sol extraites des horizons 0-20 cm et 40-60 cm en 1996 et 1999 sur la parcelle TR.

(Extraction au KNO₃ 0,005 M, extraction de 20 minutes, centrifugation 1 minute à 5000 tr/min. nd: non déterminé).

Il ressort de la caractérisation des solutions de sol que les concentrations en ions majeurs sont plus élevées que dans les eaux de drainage (deux à quatre fois plus de Ca²⁺ et Mg²⁺ dans les extraits de sol) alors que celles en COD sont très supérieures (7,0 à 9,6 mg/l de C pour les eaux de TR pour des concentrations supérieures à 100 mg C/l dans les solutions de sol).

I-3-2 Distribution du zinc et du cuivre dans les solutions de sol

Les concentrations en métaux (cuivre et zinc) des solutions de sol extraites de l'horizon de surface sont près de 2 à 4 fois plus élevées que celles de l'horizon profond (Figure V-1) et près de 40 fois supérieures à celles mesurées dans les eaux de drainage en 2002. Les concentrations en cuivre et en zinc ont diminué dans tous les horizons depuis l'arrêt des épandages excepté pour le zinc dans l'horizon 0-20 cm. Pour le zinc, la plus forte diminution est observée dans l'horizon profond (40-60 cm). Pour le cuivre, cette diminution est plus marquée dans les horizons supérieurs (0-20 et 20-40 cm). Les solutions de sol sont plus concentrées en zinc qu'en cuivre pour les horizons superficiel et profond, la tendance étant inversée pour l'horizon intermédiaire.

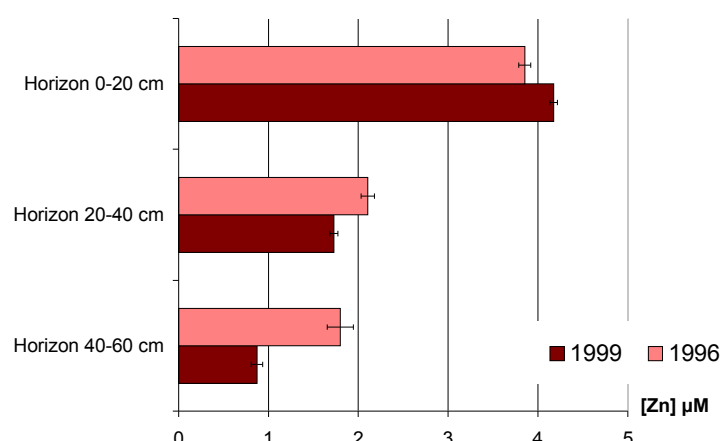
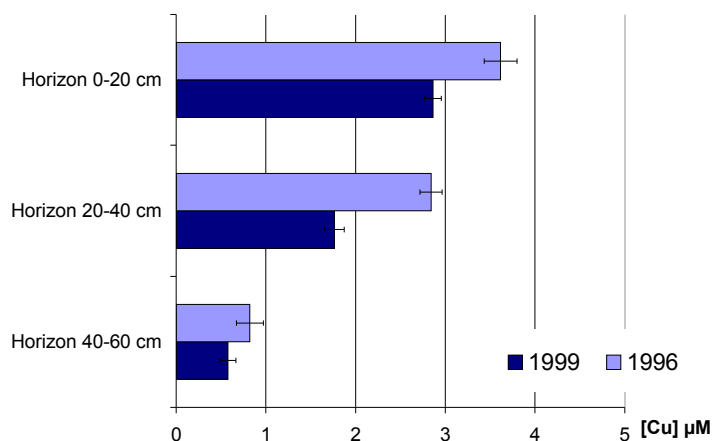


Figure V-1: Concentrations en Cu et Zn total (μM) dans les solutions de sol 1996 et 1999 en fonction de la profondeur.

II- Étude de la toxicité

II-1 Toxicité des eaux de drainage issues des deux parcelles expérimentales

Les concentrations totales en zinc mesurées dans les eaux de drainage issues des deux parcelles expérimentales, sont systématiquement inférieures à la 72h- CE_{50} de référence du zinc ($0,56 \pm 0,10 \mu\text{M}$) aussi bien dans les eaux de TR (0,15 et 0,04 μM) que de TE (0,38 et 0,12 μM) pour les deux années d'étude (Tableau V-2). Pour le cuivre, les concentrations dans les eaux de la parcelle TR (0,05 et 0,04 μM) sont systématiquement inférieures à la 72h- $\text{CE}_{50\text{R}}$ du cuivre ($0,08 - 0,11 \mu\text{M}$). Par contre dans les eaux de la parcelle TE, si en 2002 la concentration en cuivre total (0,02 μM) est très inférieure à la 72h- $\text{CE}_{50\text{R}}$ du cuivre, celle de 2001 (0,12 μM) est quant à elle légèrement supérieure à la valeur de référence (Figure V-2). Pourtant, aucun des échantillons d'eaux de drainage analysés ne présente de toxicité directe pour les deux dates de prélèvement indépendamment de la parcelle et du paramètre d'effet considéré.

Lors des bioessais, des additions de cuivre ont été effectuées dans les échantillons d'eaux de drainage issues des deux parcelles étudiées. En parallèle, la méthode des ajouts dosés de cuivre sera également menée lors de l'analyse de spéciation en DPASV de ces mêmes échantillons, de façon à étudier les éventuelles relations pouvant exister entre la répartition des différentes espèces du cuivre et la toxicité résultante de ces additions de cuivre. Les résultats de cette étude complémentaire seront développés dans le paragraphe IV de ce chapitre.

Pour les eaux issues de la parcelle traitée, les ajouts en cuivre nécessaires pour obtenir une inhibition de la croissance algale de 50% donnent au final des concentrations totales en cuivre supérieures à la 72h- CE_{50} de référence du cuivre. En ce qui concerne la parcelle TE, les ajouts effectués sur les eaux prélevées en 2002 engendrent une concentration totale finale égale à la 72h- $\text{CE}_{50\text{R}}$ du cuivre (Figure V-2).

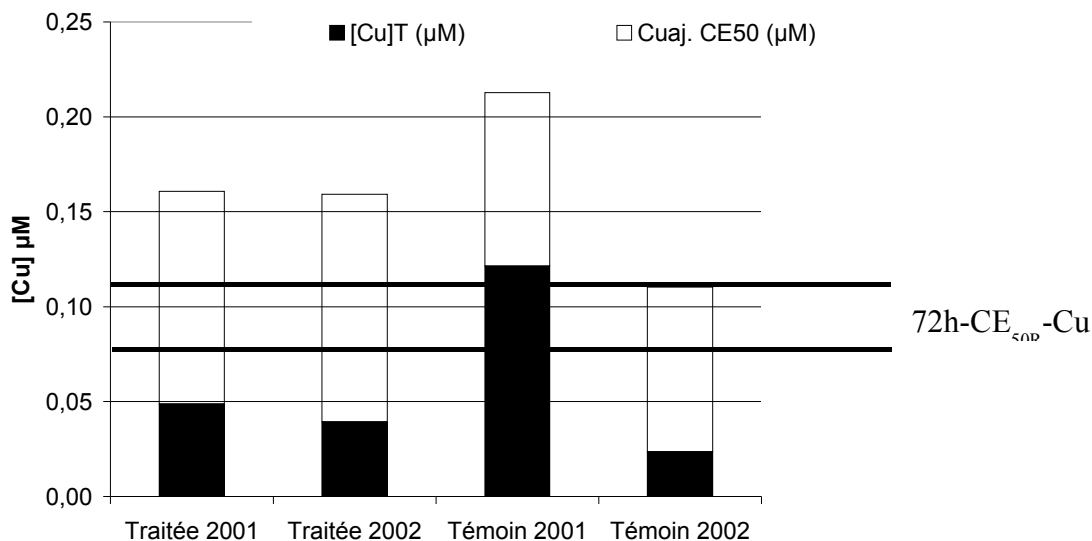


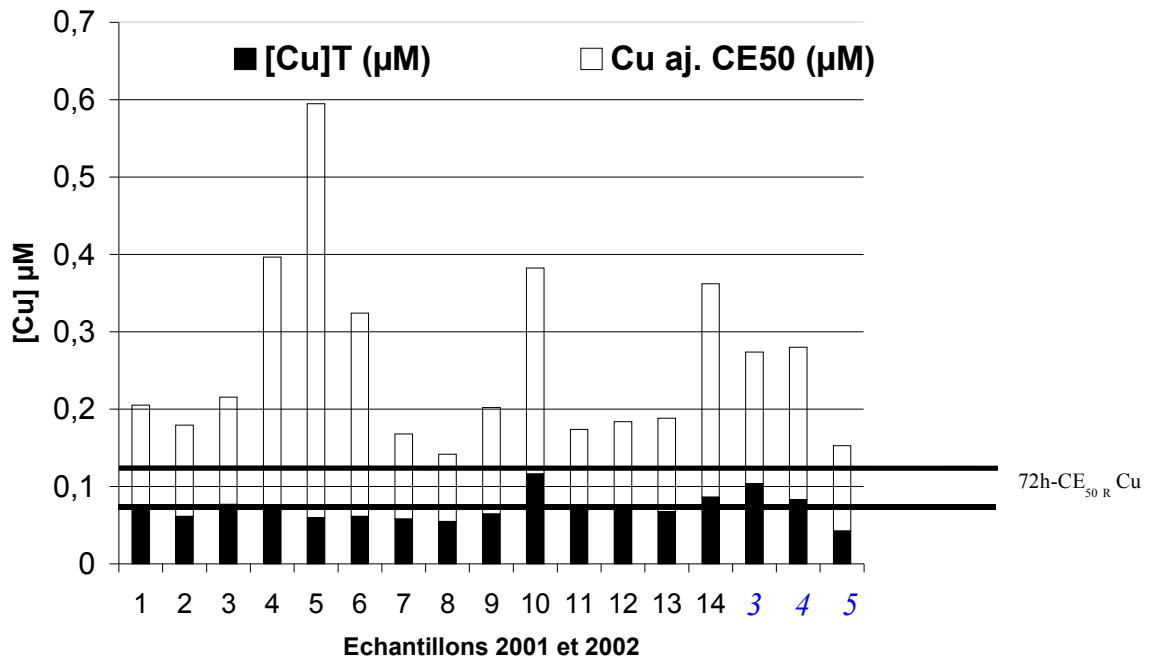
Figure V-2: Concentrations en cuivre total (μM) des échantillons d'eaux de drainage prélevées sur les parcelles TR et TE et concentrations en cuivre ajouté afin d'obtenir une inhibition partielle de la croissance algale.

II-2 Toxicité des eaux de drainage de la parcelle traitée lors du suivi des deux saisons de drainage

Les biotests conduits sur les échantillons d'eaux de drainage prélevés régulièrement sur la parcelle TR en 2000-2002 n'ont révélé aucune toxicité directe aussi bien en 2001 qu'en 2002 (Figure V-3). Ces résultats sont en accord avec les faibles concentrations métalliques mesurées ($[\text{Cu}]_{\text{moy}} = 0,08 \mu\text{M}$ $[\text{Zn}]_{\text{moy}} = 0,15 \mu\text{M}$) reportées dans le tableau V-4.

Une stimulation algale a, par ailleurs, été mise en évidence sur les échantillons 4, 5, 6, 10 et 14 prélevés en 2001. Pour ces cinq échantillons, les concentrations en cuivre ajoutées nécessaires pour obtenir une inhibition partielle de la croissance algale sont beaucoup plus importantes (de 0,26 à 0,54 μM Cu) que pour les autres échantillons prélevés en 2000-2001 (0,09 à 0,14 μM Cu) et dépassent de manière significative la 72h- CE_{50} de référence du cuivre comprise entre 0,08 - 0,11 μM . Pour ces cinq échantillons, la concentration totale en cuivre nécessaire pour inhiber 50% de la croissance algale correspond au double de la concentration finale obtenue pour l'ensemble des autres échantillons (Figure V-3).

Figure V-3: Concentrations en cuivre total (μM) des eaux de drainage prélevées lors du suivi des deux années de drainage et concentrations en cuivre ajouté afin d'obtenir la CE_{50} .



On remarque que les échantillons 3 et 4 prélevés en 2001-2002 nécessitent également des ajouts en cuivre plus importants (respectivement 0,17 et 0,20 μM Cu) que pour la majorité des échantillons et présentent des concentrations finales en cuivre proches de 0,30 μM contre 0,14 - 0,22 μM pour la majorité des autres échantillons étudiés (Figure V-3), alors qu'un développement normal des algues a été observé sur ces échantillons. On note également que les échantillons 8 et 5 prélevés respectivement en 2001 et 2002 présentent une concentration totale en cuivre proche de celle mesurée dans les eaux de la parcelle TE en 2002.

Il ressort que le pouvoir complexant des échantillons étudiés au cours des deux saisons de drainage et l'effet protecteur vis à vis du cuivre des ligands présents dans ces eaux ne sont pas identiques pour l'ensemble des échantillons. La plupart des échantillons présente un comportement similaire vis à vis des ajouts de cuivre nécessaires pour l'obtention d'une inhibition de la croissance de 50% (concentration finale en cuivre proche de 0,14 - 0,22 μM) alors que certains échantillons ont des comportements très différents. Ces eaux nécessitent soit des ajouts en cuivre très importants proches de ceux nécessaires pour obtenir une inhibition totale de la croissance algale dans les deux échantillons prélevés *in situ* sur la parcelle TR, soit des additions équivalentes à celles nécessaires pour atteindre l'inhibition partielle de la croissance algale dans l'échantillon prélevé en 2002 sur TE.

II-3 Toxicité des solutions de sol

La toxicité des eaux liées du sol de la parcelle TR, plus concentrées en cuivre et en zinc et donc potentiellement plus toxiques pour les algues, a également été étudiée.

Une toxicité directe a été observée pour tous les échantillons étudiés. Les concentrations en cuivre et en zinc dans les solutions de sol sont, par ailleurs, très supérieures aux 72h-CE₅₀ de référence, aussi bien du cuivre (0,08 – 0,11 µM) que du zinc (0,56 ± 0,10 µM) (Tableau V-6). Une inhibition totale de la croissance algale (CE₁₀₀) a été obtenue pour les extraits issus de l'horizon profond des sols (40-60 cm) pour les deux années étudiées. Pour les autres extraits, une inhibition de 50% de la croissance algale est notée.

Profondeur (cm)	Toxicité	Dilution (CE ₅₀)	[Cu] _T (µM)	[Zn] _T (µM)
1996				
0-20	CE ₅₀		3,6 ± 0,2	3,85 ± 0,1
20-40	CE ₅₀		2,8 ± 0,1	2,1 ± 0,1
40-60	CE ₁₀₀	4	0,8 ± 0,15	1,8 ± 0,15
1999				
0-20	CE ₅₀		2,9 ± 0,1	4,2 ± 0,04
20-40	CE ₅₀		1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,04
40-60	CE ₁₀₀	1,3	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,06

Tableau V-6: Toxicité observée sur *P. subcapitata* des solutions de sol extraites des différents horizons de sols prélevés sur TR en 1996 et 1999. Dilution nécessaire pour obtenir 50% d'inhibition de la croissance sur les échantillons présentant une toxicité directe et concentrations en cuivre et zinc total.

III- Étude de la spéciation

L'analyse de spéciation du cuivre et du zinc a été réalisée, par DPASV en mode HMDE, uniquement dans les eaux de drainage issues des deux parcelles expérimentales (TR et TE) lors du suivi ponctuel. On rappelle que le cuivre sous forme libre (Cu²⁺) apparaît à un potentiel de pic (Ep) de +0,03 V et le zinc libre (Zn²⁺) à -1,0 V dans un milieu non complexant (KNO₃, 0,1 M) avec les conditions d'expérimentation suivantes : temps d'électrolyse de 180 secondes, amplitude des impulsions de 50 mV et balayage de 2 mV/s (Tableau II-2). Tous les potentiels de pic sont exprimés par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl(s) (KNO₃, 0,1M) et avec une déviation standard de ± 10 mV.

III-1 Étude de la spéciation des échantillons naturels d'eaux de drainage des deux parcelles expérimentales

L'analyse polarographique des eaux de drainage n'a pas été exclusivement focalisée sur le cuivre mais étendue à d'autres éléments métalliques électrochimiquement labiles en choisissant un potentiel de déposition de - 1,65V.

Les polarogrammes obtenus sur les eaux de drainage prélevées en janvier 2001 et 2002 sur les deux parcelles expérimentales (Figure V-4) permettent d'identifier du zinc sous forme libre (Ep = - 0,996 et -1,0 V respectivement sur les parcelles TE et TR). Par ailleurs, aucun signal n'est identifié comme étant du cuivre libre aussi bien en 2001 qu'en 2002.

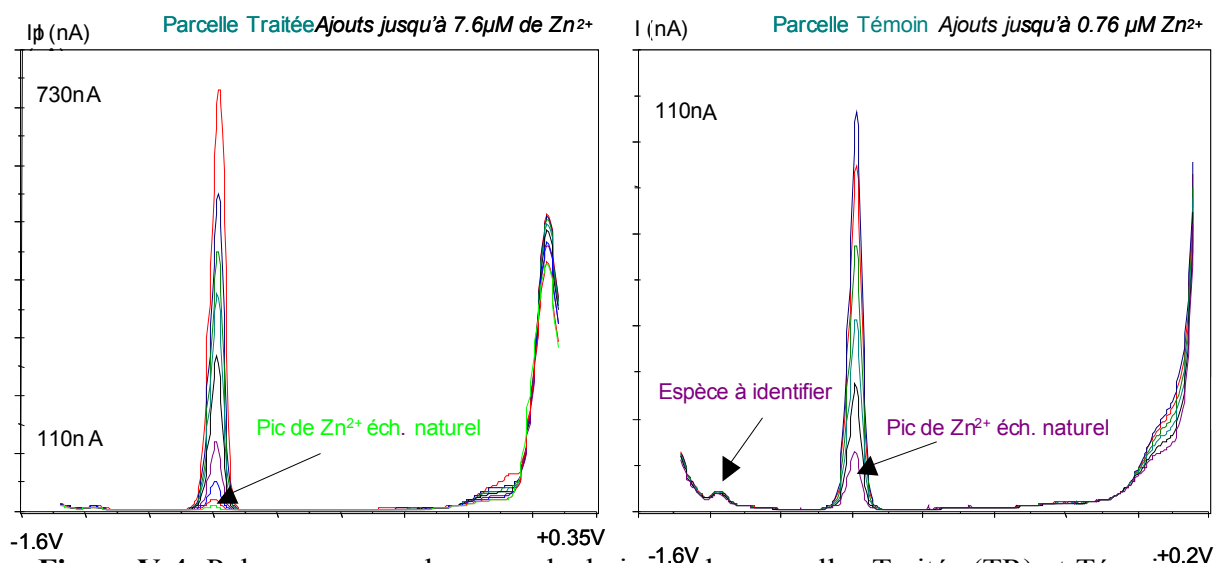


Figure V-4: Polarogrammes des eaux de drainage des parcelles Traitée (TR) et Témoin (TE) en 2002 suite à des ajouts successifs de Zn^{2+} .

(Conditions expérimentales: Potentiel de déposition: $-1,65$ V, durée de l'électrolyse: 180 secondes, amplitude des pulsations 50 mV, balayage du potentiel de $-1,65$ à $+0,2$ V à 2 mV/s).

La présence d'un pic de zinc libre rend possible la quantification du zinc sous forme ionique à partir de la courbe d'étalonnage présentée sur la figure II-1 (Chapitre Méthodologies).

En 2002, la concentration en zinc libre ($[Zn^{2+}]$) est de $0,05$ μ M sur la parcelle TE et de $0,02$ μ M sur la parcelle TR. Cela représente 40 et 50% du zinc total. Le cuivre, par contre, est entièrement et fortement complexé donc non quantifiable en DPASV sans traitement préalable de l'échantillon (acidification et destruction de la matière organique par rayonnements UV par exemple).

Un autre pic a été obtenu uniquement sur les échantillons issus de la parcelle TR (Figure V-4) à un E_p de $-1,46$ V, potentiel qui ne correspond à aucune des espèces identifiées et étudiées jusqu'alors (Tableau II-2). Différentes hypothèses ont été émises pour identifier ce pic: présence d'un complexe de faible stabilité (ZnL) ou réduction d'un cation métallique présent en concentration importante. Parmi les principaux éléments apportés par le lisier, le manganèse et le cobalt sont retrouvés dans les eaux de drainage à des concentrations respectives dans les parcelles traitée et témoin de $2,5$ et $4,4$ μ M pour le Mn et de $0,080$ et $0,025$ μ M pour le Co (valeurs 2001, les concentrations mesurées en 2002 sont plus faibles pour les deux éléments) et le pic pourrait leur être attribué.

Néanmoins, dans les conditions expérimentales choisies, la réduction du cobalt ne se produit pas. Les ajouts successifs de Co ont pour conséquence une diminution significative du pic présent à l' E_p de $-1,46$ V. Aucun pic caractéristique de cette espèce n'est, par ailleurs, détecté.

Par contre, l'étude par ajouts successifs de Mn^{2+} dans ce milieu a permis de démontrer qu'il était réductible à $-1,46$ V (Figure V-5) et que la courbe associée aux additions est linéaire (Tableau V-7), on ne peut toutefois pas exclure la réduction d'autres composés à cet E_p .

Ajouts dosés de Mn µg/l	Intensité de courant nA	Ep V
échantillon naturel	2,98	-1,46
50	3,99	-1,46
150	5,71	-1,46
350	8,75	-1,46
650	13,10	-1,46

Tableau V-7: Résultats de la méthode des ajouts dosés de Mn^{2+} sur une eau de la parcelle TE, exprimés en intensité de courant (nA) et potentiel de pic (Ep en V).

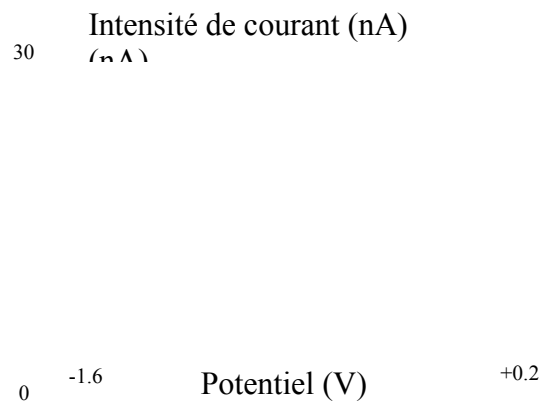


Figure V-5: Polarogramme obtenu suite à des ajouts dosés de Mn^{2+} sur un échantillon naturel d'eau de drainage recueillie sur la parcelle Témoin.

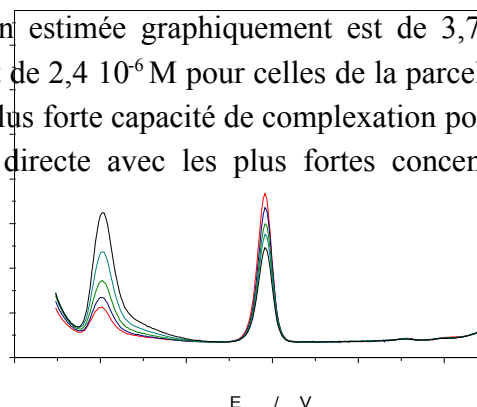
(Conditions expérimentales: Potentiel de déposition: -1,65 V, durée de l'électrolyse: 180 secondes, amplitude des pulsations 50 mV, balayage du potentiel de -1,65 à +0,2 V à 2 mV/s).

III-2 Estimation graphique et par le calcul de la capacité de complexation du cuivre dans les eaux de drainage des parcelles témoin et traitée

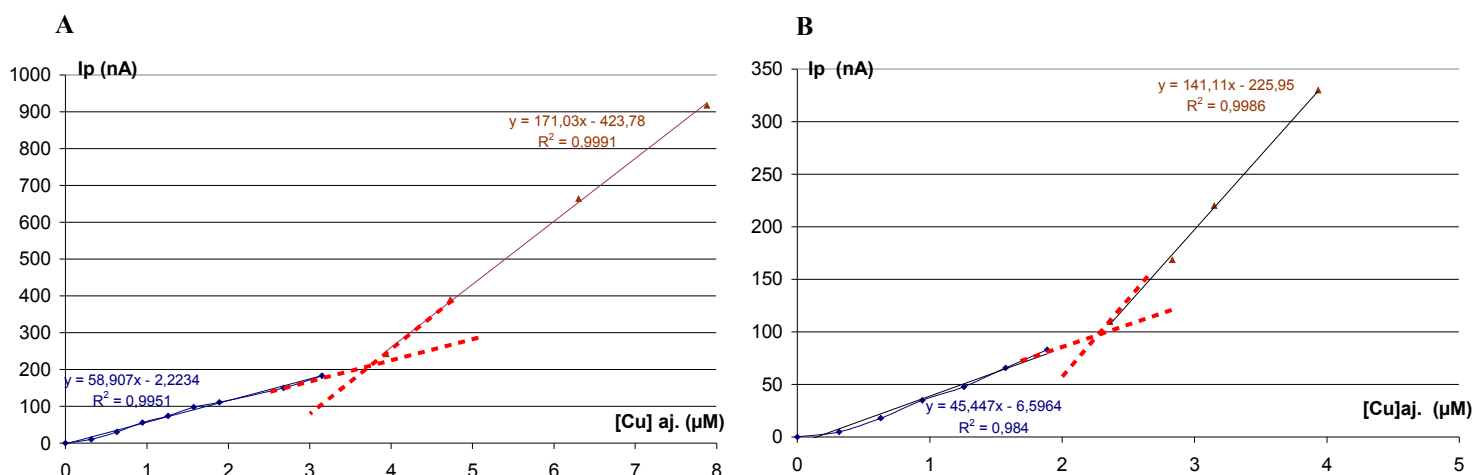
III-2-1 Détermination graphique de la capacité de complexation et de la constante de stabilité: exemple des eaux de drainage prélevées en 2001 sur les deux parcelles expérimentales

Lors de l'analyse par DPASV de la spéciation de ces eaux, des ajouts de 0,31 en 0,31 µM de cuivre puis des additions régulières de 1,57 µM ont été effectués jusqu'à l'obtention du pic caractéristique de l'ion libre ($E_p = +30 \pm 10$ mV) de façon à déterminer la CC du cuivre dans les eaux de drainage.

La capacité de complexation estimée graphiquement est de $3,75 \cdot 10^{-6}$ M pour les eaux de drainage de la parcelle TR et de $2,4 \cdot 10^{-6}$ M pour celles de la parcelle TE en 2001 (Figures V-6 A et B). Ce qui traduit une plus forte capacité de complexation pour le cuivre dans les eaux de la parcelle TR en relation directe avec les plus fortes concentrations en COD dans ces échantillons.



Les résultats obtenus en 2002 sur les eaux de drainage des parcelles TE et TR après estimation graphique suivent les mêmes tendances que celles observées en 2001, soit une plus forte capacité de complexation pour la parcelle TR (3,15 et 0,70 μM respectivement pour TR et TE). Les log K calculés sur ces échantillons sont proches et caractéristiques de complexes facilement dissociables (Tableau V-8).



Figures V-6 A et B: Estimation graphique de la capacité de complexation (CC) pour le cuivre dans les eaux de drainage issues de la parcelle traitée (A) et témoin (B) en 2001 à partir des courbes obtenues par la méthode des ajouts dosés de cuivre.

III-2-2 Linéarisation de Ruzic

Les capacités de complexation estimées graphiquement et calculées par la linéarisation de Ruzic (Tableau V-8) donnent des valeurs très proches. La parcelle TR présente des CC identiques pour les deux années d'étude alors que celles de la parcelle TE sont très différentes. Les eaux prélevées en 2002 possèdent une CC inférieure à 1 μM pour une CC comprise entre 3 et 4 μM de cuivre en 2001.

	Graphiquement		Ruzic	
	CC	logK	CC	logK
	μM		μM	
TR 01	3,75	5,7	3,9	6,4
TR 02	3,15	5,3	3,95	7,1
TE 01	2,4	5,9	4,2	6,8
TE 02	0,7	6,3	0,8	7,9

Tableau V-8: Compilation des valeurs de capacité de complexation (CC) et de log K estimées graphiquement et par la linéarisation de Ruzic et obtenues sur les eaux de drainage issues des deux parcelles expérimentales pour les deux années d'étude.

III-3 Étude de la spéciation des solutions de sol

L'étude polarographique des solutions de sol permet de mettre en évidence que le zinc est pour moitié sous forme libre, le cuivre est, quant à lui, totalement complexé et aucune espèce de cuivre labile n'est détectée par DPASV dans l'ensemble des solutions de sol étudiées.

Si on se réfère aux résultats de toxicité observée sur les solutions de sol de la parcelle TR en 1999, les concentrations en zinc libre suffisent, seules, à expliquer la toxicité observée pour les horizons superficiel et intermédiaire (Tableau V-9).

Profondeur (cm)	Toxicité	Dilution (CE ₅₀)	[Zn] _T μM	[Zn ²⁺] %
1999				
0-20	CE ₅₀		4,2 ± 0,04	35
20-40	CE ₅₀		1,7 ± 0,04	42
40-60	CE ₁₀₀	1,3	0,9 ± 0,06	47
			72h Zn-CE ₅₀ -référence 0,56 ± 0,10 μM	

Tableau V-9: Toxicité des solutions de sol extraites des différents horizons de sol de la parcelle TR en 1999, observée sur *P. subcapitata*. Concentrations totales en zinc et pourcentage en zinc ionique mesuré en DPASV et comparaison avec la 72h-CE₅₀ de référence du zinc.

Le chapitre suivant va nous permettre d'étudier les relations potentielles pouvant exister entre la nature et la répartition des différentes espèces du cuivre et la toxicité observée dans les échantillons d'eaux de drainage des deux parcelles expérimentales en croisant les informations chimiques et biologiques obtenues suite à des ajouts dosés de cuivre effectués en parallèle lors des biotests et de l'analyse de spéciation par DPASV.

IV- Relations potentielles entre la spéciation du cuivre et la toxicité

IV-1 Croisement des informations chimiques et biologiques

Cette étude a été effectuée sur des échantillons d'eaux de drainage issues des deux parcelles expérimentales, initialement non toxiques. Des additions de 0,10 ; 0,20 ; 0,39 ; 0,79 ; 1,57 ; 3,15 et 6,29 μM de cuivre ont été effectuées, lors des biotests, en parallèle des ajouts menés lors de l'analyse de leur spéciation par DPASV.

Pour cette étude, le logiciel Regtox nous a permis d'estimer les ajouts nécessaires pour obtenir l'émergence de la toxicité (CE₁₀) ainsi que l'inhibition partielle (CE₅₀) et totale (CE₁₀₀) en posant l'hypothèse que le cuivre ajouté sous forme Cu(II) dans les échantillons initialement non toxiques est responsable de la toxicité observée (CE₁₀, 50 et 100). Les additions de cuivre nécessaires pour obtenir les CE₁₀ et 50 sont trop faibles pour être comparées à celles effectuées lors de l'étude des eaux de drainage par DPASV (Tableau V-10). Nous avons été contraints de comparer la correspondance avec les résultats obtenus par la méthode des ajouts dosés en DPASV pour des additions équivalentes ou proches de celles nécessaires pour obtenir une

inhibition totale de la croissance algale de *P. subcapitata* (CE_{100}) (Tableau V-10). On souligne que les concentrations totales en cuivre nécessaires pour obtenir une toxicité totale (CE_{100}), sont 7 à 9 fois plus élevées par rapport à la concentration initiale pour les eaux de drainage de la parcelle TR (2001 et 2002) et de 2,6 à 13 fois supérieures pour celles de la parcelle TE (2001 et 2002). Les potentiels de pic caractéristiques des espèces mises en évidence pour des ajouts de cuivre entraînant la CE_{100} sont également reportés dans ce tableau.

	CE_{10} μM (intervalle de confiance 95%)	CE_{50} μM (intervalle de confiance 95%)	[Cu]ajouté (CE_{100}) μM	[Cu]ajouté DPASV (μM) et Ep (mV \pm déviation standard)
TR 01	0,06 (0,059 - 0,078)	0,11 (0,109 - 0,118)	0,2	0,31 - 61,5 \pm 10
TR 02	0,05 (0,050 - 0,054)	0,12 (0,119 - 0,122)	0,2	0,79 - 54,0 \pm 10
TE 01	0,03 (0,024 - 0,034)	0,09 (0,087 - 0,095)	0,1	0,31 - 48,6 \pm 10
TE 02	0,04 (0,039 - 0,043)	0,086 (0,085 - 0,087)	0,2	0,31 - 59,0 \pm 10

Tableau V-10: Ajouts de cuivre (μM) nécessaires pour obtenir les $CE_{10, 50}$ (estimation Regtox - intervalle de confiance 95%) et CE_{100} dans les eaux de drainage issues des deux parcelles pour les deux prélèvements. Potentiels de pic (Ep en mV) mis en évidence en DPASV pour des ajouts de cuivre proches de ceux nécessaires à l'obtention de la toxicité totale (CE_{100}).

Pour l'ensemble des échantillons étudiés, les espèces détectées par DPASV apparaissent toutes à des potentiels de pic négatifs inférieurs à la valeur de référence du cuivre sous forme libre. Les pics sont tous caractérisés par un Ep de $- 50 \pm 10$ mV. On souligne que des ajouts plus conséquents en cuivre aboutissent à l'obtention d'un pic caractéristique du cuivre sous forme libre (Ep = $+ 30 \pm 10$ mV).

Aucune correspondance ne semble exister entre les valeurs de capacité de complexation et les additions nécessaires pour obtenir les différents niveaux de toxicité étudiés (CE_{10} , CE_{50} et CE_{100}) (Tableaux V-8 et 10). Les additions de cuivre sont toujours très inférieures à celles nécessaires pour saturer les sites de fixation des ligands présents ce qui implique qu'une forme complexée du cuivre est vraisemblablement responsable de la toxicité observée en accord avec les résultats polarographiques. L'utilisation d'un logiciel de calcul de la spéciation du cuivre en complément des études réalisées par DPASV et des biotests, devrait nous permettre de définir la répartition et la nature des formes prises par l'élément cuivre dans les eaux de drainage des deux parcelles expérimentales en intégrant la composition physico-chimique de ces échantillons complexes.

IV-2 Calcul de la spéciation chimique par Mineql

Le logiciel de spéciation chimique Mineql+ version 3.01a (Schecher et McAvoy, 1994) choisi, contient une base de données des constantes thermodynamiques d'équilibre et de stabilité de la plupart des composés. Cependant, de par la complexité et la diversité de la matière organique naturelle, les constantes de stabilité des complexes métaux - matière organique naturelle - spécifiques à chaque échantillon naturel n'y figurent pas. Ces constantes de stabilité ont été obtenues, par la méthode des ajouts dosés de cuivre après linéarisation des données obtenues par DPASV selon la méthode de Ruzic (1982). Ces valeurs exprimées en logarithme de K seront insérées dans le modèle au niveau du complexe Cu - substances humiques.

Les concentrations des éléments majeurs initialement sélectionnés ainsi que les concentrations en cuivre total exprimées en molaire sont également entrées dans le modèle. Les calculs de spéciation ont tous été effectués au pH de l'échantillon et à l'équilibre (pression partielle de $\text{CO}_2 = 3,12 \cdot 10^{-9}$ Pa). Les précipités et les formes solides n'ont pas été considérés après vérification que les concentrations introduites dans le modèle étaient inférieures aux limites de solubilité.

D'après le calcul réalisé par le logiciel Mineql, le cuivre est exclusivement complexé à la matière organique naturelle (>99%) dans les échantillons d'eaux de drainage, pour les deux années d'étude, indifféremment de la nature de la parcelle étudiée. Ces résultats ne nous apportent pas d'informations supplémentaires sur la nature du complexe de cuivre mis en évidence par DPASV.

RESULTATS

***SPÉCIATION, BIODISPONIBILITÉ ET TOXICITÉ DU CUIVRE EN
PRESENCE D'UNE MULTIPOLLUTION:
Suivis expérimentaux du bassin versant de Roujan
et de la Peyne***

I- Caractérisation physico-chimique

Durant le suivi expérimental du bassin versant viticole de Roujan, des eaux de ruissellement ont été prélevées, lors d'événements pluvieux en 2000, sur deux parcelles individualisées (C et NC) dont le type de sol diffère.

I-1 Suivi des eaux de ruissellement des deux parcelles viticoles

I-1-1 Caractérisation physico-chimique

La nature du sol plus acide sur la parcelle NC ($pH_{\text{eau-NC}} = 4,3$ pour $pH_{\text{eau-C}} = 8,5$) peut expliquer la différence d'une unité pH notée entre les eaux de ruissellement des deux parcelles étudiées (Tableau VI-1). Les échantillons d'eaux recueillis sur la parcelle C contiennent plus d'ions calcium ($0,75 \pm 0,40$ mM) et dix fois plus d'ions hydrogénocarbonates ($1,0 \pm 0,4$ mM) que ceux de la parcelle NC qui présentent respectivement des concentrations moyennes en Ca^{2+} et HCO_3^- de $0,11 (\pm 0,07)$ et $0,10 (\pm 0,10)$ mM. Les sulfates sont particulièrement présents lors des crues de printemps (avril-mai 2000) en association avec les nitrates et en liaison possible avec les applications en produits phytosanitaires à base de sulfures sur les parcelles. D'autre part, les eaux issues des parcelles NC et C sont caractérisées par des concentrations en carbone organique dissous qui varient respectivement de 5,6 à 17,0 mg C/l et de 0,4 à 7,8 mg C/l.

	pH	Conductivité ($\mu\text{S/cm}$ at 25°C)	COD (mg C/L)	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^+	K^+	Cl^-	SO_4^{2-}	NO_3^-	HCO_3^-
				(mM)							
C1	8,5	401	7,80	1,14	0,07	0,18	0,90	0,10	0,89	0,02	1,50
NC1	7,1	142	5,6	0,11	0,05	<LD	0,06	0,33	0,05	0,05	<LD
C2	7,9	369	5,50	1,40	0,07	0,11	0,55	0,14	1,05	0,71	1,10
NC2	7,1	121	12,0	0,24	0,07	0,36	0,40	0,48	0,16	0,46	0,13
C3	7,9	191	0,90	0,71	0,06	0,09	0,28	0,07	0,51	1,80	1,00
NC3	7,0	110	10,4	0,06	0,02	0,09	0,33	0,27	0,07	0,36	<LD
C4	7,7	97	0,40	0,43	0,02	0,03	0,24	0,01	<LD	0,86	0,30
NC4	6,9	52	8,3	0,08	0,02	0,05	0,13	0,02	0,02	0,15	0,18
C5	7,8	256	1,00	0,45	0,04	0,05	0,27	0,07	0,35	0,03	0,80
NC5	7,0	118	17,0	0,09	0,02	0,06	0,37	0,27	0,07	0,22	0,02
C6	8,1	133	6,30	0,37	0,08	0,04	0,16	0,01	0,01	0,02	1,00
NC6	7,0	50	10,7	0,06	0,02	0,05	0,17	0,01	0,03	0,03	0,24

Tableau VI-1: Caractéristiques physico-chimiques des eaux de ruissellement prélevées sur les parcelles C et NC lors des six événements pluvieux étudiés. (<LD: inférieur à la limite de détection fixée à 0,01 mM).

I-1-2 Concentration en métaux traces

Les concentrations en cuivre total varient de 0,22 à 0,78 μM pour les eaux de ruissellement de la parcelle C et de 0,36 à 1,10 μM pour celles de la parcelle NC (Tableau VI-2). Les concentrations en cuivre sont systématiquement supérieures dans les échantillons de la parcelle NC excepté pour deux événements pluvieux (les crues du 16 avril -NC1- et 14 juin -NC6-). La plus faible concentration est notée pour la crue du 10 mai (NC et C4) qui fait suite

Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:

Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne

à deux autres événements pluvieux consécutifs le 7 et 9 mai (non répertoriés). Les résultats du 10 mai sont en accord avec ceux mesurés pour les éléments majeurs. Les concentrations en arsenic et en zinc également mesurées de par leur application en tant que ou présents dans certains produits phytosanitaires de traitement de la vigne sont également répertoriées dans le tableau VI-2. Les concentrations en arsenic sont plus importantes dans les eaux de ruissellement de la parcelle C. Elles varient de 0,41 à 1,98 μM et de 0,12 à 0,31 μM respectivement dans les eaux issues de la parcelle C et NC. Celles en zinc sont supérieures dans les eaux de la parcelle NC excepté pour la première crue de printemps (16 avril), les valeurs moyennes varient de $0,90 \pm 0,55$ et de $0,5 \pm 0,3$ μM respectivement dans les eaux issues des parcelles NC et C. Pour la parcelle C, les concentrations en zinc et en arsenic sont plus élevées dans les eaux de ruissellement issues de la première pluie de printemps et diminuent au cours du temps contrairement à celles du cuivre. Cette répartition semble correspondre à une application précoce d'arsenic et de zinc au début du printemps alors que les applications de cuivre semblent réparties au cours de la saison et font suite à des événements pluvieux (exemple des eaux du 26 mai plus chargées en cuivre, prélevées après une période de plusieurs jours de pluie). Les traitements phytosanitaires semblent être différents sur la parcelle NC où l'application de produits phytosanitaires à base d'arsenic semble proscrite et celle de produits à base de zinc s'effectue tout au long de la saison avec des applications en mai et juin corrélées avec celle du cuivre.

Evènements pluvieux 2000	NC			C		
	Cu	Zn	As	Cu	Zn	As
	μM					
1 - 16 Avril	$0,55 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,01$	$0,78 \pm 0,04$	$1,67 \pm 0,08$	$1,98 \pm 0,09$
2 - 27 Avril	$0,81 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,02$	$0,47 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,01$	$0,98 \pm 0,06$
3 - 07 Mai	$0,71 \pm 0,01$	$1,79 \pm 0,12$	$0,21 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,03$
4 - 10 Mai	$0,36 \pm 0,02$	$1,26 \pm 0,08$	$0,17 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,003$	$0,41 \pm 0,02$
5 - 26 Mai	$1,10 \pm 0,04$	$0,46 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,02$	$0,78 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,01$	$0,58 \pm 0,03$
6 - 14 Juin	$0,32 \pm 0,01$	$0,94 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,02$

Tableau VI-2: Concentrations moyennes en cuivre, zinc et arsenic total (μM) dans les eaux de ruissellement issues des deux parcelles expérimentales lors des six crues étudiées (n=2).

I-2 Suivi des eaux de la rivière réceptrice: La Peyne

Les prélèvements d'étiage de la rivière la Peyne concernent trois stations (la station en amont nommée SNCF, la station intermédiaire D30, ainsi que la station de Montpezat située en aval du bassin versant viticole de Roujan). Les échantillons d'étiage et de débit de base ont été prélevés à la main. Pour les suivis de crues, on a prélevé des échantillons uniquement au niveau de la station aval (Montpezat) à partir d'un échantillonneur automatique muni de flacons en plastique et au niveau de l'exutoire du bassin versant de Roujan (échantillon moyen). Les éléments majeurs (HCO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+) et les éléments traces (Li, B, Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Ba, Pb, U) ont été systématiquement mesurés sur la phase dissoute ($<0,02 \mu\text{m}$) par électrophorèse capillaire pour les éléments majeurs et par ICP-MS pour les éléments traces métalliques.

I-2-1 Suivis en période d'étiage

En 2001, une unique campagne d'échantillonnage en période d'étiage a été effectuée en juillet. En 2002-2003, dix campagnes d'échantillonnage en période de débit de base ont été menées de mi-juin 2002 à début juin 2003 à raison d'un prélèvement par mois en moyenne. La figure (VI-1) illustre le débit journalier moyen (m^3/s) relevé sur la rivière La Peyne pour chacune des dates de prélèvement. Le débit de base varie de 0,03 (juillet et août 2002) à 0,65 m^3/s (janvier 03).

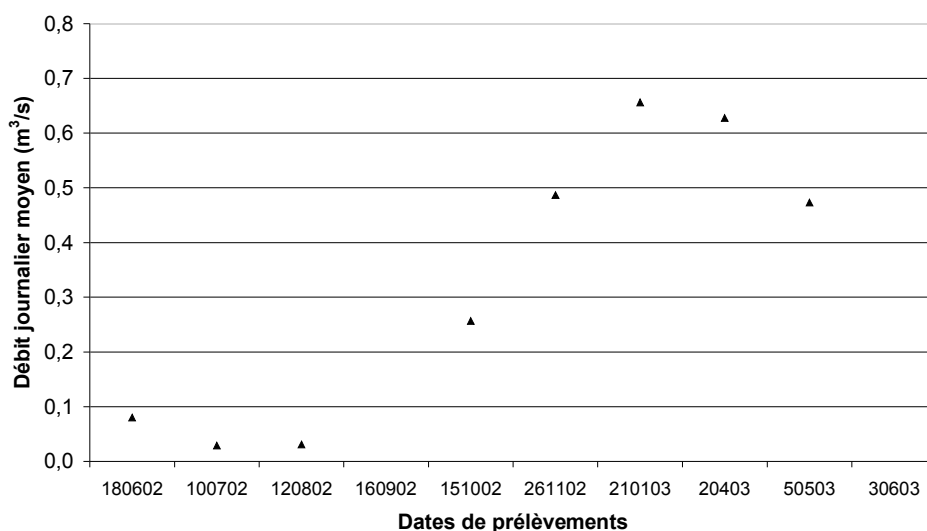


Figure VI-1: Débit journalier moyen (m^3/s) de la rivière la Peyne aux différentes dates de prélèvement (2002-2003). (données de septembre 02 et juin 03 manquantes).

I-2-1-1 Évolution temporelle des concentrations en éléments majeurs

I-2-1-1-1 Station SNCF

Pour cette station, la variabilité saisonnière est peu marquée pour la majorité des eaux prélevées en période de débit de base. L'ensemble des éléments majeurs présente des concentrations sensiblement constantes tout au long de l'année, qui ne semblent pas varier d'une année à l'autre (3,0 à 6,3 mM) (Tableau VI-3). L'unique valeur obtenue en 2001 est toujours incluse dans l'intervalle des valeurs extrêmes. Seule l'alcalinité est sujette à des

Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:

Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne

variations d'un prélèvement à un autre. Les valeurs de pH varient peu ($7,6 \pm 0,3$) avec une valeur minimale de 7,0 en juin 02 et maximale de 8,0 en avril 02. L'élément calcium est quant à lui le plus abondant, deux valeurs exceptionnellement élevées sont notées en juin 02 et 03 respectivement égales à 5,8 et 4,0 mM. Les concentrations en Mg^{2+} et Na^+ sont du même ordre de grandeur (1 mM), cependant d'avril à juin les concentrations en magnésium sont systématiquement supérieures à celles en sodium. Les concentrations en SO_4^{2-} et en Cl^- sont proches (1 mM) sur l'ensemble des prélèvements excepté d'avril à juin où les concentrations en sulfates, susceptibles d'être apportés par les produits phytosanitaires, augmentent de façon significative avec une concentration exceptionnelle de 5 mM en juin 2002. L'évolution des concentrations en sulfates est proche de celle observée pour les ions calcium. Les concentrations en K^+ et en NO_3^- sont très faibles, seul le prélèvement de janvier se distingue par sa teneur en nitrates de 0,7 mM.

	K^+	Na^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	NO_3^-	SO_4^{2-}	Cl^-	HCO_3^-	pH
	mM								
2002-2003 n = 10	$0,05 \pm 0,09$ (<LD - 0,3)	$0,7 \pm 0,3$ (<LD - 1,2)	$2,85 \pm 1,25$ (1,6 - 5,8)	$1,3 \pm 0,55$ (0,5 - 2,1)	$0,09 \pm 0,2$ (<LD - 0,7)	$1,5 \pm 1,4$ (0,45 - 5,2)	$0,7 \pm 0,3$ (<LD - 1,0)	$4,1 \pm 1,75$ (3,0 - 6,3)	$7,6 \pm 0,3$ (7,0 - 8,0)
10-juil-01	0,03	0,5	1,3	0,6	< LD	0,5	0,5	2,9	8,1

Tableau VI-3: pH moyen et concentrations moyennes en éléments majeurs (mM) (max-min) des eaux prélevées en période de débit de base à la station SNCF de 2002 à 2003. ($n=10$; >LD: inférieur à la limite de détermination).

I-2-1-1-2 Station D30

Tout comme pour la station SNCF, l'alcalinité est la plus sujette à des variations saisonnières (3,5 à 7,2 mM) (Tableau VI-4). Les valeurs de pH sont quant à elle constantes sur l'ensemble des prélèvements ($7,8 \pm 0,2$) avec des valeurs minimale et maximale de 7,6 et 8,2 respectivement en janvier et avril. Les variabilités saisonnières sont légèrement plus marquées pour cette station intermédiaire. Les éléments calcium et sulfates sont les plus abondants, leurs concentrations augmentant nettement de janvier à juin. Les concentrations des autres éléments majeurs sont relativement constantes. Elles sont de l'ordre du molaire pour les ions Cl^- et Na^+ , les concentrations en Mg^{2+} étant deux fois plus élevées. Les concentrations en K^+ et NO_3^- sont, quant à elles, très faibles. Tout comme pour la station SNCF, le prélèvement de janvier se distingue par sa teneur élevée en nitrates (1,5 mM). Les valeurs obtenues en 2001 s'intègrent également dans l'intervalle des valeurs extrêmes mesurées en 2002-2003.

	K^+	Na^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	NO_3^-	SO_4^{2-}	Cl^-	HCO_3^-	pH
	mM								
2002-2003 n = 10	$0,03 \pm 0,05$ (<LD - 0,06)	$0,8 \pm 0,2$ (0,3 - 0,9)	$4,0 \pm 1,1$ (2,8 - 6,1)	$1,6 \pm 0,4$ (1,1 - 2,3)	$0,2 \pm 0,5$ (<LD - 1,5)	$2,7 \pm 1,3$ (0,8 - 4,9)	$0,8 \pm 0,3$ (0,1 - 1,1)	$4,4 \pm 1,8$ (3,5 - 7,2)	$7,8 \pm 0,2$ (7,6 - 8,2)
10-juil-01	< LD	0,8	3,5	1,3	< LD	2,7	0,8	4,4	7,7

Tableau VI-4: pH moyen et concentrations moyennes en éléments majeurs (mM) (max-min) des eaux prélevées en période de débit de base à la station D30 de 2002 à 2003 ($n=10$; >LD: inférieur à la limite de détermination).

I-2-1-1-3 Station de Montpezat

Les valeurs de pH oscillent peu ($7,8 \pm 0,3$) sur l'ensemble des prélèvements effectués avec des valeurs maximale et minimale de 8,0 et 7,1 respectivement en juillet et janvier (Tableau VI-5). Les valeurs d'alcalinité sont constantes (6 mM) et présentes un pic au début de l'été (> 7 mM), l'alcalinité la plus faible étant notée en janvier (3,9 mM). L'élément calcium est quant à lui le plus abondant, sa concentration est proche de 4 mM pour l'ensemble des prélèvements effectués en débit de base. Les concentrations en Mg^{2+} , Na^+ , SO_4^{2-} et Cl^- varient entre 1 et 2 mM, elles sont sujettes à de très faibles variations tout au long de l'année et semblent constantes d'une année à l'autre. Les concentrations en Mg^{2+} et en Na^+ sont du même ordre de grandeur (1,2 mM) excepté pour une valeur en magnésium plus élevée en novembre (2,4 mM). Les concentrations en SO_4^{2-} et Cl^- comprises entre 1 et 2 mM (excepté en novembre pour les ions chlorures (0,25 mM)) augmentent légèrement durant les périodes de traitement (mars-juin). Les concentrations en K^+ et en NO_3^- sont globalement très faibles, le prélèvement de janvier possède également la valeur la plus élevée en nitrates (1,4 mM).

	K^+	Na^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	NO_3^-	SO_4^{2-}	Cl^-	HCO_3^-	pH
	mM								
2002-2003 n = 10	$0,03 \pm 0,04$ ($<LD - 0,1$)	$1,2 \pm 0,2$ (0,8 - 1,4)	$3,8 \pm 0,2$ (3,6 - 4,2)	$1,35 \pm 0,5$ (0,7 - 2,4)	$0,3 \pm 0,4$ ($<LD - 1,4$)	$1,6 \pm 0,3$ (0,9 - 2,1)	$1,3 \pm 0,5$ (0,25 - 1,85)	$6,0 \pm 1,1$ (3,9 - 7,5)	$7,7 \pm 0,3$ (7,1 - 8,0)
10-juil-01	0,04	1,2	3,9	1,1	0,2	2,8	1,7	5,4	7,9

Tableau VI-5: pH moyen et concentrations moyennes en éléments majeurs (mM) (max-min) des eaux prélevées en période de débit de base à la station Montpezat de 2002 à 2003. ($n=10$; $>LD$: inférieure à la limite de détermination).

I-2-1-2 Évolution temporelle des concentrations en métaux traces

Le strontium, le bore et le baryum sont les éléments métalliques présents aux plus fortes concentrations dans les eaux de la Peyne, le plomb et le cobalt aux plus faibles, ceci indépendamment de la station considérée (Tableau VI-6).

*Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:
Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne*

Eléments	Montpezat	D30	SNCF
	Concentration moyenne (min - max) μM	Concentration moyenne (min - max) μM	Concentration moyenne (min - max) μM
Sr	6,0 \pm 1 (4,3 - 7,2)	13,6 \pm 0,5 (8,3 - 21,8)	7,8 \pm 6,8 (2,2 - 24,2)
B	5,4 \pm 0,8 (3,9 - 6,5)	5,9 \pm 1,1 (3,7 - 7,1)	5,3 \pm 2,8 (6,2 - 12,2)
Ba	0,50 \pm 0,04 (0,44 - 0,55)	0,33 \pm 0,04 (0,27 - 0,36)	0,38 \pm 0,065 (0,30 - 0,51)
Mn	0,085 \pm 0,05 (0,01 - 0,16)	0,10 \pm 0,07 (0,02 - 0,22)	0,38 \pm 0,37 (0,085 - 1,27)
Li	0,98 \pm 0,10 (0,86 - 1,12)	1,87 \pm 0,30 (1,30 - 2,30)	1,46 \pm 1,15 (0,40 - 4,18)
Zn	0,19 \pm 0,27 (0,03 - 0,89)	0,13 \pm 0,09 (0,04 - 0,29)	0,15 \pm 0,16 (0,06 - 0,56)
Ni	0,029 \pm 0,027 (0,003 - 0,055)	0,017 \pm 0,015 (0,009 - 0,055)	0,022 \pm 0,014 (0,007 - 0,052)
U	0,005 \pm 0,001 (0,004 - 0,006)	0,006 \pm 0,002 (0,003 - 0,008)	0,004 \pm 0,001 (0,0025 - 0,006)
Cu	0,024 \pm 0,008 (0,012 - 0,036)	0,017 \pm 0,005 (0,011 - 0,027)	0,017 \pm 0,003 (0,014 - 0,027)
As	0,019 \pm 0,004 (0,013 - 0,028)	0,012 \pm 0,007 (0,007 - 0,029)	0,013 \pm 0,003 (0,008 - 0,017)
Rb	0,009 \pm 0,001 (0,008 - 0,011)	0,013 \pm 0,001 (0,010 - 0,015)	0,014 \pm 0,007 (0,011 - 0,031)
Mo	0,005 \pm 0,001 (0,004 - 0,006)	0,008 \pm 0,001 (0,006 - 0,010)	0,007 \pm 0,002 (0,005 - 0,010)
Cr	0,015 \pm 0,010 (0,001 - 0,033)	0,011 \pm 0,006 (0,004 - 0,021)	0,011 \pm 0,007 (0,004 - 0,027)
Co	0,004 \pm 0,002 (0,0025 - 0,007)	0,004 \pm 0,002 (0,002 - 0,007)	0,003 \pm 0,002 (0,002 - 0,007)
Pb	0,0010 \pm 0,0005 (0,0002 - 0,0024)	0,0005 \pm 0,0002 (0,0003 - 0,0010)	0,0005 \pm 0,0005 (0,0002 - 0,0014)

Tableau VI-6: Concentrations totales moyennes (μM , max-min) des principaux métaux mesurés dans les eaux de la Peyne aux trois stations d'étude lors des campagnes d'échantillonnage effectuées en période de débit de base ($n=10$).

I-2-1-2-1 Station SNCF

Parmi les éléments majoritaires, le bore et le baryum sont sujets à une très faible variabilité temporelle contrairement au strontium qui présente une augmentation très marquée d'août 02 à juin 03 (2,2 à 11,7 μM) avec une concentration exceptionnellement élevée en juin 02 (24,2 μM pour une moyenne de 7,8 μM).

*Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:
Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne*

L'évolution des concentrations en manganèse et en lithium suit le même schéma que celui décrit pour le strontium pour la même période. La concentration du manganèse varie de 0,085 à 0,50 μM , celle du lithium de 0,40 à 2,07 μM d'août 02 à juin 03 dans les eaux de la Peyne à la station SNCF. Ces deux éléments possèdent également une concentration exceptionnellement élevée en juin 02, de 1,27 et de 4,18 μM pour une moyenne de 0,38 et 1,46 μM respectivement pour le manganèse et le lithium. Certains éléments métalliques comme le rubidium, le zinc et le cuivre présentent des concentrations constantes quelque que soit la date du prélèvement à l'exception pour le zinc d'une valeur exceptionnellement élevée en janvier 03 (0,56 pour une moyenne de 0,15 μM). D'autres comme l'arsenic, le molybdate, l'uranium, le nickel, le chrome, le plomb et le cobalt possèdent une concentration maximum en juin 02 puis présentent un schéma alternant de faibles variations de concentrations en fonction des dates de prélèvement (décroissance suivie de légère augmentation et vice-versa).

I-2-1-2-2 Station D30

A cette station, le baryum et le lithium présentent une variabilité temporelle de leur concentration dans les eaux de la Peyne peu marquée contrairement au strontium, au bore, au zinc et au manganèse. Le strontium, élément majoritaire, voit sa concentration diminuer d'un facteur deux de juin à août 02 (19,1 à 8,3 μM). Il en est de même pour la concentration du manganèse qui diminue d'un facteur quatre (0,22 à 0,05 μM) pour la même période. La décroissance de la concentration en strontium est suivie d'une augmentation marquée d'avril à mai 03 (9,6 à 21,8 μM). En ce qui concerne le manganèse, les valeurs sont constantes pour la majorité des autres prélèvements et proches de la concentration moyenne de 0,10 μM excepté pour trois dates (janvier, juin et mai 03). Les deux premiers prélèvements présentent les plus faibles concentrations en manganèse respectivement de 0,02 et 0,04 μM , celui de mai possède deux fois plus de manganèse que la valeur moyenne. La Peyne, à la station D30, possède des concentrations constantes en bore, proches de la valeur moyenne (5,9 μM) de juin à octobre 02 et présente une valeur minimale en janvier 03 (3,7 μM) suivie d'une augmentation jusqu'en juin. Le zinc présente une forte variabilité temporelle illustrée par la présence de valeurs exceptionnellement élevées par rapport à la concentration moyenne en septembre 02 et janvier 03 (0,26 et 0,29 μM pour une concentration moyenne de 0,13 μM) et en avril et juin 03 (0,19 et 0,15 μM). Les autres éléments métalliques (cuivre, rubidium, arsenic, molybdate, chrome, plomb et cobalt) à l'exception du nickel et de l'uranium possèdent des concentrations constantes, proches de leur moyenne respective quelque soit la date de prélèvement considérée. Les concentrations en cuivre varient entre un maximum en avril (0,027 μM) et un minimum en juin 03 (0,011 μM). Celles de l'arsenic sont comprises entre 0,007 - 0,008 μM (janvier et juin 03) et 0,029 μM en avril. La concentration en uranium, quant à elle, décroît de juin à septembre 02 (0,007 à 0,003 μM) pour augmenter jusqu'en juin 03 (0,008 μM). Les concentrations en nickel présentent deux plateaux de valeurs proches de juin à octobre 02 (0,009 μM) et d'avril à juin 03 (0,020 μM) et une valeur trois fois plus élevée que la moyenne de 0,017 μM en janvier 03 (0,055 μM).

I-2-1-2-3 Station Montpezat

Parmi les éléments majoritaires, le bore, le baryum, le manganèse et le lithium sont sujets à une très faible variabilité temporelle contrairement au strontium qui présente une diminution de sa concentration de juin à août 02 (5,8 à 4,3 μM) et d'avril à juin 03 (7,2 à 5,9 μM) entrecoupée d'une augmentation de septembre 02 à avril 03 (4,3 à 7,2 μM). Les concentrations en bore, en baryum et en manganèse sont maximales en juin 02 et présentent deux valeurs minimales sur l'ensemble des dates de prélèvement respectivement en janvier et avril 03 pour Ba (0,44 μM pour une moyenne de 0,50), en août 02 et janvier 03 pour B (3,9 et 4,25 μM pour une valeur moyenne de 5,4) et en octobre 02 et juin 03 pour Mn (0,02 et 0,01 μM pour une valeur moyenne de 0,085). L'évolution temporelle des concentrations en lithium est illustrée par deux phases de décroissance, l'une en 2002 de juin à octobre (1,08 à 0,86 μM) et la seconde en 2003 de janvier à juin (1,12 à 0,86 μM).

Le zinc présente une variabilité temporelle marquée illustrée par la présence d'une valeur exceptionnellement élevée par rapport à la concentration moyenne en janvier 03 (0,89 μM pour une valeur moyenne de 0,19 μM). Si on exclut cette valeur, les concentrations en zinc varient de 0,03 à 0,23 μM (août et juin 02) avec une majorité des valeurs comprises entre 0,06 et 0,12 μM .

Certains éléments métalliques comme le cuivre, le nickel, l'uranium, le rubidium, le molybdate, le chrome et le plomb présentent des concentrations constantes et proches de leur concentration moyenne respective quelque que soit la date du prélèvement considérée. Les concentrations en nickel sont néanmoins différentes de la valeur moyenne (0,029 μM) en juillet et août 02, dates pour lesquelles le nickel est présent respectivement en forte et faible concentration (0,055 et 0,003 μM). Il en est de même pour le chrome qui présente une importante concentration en juin 03 (0,033 μM) et une très faible en août 02 (0,0008 μM) par rapport à la valeur moyenne de 0,015 μM . Les concentrations en cuivre varient entre un maximum en juillet 02 (0,036 μM) et deux valeurs minimales respectivement en août et septembre 02 (0,013 et 0,012 μM). L'arsenic, quant à lui, présente une valeur maximale en juin 02 (0,028 μM), puis sa concentration décroît pour atteindre un plateau d'août à octobre 02 suivi d'une nouvelle diminution de sa concentration qui atteint un minimum en avril 03 (0,013 μM). A partir de cette date, une augmentation de la concentration en arsenic est notée jusqu'en juin (0,019 μM).

I-2-1-3 Évolution spatiale des concentrations en éléments majeurs et en métaux traces

Les eaux de la Peyne en période de débit de base sont neutres ($7,7 \pm 0,3$) avec des valeurs comprises entre 7,0 et 8,2 pour les trois stations. Les ions majeurs Ca^{2+} , HCO_3^- , SO_4^{2-} sont dominants pour les trois stations concernées avec une légère augmentation des concentrations d'amont en aval. Les autres éléments majeurs sont présents à des concentrations similaires indifféremment de la station de prélèvement. Les éléments métalliques sont globalement présents à des concentrations proches quelque soit la station de prélèvement considérée néanmoins en débit de base, les eaux prélevées au niveau des trois stations présentent des différences de composition.

*Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:**Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne*

Entre la station la plus en amont (SNCF) et la station D30, la plupart des éléments sont présents à des concentrations sensiblement identiques, à l'exception de Mn et Ba qui voient leurs concentrations dissoutes diminuer et de Sr, Ca^{2+} et SO_4^{2-} qui présentent des augmentations de concentrations bien marquées. Entre la station D30 et la station la plus en aval (Montpezat) certains éléments voient leurs concentrations diminuer (Sr, B, Li, Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_4^{2-}) alors que d'autres au contraire augmentent (Ba, Ni, Cu, As, Cl, Na^+ et NO_3^-). Les concentrations de la plupart se stabilisent. La variabilité spatiale des concentrations en éléments majeurs et en métaux totaux en phase dissoute indique que la Peyne est influencée par des facteurs environnementaux divers incluant la lithologie et les activités humaines.

Les schistes Paléozoïques constituent la lithologie principale de l'amont. Leur influence apparaît clairement à la station SNCF où la rivière Peyne présente les plus faibles concentrations en Sr, Ca^{2+} et SO_4^{2-} , caractéristiques typiques d'eau drainant des schistes et des grès (Meybeck, 1986). A la station D30, un enrichissement relatif en SO_4^{2-} , Li et Sr est clairement apparent, reflétant vraisemblablement les évaporites présentes dans les formations du Trias, ce qui semble indiquer une introduction d'eau souterraine dans la Peyne en aval de la station SNCF.

I-2-1-4 Comparaison avec les résultats obtenus sur les eaux de ruissellement des parcelles viticoles.

Les stations situées en amont du bassin versant viticole devraient être moins sous influence agricole que la station de Montpezat située en aval du bassin versant de Roujan. La comparaison des évolutions temporelle et spatiale des éléments majeurs et des métaux lourds observées, dans les eaux de la Peyne issues des trois stations de prélèvement et dans les eaux de ruissellement des parcelles viticoles, devrait pouvoir nous apporter des informations concernant l'éventuelle influence des activités agricoles sur les apports de SO_4^{2-} , d'As, de Zn et de Cu par les produits phytosanitaires dans les eaux de la rivière.

Les eaux de la Peyne sont 10 à 20 fois plus concentrées en Mg^{2+} , Na^+ et Cl^- que les eaux de ruissellement des parcelles viticoles. L'alcalinité est également plus élevée dans les eaux de la rivière ainsi que les concentrations en Ca^{2+} (3 à 7 fois plus). Par contre, les eaux de ruissellement issues des parcelles viticoles sont 5 à 25 fois plus concentrées en K^+ que les eaux de la Peyne.

Les concentrations en sulfates dans les eaux de la rivière sont systématiquement supérieures aux valeurs mesurées dans les eaux de ruissellement des parcelles viticoles de par la lithologie. Les eaux de la Peyne collectées à la station de Montpezat présentent une légère augmentation des concentrations en sulfates durant la période de traitement des vignes. Contrairement aux eaux de ruissellement issues des parcelles viticoles, aucun pic de concentration n'est mis en évidence durant les périodes de traitement de la vigne dans les eaux de la Peyne recueillies à la station de Montpezat.

En ce qui concerne le cuivre, le zinc et l'arsenic (éléments constitutifs de produits phytosanitaires traditionnellement utilisés dans le traitement de la vigne), leurs concentrations sont systématiquement supérieures sur le site de Montpezat par rapport aux stations situées

*Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:
Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne*

plus en amont (Tableau VI-6). Les concentrations moyennes en arsenic, en cuivre et en zinc mesurées dans les eaux de la Peyne sont systématiquement inférieures d'un facteur égal à 40,0 ; 27,0 et 2,6 à celles mesurées dans les eaux de ruissellement de la parcelle C (facteurs de dilution) et ne présentent pas un pic de concentration durant leur période d'application contrairement à ce qui a été observé pour les eaux de ruissellement issues des parcelles viticoles.

Il est difficile de mettre en évidence une influence agricole et un impact de la viticulture sur les concentrations en cuivre et en arsenic des eaux de la Peyne à partir des données mesurées en période de débit de base. Il semble plus pertinent de s'intéresser aux résultats obtenus en période de crues durant lesquelles les concentrations mesurées reflètent un mélange entre les concentrations en débit de base et celles présentes dans les eaux de surface (influence conjointe de la nature du sol, de la lithologie et des activités agricoles).

I-2-2 Suivis en période de crues

Un seul suivi de crue (20 octobre 2001) a été réalisé en 2001, pour deux en 2002-2003 (9-10 octobre 2002 et 27-28 février 2003). Les crues ont respectivement porté sur une séquence de 10, 12 et 11 échantillons. La totalité des graphiques illustrant l'évolution des concentrations en éléments majeurs et traces en relation avec le débit, obtenus pour les trois suivis de crues, est reportée en annexe 3.

L'analyse de ces hydrogrammes de crue permet d'individualiser plusieurs groupes d'éléments en fonction de leur distribution par rapport au débit. On distingue:

[1]- Les éléments dont la concentration diminue avec le débit (Figure VI-2). Les éléments majeurs à l'exception de K^+ et NO_3^- s'intègrent systématiquement dans cette catégorie pour l'ensemble des crues étudiées. Il en est de même pour les éléments traces suivants Sr, U, Li et B.

[2]- Ceux dont la concentration augmente avec le débit (Figure VI-3). Sont concernés, le Cu, le Rb et les ions K^+ . D'autres le sont à l'exception d'un événement. C'est le cas de l'As excepté pour la crue d'octobre 02, du Mn sauf en octobre 01 et de l'Al non mesuré lors de la crue d'octobre 01.

[3]- Ceux dont la concentration ne présente pas de corrélation simple avec le débit (Figure VI-4). Les éléments qui présentent une distribution complexe avec le débit sont les suivants: Zn, Pb, Mn, Mo, Co, Ni, Cr, NO_3^- . Ils proviennent vraisemblablement du ruissellement superficiel.

En période de crues, les concentrations élémentaires reflètent un mélange entre le débit de base et les eaux de surface. Le modèle généralement proposé pour expliquer les variations de concentrations en fonction du débit est un modèle de mélange entre le ruissellement de surface, la nappe et le ruissellement hypodermique (Seyler et Elbaz-Poulichet, 1996 et références incluses). Les éléments dont les concentrations augmentent avec le débit ont comme source

Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:

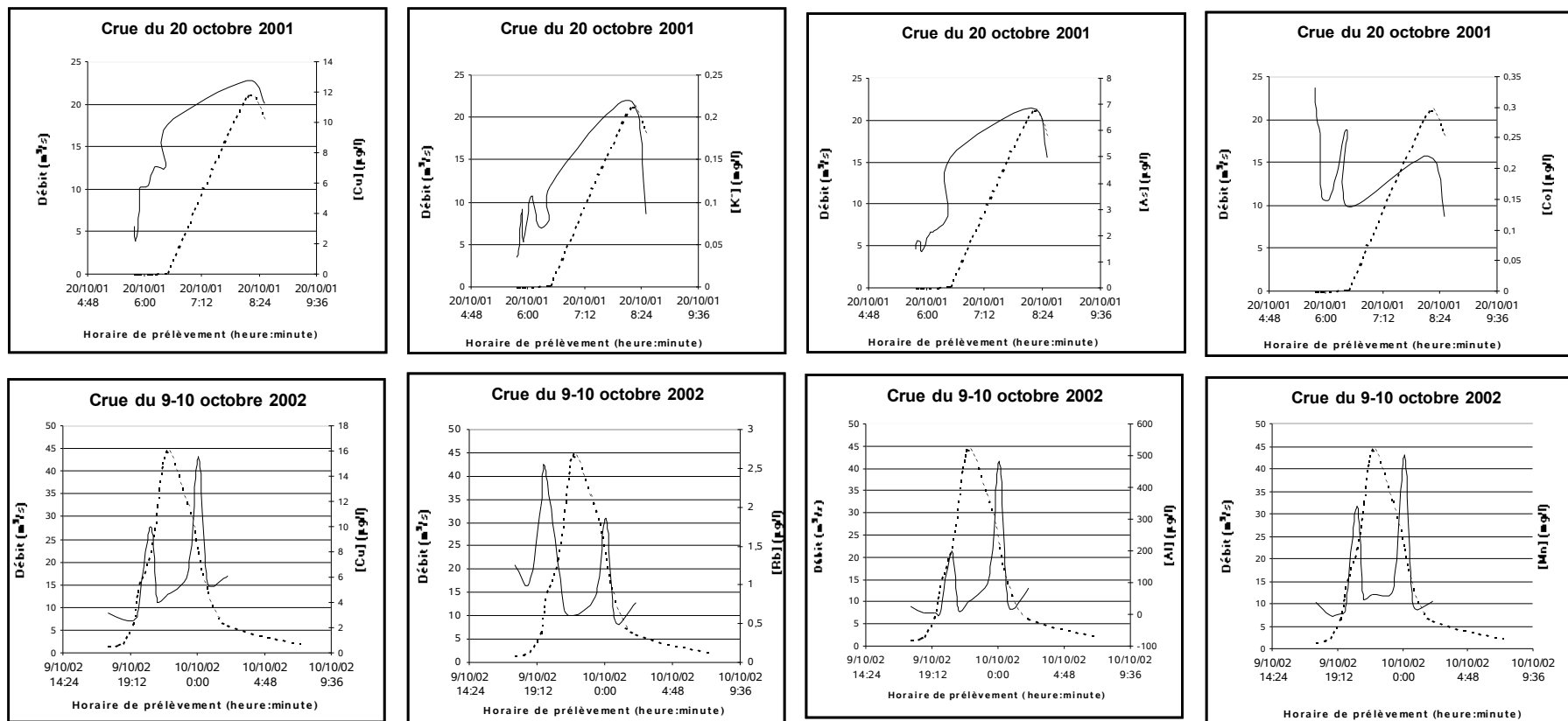
Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne

principale les sols. Inversement ceux qui diminuent ont leurs concentrations acquises en profondeur (contact eau/roche).

Dans le cas de la Peyne, les éléments métalliques traces principalement issus des minéraux solubles des roches du bassin versant de la rivière (Li, Sr, U, B) voient leurs concentrations diminuer lors des crues. A l'inverse, l'augmentation progressive du cuivre voire de l'arsenic montre que ces éléments sont principalement issus des sols et reflète leur utilisation comme produits phytosanitaires de la vigne.

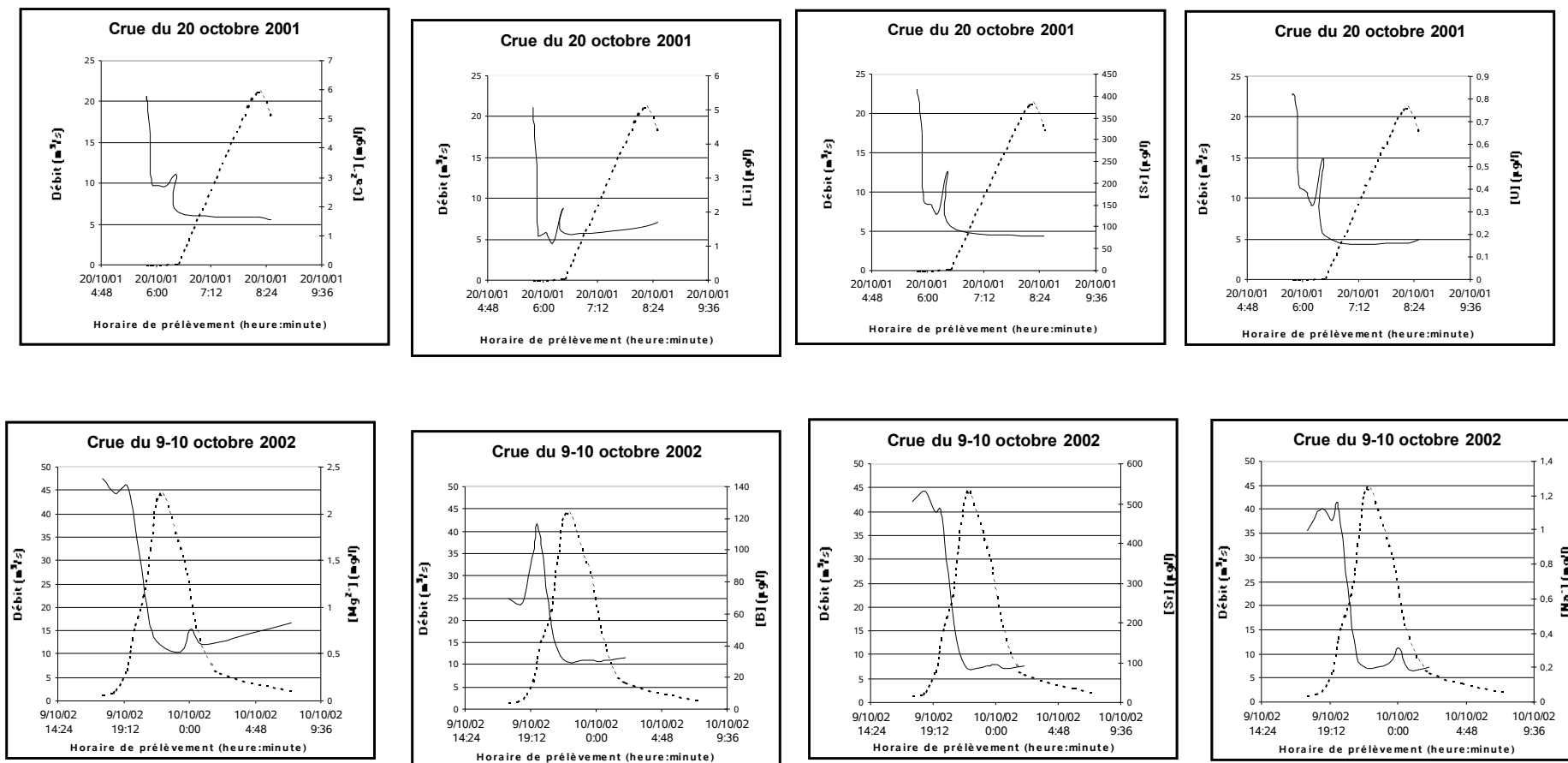
*Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:
Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne*

Figure VI-2: Exemples de distribution croissante en fonction du débit.



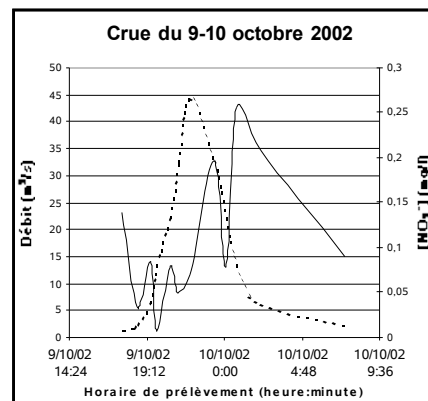
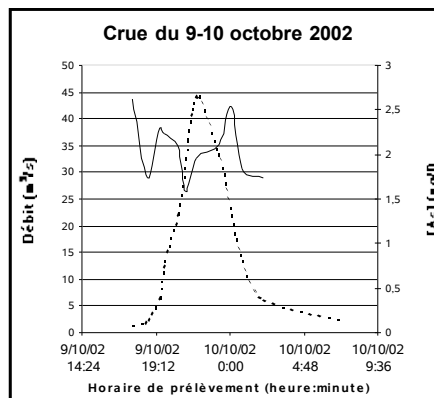
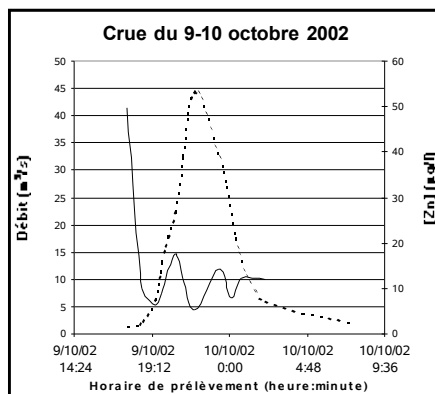
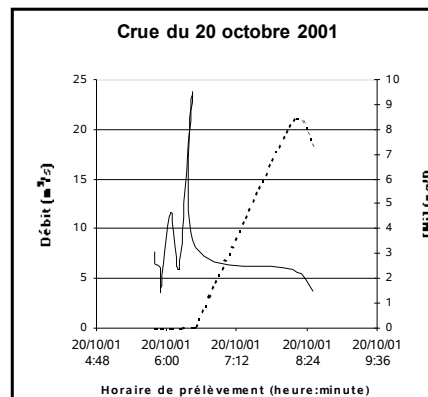
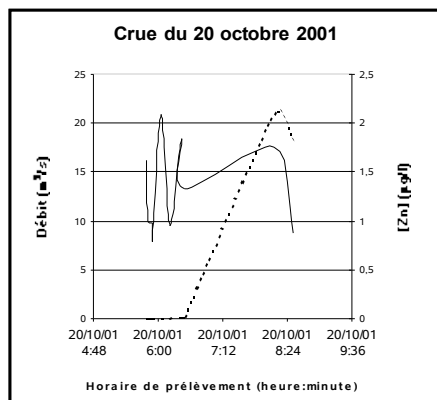
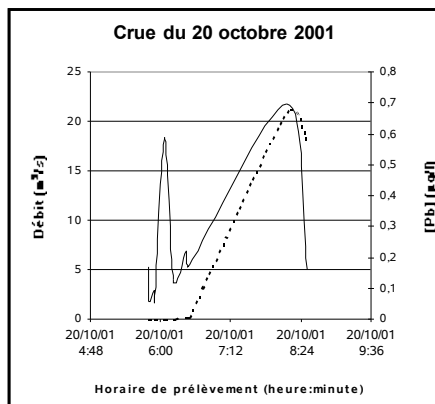
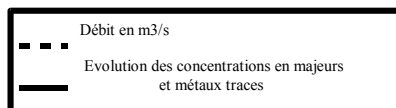
Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:
Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne

Figure VI-3: Exemples de distribution décroissante en fonction du débit.



*Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:
Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne*

Figure VI-4: Exemples de distribution complexe en fonction du débit.



II- Étude de la toxicité

II-1 Toxicité des eaux de ruissellement issues des deux parcelles expérimentales

II-1-1 Étude de l'inhibition de la croissance algale de *Pseudokirchneriella subcapitata* par fluorescence

La totalité des échantillons d'eaux de ruissellement prélevés sur la parcelle NC ne sont pas toxiques pour *P. subcapitata* alors que ceux de la parcelle C le sont tous excepté celui prélevé fin juin (C6). Par ailleurs, les concentrations totales en cuivre sont toutes supérieures à la 72h-CE₅₀ de référence du cuivre indépendamment de la parcelle étudiée. Il en est de même pour les concentrations en zinc total mesurées dans les eaux de la parcelle NC et pour deux échantillons de la parcelle C (C1 et C3) (Tableaux VI-2 et VI-7). Concernant l'arsenic, les analyses de spéciation par HG-ICP-MS ont révélé une présence majoritaire d'arsenic sous forme V qui représente plus de 97% de l'arsenic total. Les concentrations mesurées sur l'ensemble des échantillons sont systématiquement inférieures à la 72h-CE_{50R} de la forme oxydée de l'arsenic (3,9 – 5,4 µM).

Par la suite, le programme Regtox nous a permis d'estimer la dilution nécessaire pour obtenir une inhibition de la croissance de 50% calculée exclusivement sur les échantillons toxiques. Les résultats obtenus nous permettent d'estimer les concentrations en cuivre et en zinc résultantes de cette dilution. Contrairement aux concentrations totales initiales, elles s'avèrent être systématiquement inférieures à la 72h-CE₅₀ de référence du zinc (Tableau VI-7). Pour le cuivre, les concentrations estimées sont inférieures à sa CE_{50R} pour C1 et C2, proches pour les échantillons C3 et C4 et supérieures pour C5 (Tableau VI-7). Le cuivre, seul, pourrait expliquer la toxicité observée sur les échantillons de la parcelle C à l'exception des échantillons C1 et C2 (Tableau VI-7).

	Inhibition de la croissance %	Conc. initiales (µM)		Facteur de dilution (CE ₅₀)	Conc. (µM) après dilution	
		Cuivre	Zinc		Cuivre	Zinc
C1	99 ± 0,2	0,78	1,67	100	0,01	0,02
C2	98 ± 0,2	0,47	0,25	20	0,02	0,01
C3	98 ± 1	0,41	0,57	5,9	0,07	0,10
C4	72 ± 2	0,22	0,06	1,85	0,12	0,03
C5	69 ± 2	0,78	0,22	1,7	0,46	0,13
					CE ₅₀ de référence (µM)	
					0,08 - 0,11	0,56 ± 0,1

Tableau VI-7: Pourcentages d'inhibition de la croissance de *P. subcapitata* obtenus sur les échantillons toxiques de la parcelle C. Concentrations initiales en cuivre et en zinc (µM) et facteurs de dilution associés pour obtenir la CE₅₀. Comparaison des concentrations en cuivre et en zinc (µM) résultantes de ces dilutions et de leur 72h-CE₅₀ de référence respective.

II-1-2 Étude de l'inhibition de l'activité estérasique

La comparaison des deux indicateurs d'effet donne des résultats similaires sur les eaux de la parcelle NC. De plus, les résultats obtenus en étudiant l'activité estérasique de *P. subcapitata* donnent des pourcentages d'inhibition très proches de ceux calculés en étudiant la croissance par fluorescence. Cependant, seuls les trois premiers échantillons de la parcelle C sont toxiques (Tableau VI-8), les autres présentent une stimulation de l'activité estérasique comme pour l'ensemble des échantillons de la parcelle NC.

	Inhibition de l'activité estérasique %	Conc. initiales (µM)		Facteur de dilution (CE ₅₀)	Conc. (µM) après dilution	
		Cuivre	Zinc		Cuivre	Zinc
C1	90 ± 3	0,78	1,67	5,9	0,13	0,28
C2	88 ± 3	0,47	0,25	100	0,005	0,0025
C3	90 ± 1	0,41	0,57	9,1	0,045	0,06
CE ₅₀ de référence (µM)						
					0,096 - 0,15	0,89 ± 0,2

Tableau VI-8: Pourcentages d'inhibition de l'activité estérasique de *P. subcapitata* obtenus sur les échantillons toxiques de la parcelle C. Concentrations initiales en cuivre et en zinc (µM) et facteurs de dilution associés pour obtenir la CE₅₀. Comparaison des concentrations en cuivre et en zinc (µM) résultantes de ces dilutions et de leur 72h-CE₅₀ de référence respective.

L'utilisation du logiciel Regtox nous a permis d'estimer les concentrations en cuivre et en zinc associées aux dilutions nécessaires pour obtenir une inhibition partielle. Elles s'avèrent être systématiquement inférieures à la 72h-CE₅₀ de référence du zinc (Tableau VI-8). Pour le cuivre, les concentrations estimées sont proches de la 72h-CE_{50R} pour l'échantillon C1 et inférieures pour les deux autres échantillons (Tableau VI-8).

II-1-3 Étude complémentaire des échantillons d'eaux de ruissellement non toxiques

Des ajouts dosés de cuivre ont été effectués dans les échantillons d'eaux de ruissellement lors des biotests en parallèle de ceux menés lors de l'étude polarographique de façon à estimer le pouvoir complexant de ces eaux. Ces analyses permettront également d'étudier les relations potentielles entre la nature des espèces du cuivre et la toxicité associée à ces additions (se référer au paragraphe IV de ce chapitre).

Pour l'ensemble des échantillons non toxiques, les concentrations initiales sont 3 à 10 fois supérieures à la 72h-CE₅₀ de référence du cuivre. Les échantillons NC5 et NC6 nécessitent des ajouts conséquents pour l'obtention aussi bien de l'inhibition de moitié que totale de la croissance algale de *P. subcapitata* (Figure VI-5). L'échantillon C6 nécessite quant à lui les ajouts en cuivre les plus faibles avec cependant en final une concentration totale en cuivre 4,7 fois supérieure à la concentration initiale. Ces résultats illustrent de la forte capacité de complexation des eaux de ruissellement issues des parcelles viticoles et seront mis en relation avec les résultats obtenus en DPASV, par la méthode des ajouts dosés de cuivre.

*Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:
Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne*

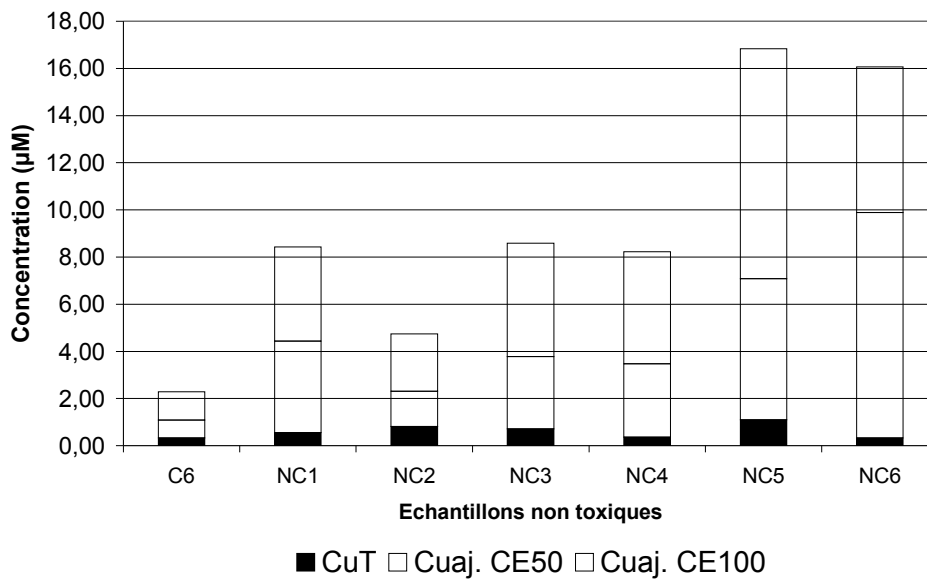


Figure VI-5: Concentrations en cuivre total (µM) des échantillons d’eaux de ruissellement non toxiques et concentrations en cuivre ajouté afin d’obtenir les CE₅₀ et ₁₀₀.

II-1-4 Conclusions

Dans un tel contexte agricole de multipollution, il s’avère assez délicat d’attribuer la toxicité directe des eaux de ruissellement de la parcelle C à un seul composé de par la présence d’une gamme de polluants potentiellement toxiques pour les algues (cuivre, zinc, arsenic utilisés seul ou associés à des composés organiques, produits phytosanitaires divers). En effet, même si le cuivre et le zinc sont en concentrations totales supérieures à leurs CE_{50R} respectives, ils sont, cependant, susceptibles d’être présents sous forme complexée. Après dilutions et estimation des concentrations responsables de l’inhibition partielle de la croissance algale, seule la toxicité observée pour trois des cinq échantillons toxiques pourrait être associée au cuivre. L’étude du second paramètre d’effet nous permet de conclure que le ou les polluants impliqués dans la toxicité des trois premiers échantillons inhibent également l’activité estérasique tandis que ceux responsables de la réponse toxique des échantillons C4 et C5 ne le font pas.

II-2 Toxicité des eaux de la Peyne

II-2-1 En période d'été

En ce qui concerne l'évaluation de la toxicité potentielle des échantillons prélevés en période d'été ou en débit de base sur les trois stations sur la Peyne, la totalité des eaux ne présente pas de toxicité directe pour les deux paramètres d'effet considérés. Au contraire, une stimulation algale apparaît pour l'ensemble des eaux. Ces résultats sont en accord avec les concentrations en cuivre mesurées dans les eaux qui sont systématiquement inférieures à la CE₅₀ de référence du cuivre (0,08 – 0,11 µM Cu) indépendamment de la station de prélèvement (Figure VI-6). Il en est de même pour l'As et le Zn à l'exception de l'échantillon prélevé en janvier à la station de Montpezat.

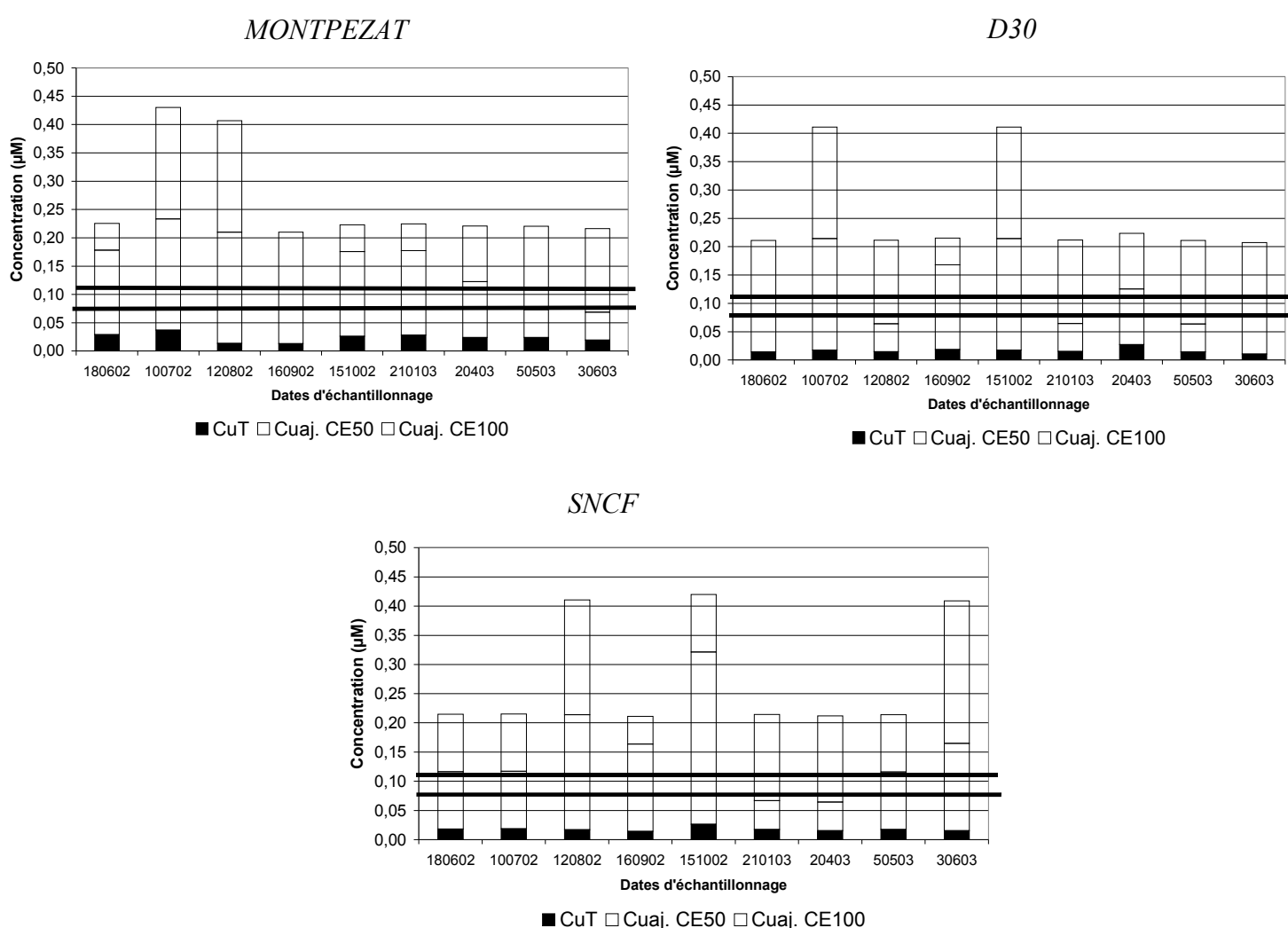


Figure VI-6: Concentration totale en cuivre \blacksquare dans la fraction dissoute des eaux de la Peyne (μM). Additions de cuivre nécessaires pour obtenir une inhibition de la croissance algale de 50% (Cuaj. CE₅₀) \square et une toxicité totale (Cuaj. CE₁₀₀) \square exprimées en μM de cuivre ajouté pour les trois stations étudiées en période d'été. Les deux droites délimitent l'intervalle de confiance pour les valeurs de référence du cuivre (72h-CE₅₀ - 0,08 – 0,11 μM Cu).

*Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:
Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne*

Les ajouts nécessaires pour obtenir une inhibition de 50% de la croissance algale donnent des concentrations finales (CuT + Cuaj. CE₅₀) en cuivre supérieures à la valeur de référence pour la majorité des échantillons, excepté pour deux (mai et juin 2003) prélevés à la station de Montpezat, pour trois à la station D30 (août 02, janvier et mai 03) et pour deux à la station plus en amont (janvier et avril 03) (Figure VI-6).

Les concentrations finales obtenues suite aux ajouts nécessaires pour atteindre une inhibition totale de la croissance permettent de détacher deux types d'échantillons. On distingue les échantillons qui possèdent une concentration finale en cuivre de l'ordre de 0,2 µM, de ceux qui nécessitent des ajouts en cuivre deux fois plus importants. Sont concernés par ce second cas, les échantillons de juillet (Montpezat-D30), d'août (Montpezat-SNCF), d'octobre (D30-SNCF) ainsi que de juin 2003 (SNCF). Ces résultats illustrent des variabilités saisonnière et spatiale du pouvoir complexant des eaux de la rivière la Peyne.

II-2-2 En période de crues

Deux crues ont été suivies et étudiées dans leur intégralité, il s'agit des événements du 09 octobre 02 et du 27-28 février 03. Pour les autres crues, seule l'étude d'un échantillon moyen a été effectuée. C'est le cas des événements du 10-11-12 et 14 décembre 02 et du 06 janvier 03. Le faible volume recueilli lors du suivi de la crue d'octobre 01 ne nous a pas permis d'effectuer des ajouts contrôlés de cuivre.

II-2-2-1 Suivi complet de crues

Les échantillons de suivi de crues ne sont pas toxiques, à l'exception des quatre premiers échantillons de la crue du 27-28 février 03 (Tableau VI-9 et Figure VI-7). Une stimulation algale est même notée pour l'ensemble des eaux non toxiques.

Le programme Regtox a été utilisé pour les quatre échantillons de la crue du 27-28 février 03 qui présentent une toxicité directe, de façon à déterminer la dilution nécessaire pour obtenir 50% d'inhibition de la croissance algale et à estimer la concentration en cuivre qui en découle (Tableau VI-9).

	Inhibition de la croissance %	Conc. initiales (µM) Cuivre	Facteur de dilution (CE ₅₀)	Conc. (µM) après dilution Cuivre
Peyne 1	83 ± 3	0,06	1,43	0,04
Peyne 2	74 ± 1	0,13	1,3	0,10
Peyne 3	85 ± 2	0,03	1,64	0,02
Peyne 4	88 ± 2	0,03	1,33	0,02
				CE _{50R} du Cuivre (µM) (0,08 - 0,11)

Tableau VI-9: Résultats de toxicité obtenus pour les quatre premiers échantillons prélevés dans la Peyne lors du suivi de la crue du 27-28 février 2003, exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance algale de *P. subcapitata* par fluorescence. Facteur de dilution nécessaire pour obtenir 50% d'inhibition de la croissance et estimation de la concentration en cuivre en résultant (µM) en comparaison des concentrations initiales en cuivre (µM).

*Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:
Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne*

Si on se réfère aux résultats obtenus, la toxicité directe observée peut être attribuée au cuivre uniquement pour l'échantillon 2 qui présente une concentration initiale en cuivre supérieure à sa CE₅₀ de référence. Il en est de même pour la concentration estimée après dilution (Tableau VI-9).

En ce qui concerne l'étude de l'inhibition de l'activité estérasique, les résultats sont similaires à ceux obtenus lors de la mesure de l'inhibition de la croissance par fluorescence pour la crue d'octobre. Pour celle de février, aucun effet n'a été décelé pour l'ensemble des échantillons étudiés, contrairement aux résultats obtenus lors de l'étude de l'inhibition de la croissance par fluorescence.

Les échantillons d'eaux issues des suivis des crues du 9-10 octobre 02 et du 27-28 février 03 ont été dopés en cuivre (Figure VI-7).

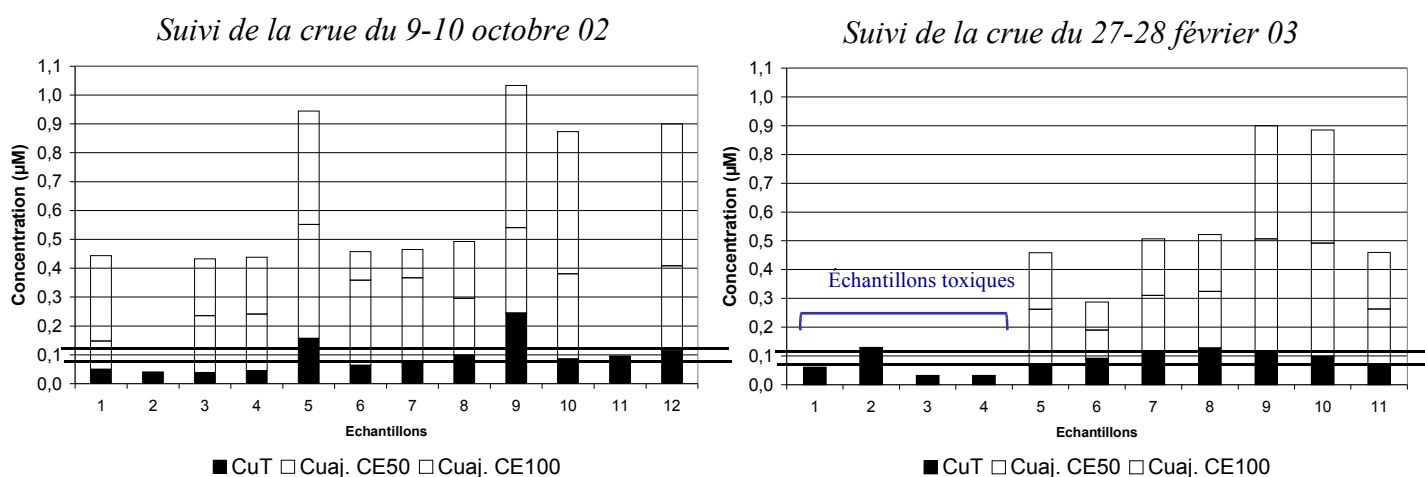


Figure VI-7: Concentration totale en cuivre dans la fraction dissoute des eaux de la Peyne (µM). Additions de cuivre nécessaires pour obtenir une inhibition de la croissance algale de 50% (Cuaj. CE₅₀) et une toxicité totale (Cuaj. CE₁₀₀) exprimées en µM de cuivre ajouté pour les deux suivis de crues (9 octobre 02 et 28 février 03). Les deux droites délimitant l'intervalle de confiance pour les valeurs de référence du cuivre (72h-CE₅₀ - 0,08 – 0,11 µM Cu).

NB1: les échantillons 2 et 11 n'ont pas été étudiés par manque de volume.

NB2: les échantillons 1-2 ont été prélevés le 20 février, le n°3 le 23 février lors de petits événements pluvieux intégrés dans la crue du 27-28/02/03.

Les échantillons de fin de crue semblent nécessiter les ajouts totaux en cuivre les plus conséquents aussi bien pour la crue d'octobre (échantillons 9, 10 et 12) que de février (échantillons 9 et 10). Ceux d'octobre (9, 10 et 12) présentent des concentrations totales en cuivre comprises entre 0,87 et 1,05 µM soit deux fois plus que la majorité des échantillons (0,45 µM). Pour l'ensemble des échantillons de la crue d'octobre, le rapport entre les concentrations initiale et finale varie entre 4 (échantillon 9) et 11 (échantillon 3). En ce qui concerne les échantillons du suivi de février (9 et 10), le cuivre ajouté pour obtenir la CE₁₀₀ est

*Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:**Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne*

de l'ordre de 0,9 μM alors que la majorité des échantillons étudiés, possèdent des concentrations finales en cuivre deux fois moins importantes (0,46 – 0,56 μM). L'échantillon 6 présente, quant à lui, une concentration finale en cuivre de 0,29 μM . Pour l'ensemble des échantillons de la crue de février, le rapport entre les concentrations initiale et finale varie de 3 (échantillon 6) à 9 (échantillon 10).

Ces résultats illustrent que le pouvoir complexant des eaux de la Peyne varie également au cours d'un même évènement pluvial. D'après les résultats obtenus il semblerait qu'il soit plus fort en fin de crue. Pour une interprétation plus fine, ces résultats devraient être confrontés à l'analyse polarographique des eaux. Les teneurs en carbone organique dissous seraient également des données complémentaires.

II-2-2-2 Échantillons moyens

II-2-2-2-1 Station Montpezat

En ce qui concerne l'étude des échantillons moyens des crues répertoriées dans la Peyne, à la station de Montpezat, aucune toxicité directe n'a été décelée sur les échantillons moyens. Une stimulation algale est, au contraire, mise en évidence. Des résultats similaires sont observés lors de l'étude de l'activité estérasiq. Dans ces échantillons, les ajouts de cuivre nécessaires pour obtenir une inhibition totale de la croissance algale sont les suivants: 0,393 μM pour les échantillons moyens du 10 et 10-11 décembre, 0,197 μM pour celui du 12 décembre et 0,098 μM pour les échantillons moyens du 14 décembre 02 et du 6 janvier 03.

II-2-2-2-2 Exutoire du bassin versant de Roujan

En ce qui concerne l'étude des échantillons moyens des crues répertoriées à l'exutoire du bassin versant de Roujan, aucune toxicité directe n'a été décelée sur les échantillons moyens indépendamment du paramètre d'effet considéré. Dans ces échantillons, les ajouts de cuivre nécessaires pour obtenir une inhibition totale de la croissance algale sont les suivants: 0,197 μM pour les échantillons moyens du 9 octobre et 10 décembre et 0,393 μM pour ceux du 20 décembre 02 et du 27 février 03.

III- Étude de la spéciation des échantillons naturels d'eaux de ruissellement par DPASV

L'analyse de la spéciation, par DPASV en mode HMDE, des eaux de ruissellement des deux parcelles viticoles (NC et C) a été exclusivement restreinte au cuivre (potentiel de préélectrolyse de - 0,65V). On rappelle que le cuivre sous forme libre (Cu^{2+}) apparaît à un potentiel de pic (E_p) de +0,03 V dans un milieu non complexant (KNO_3 , 0,1 M) avec les conditions d'expérimentation suivantes: temps d'électrolyse de 180 secondes, amplitude des impulsions de 50 mV et balayage de 2 mV/s. Tous les potentiels de pic sont exprimés par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl(s) (KNO_3 , 0,1M) et avec une déviation standard de ± 10 mV. L'analyse polarographique est précédée systématiquement du passage d'un blanc (KNO_3 , 0,1M) de façon à vérifier la non contamination par les métaux de la cellule électrolytique et des électrodes.

III-1 Déformations des pics en DPASV

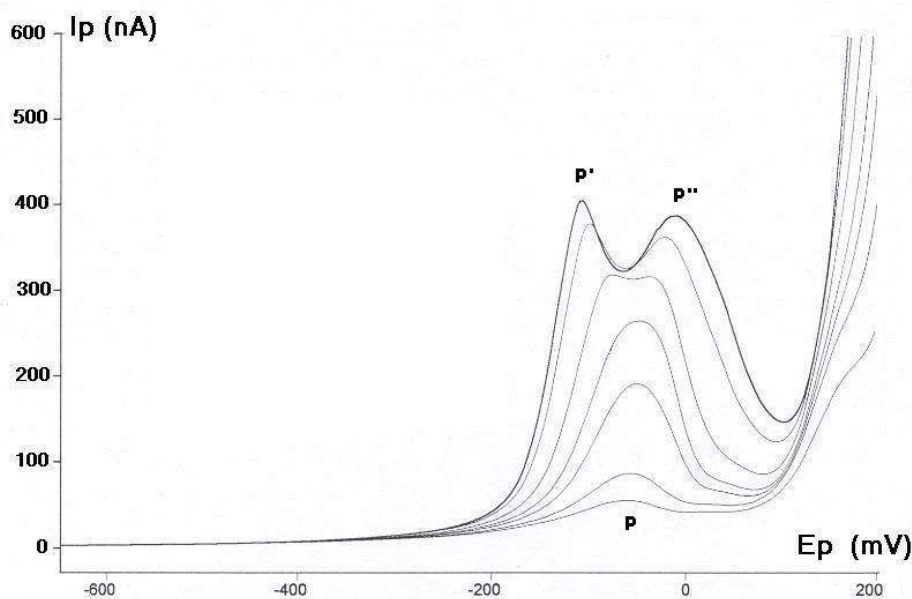
L'utilisation de la DPASV en milieu complexant naturel (présence de ligands hétérogènes) pose souvent des problèmes de déformation et/ou de dédoublement de pics. Batley (1986) a été l'un des premiers auteurs à le remarquer dans des eaux douces naturelles. La plupart des autres études ayant été menées dans des eaux de mer et d'estuaires (Nelson et Mantoura, 1984 ; Boussemart *et al.*, 1993). Dans notre étude, de telles modifications sont uniquement mises en évidence sur les échantillons de la parcelle C qui présentent pourtant les concentrations en COD les plus faibles (Figure VI-8 A).

Figures VI-8 A et B: Exemples de polarogrammes obtenus lors de l'analyse polarographique d'échantillons naturels d'eaux de ruissellement issues des parcelles C (A) et NC (B).

Les ajouts de cuivre sont les suivants: 0,16 / 0,79 / 1,57 / 3,15 / 6,29 / 9,44 μ M.

Conditions expérimentales: Potentiel de déposition: -0,65 V, durée de l'électrolyse: 180 secondes, amplitude des pulsations 50 mV, balayage du potentiel de -0,65 à +0,2 V à 2 mV/s.

Figure VI-8A: Exemple de l'échantillon C2



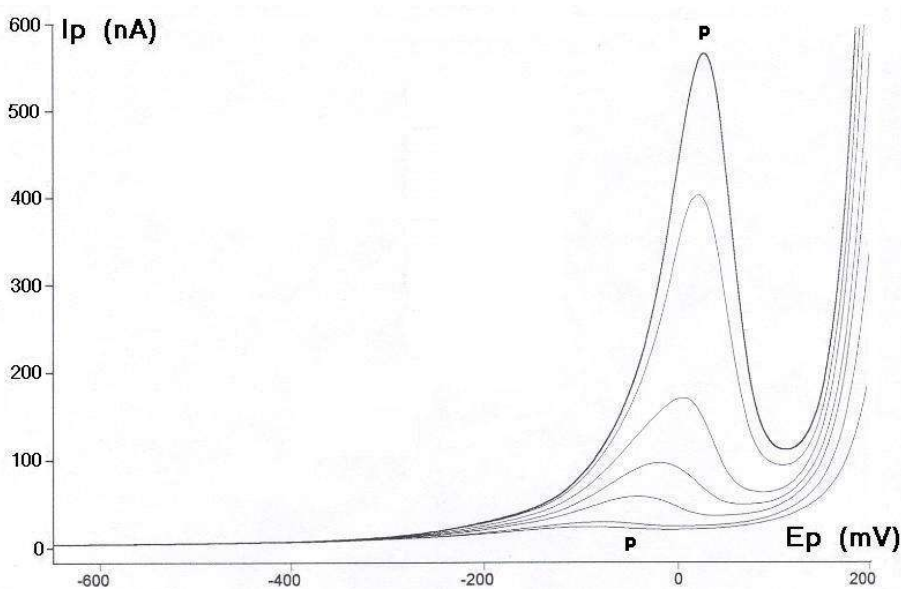
Lors de l'analyse polarographique de la majorité des échantillons naturels d'eaux de ruissellement issues de la parcelle C, on note la présence d'un pic unique (P) qui apparaît dans l'exemple choisi (C2) à un E_p de -66 mV. Au fur et à mesure des ajouts, on note une déformation du pic unique initial qui se différencie en deux pics bien distincts (P' et P'') pour des ajouts de cuivre supérieurs à $6,29$ μ M. Le pic (P') présente le potentiel de pic le plus négatif ($E_p = -105$ mV) qui va rester constant pour des ajouts supérieurs à $9,44$ μ M (variation standard de 10 mV). Par contre le pic (P'') va voir son potentiel de pic évoluer vers des valeurs plus positives pour enfin atteindre le potentiel de pic caractéristique du cuivre sous forme libre pour des ajouts de cuivre supérieurs à $15,7$ μ M (saturation de l'ensemble des

Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:

Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne

ligands de la double couche). On remarque que l'aspect du pic P' fait penser à un artefact (Ep constant) qui pourrait être vraisemblablement imputable à un phénomène d'adsorption à la surface de l'électrode de mercure et/ou à la formation d'un complexe inerte (Witter *et al.*, 1998). Une autre hypothèse, à confirmer, tendrait à faire penser que le pic observé à -66mV n'est pas dû au cuivre mais à Sb, Ag ou Sn, l'ajout de cuivre entraînant la formation de complexes plus stables (Ep contant du pic P').

Figure VI-8B: Exemple de l'échantillon NC4



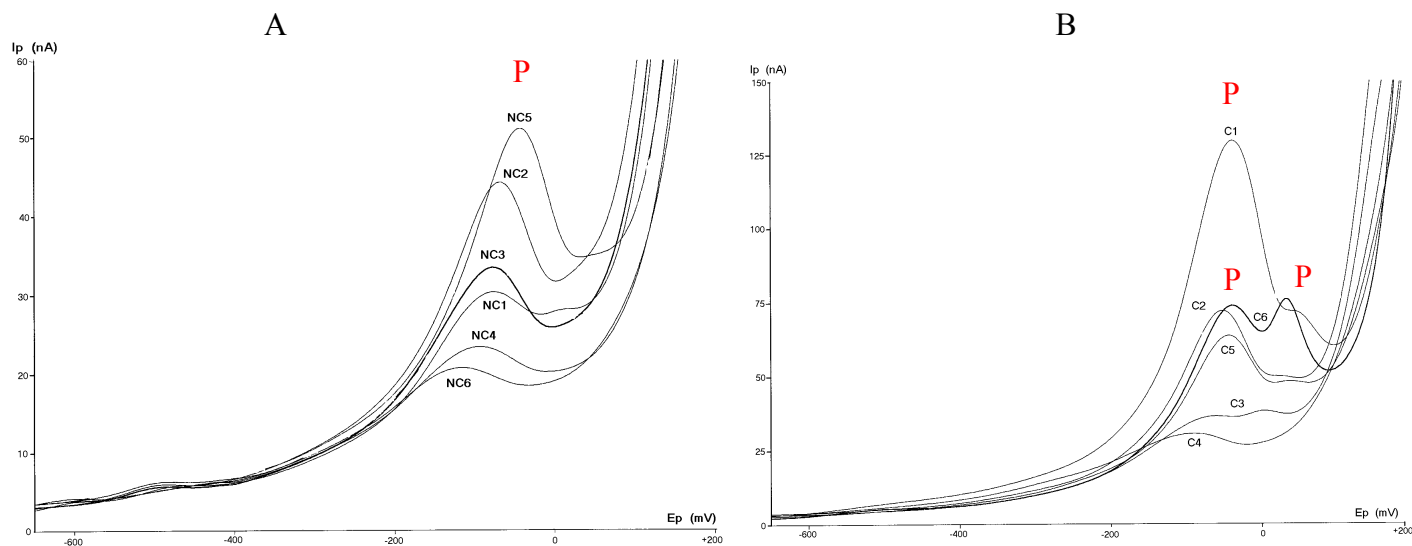
En ce qui concerne les eaux de ruissellement prélevées sur la parcelle NC, l'ensemble des échantillons naturels présente également un seul pic (P) qui apparaît à un Ep de -80 mV, lié à la présence de ligands dans la double couche qui complexent le cuivre (Exemple de l'échantillon NC4). Au fur et à mesure des ajouts, on note une évolution du pic P qui tend vers des valeurs de potentiel de pic plus positives. Ce pic semble englober deux signaux mal définis (Cu complexé et Cu²⁺ libre). Dans le cas de l'échantillon NC4, le potentiel de pic du cuivre libre s'affirme pour des ajouts de cuivre compris entre 3,15 et 6,29 µM (Ep = +20 mV).

Boussebart *et al.* (1993) ont suggéré que les modifications des profils des pics sont plus fonction de la nature et de la 'qualité' que de la quantité de matière organique présente. Ce phénomène de déformation peut également être expliqué par la vitesse à laquelle s'effectue la réaction chimique de formation du complexe ML qui succède à la réaction électrochimique de formation de l'amalgame (MHg) (Baron, 1990). Plus la réaction chimique sera lente, plus la cinétique de la réaction globale sera ralentie ce qui engendrera une déformation du pic ($I_{(nA)} = f(E)_{(mV)}$). Les valeurs des constantes cinétiques de formation et de dissociation du complexe ML ont une incidence directe et non négligeable sur l'allure et la symétrie des pics obtenus en DPASV. Les travaux plus récents menés par Botelho *et al.* (2002) dans des eaux naturelles de

surface suggèrent que le cuivre sous forme I stabilisé par les ligands organiques adsorbés sur l'électrode de mercure pourraient également être responsables de ces pics supplémentaires.

III-2 Résultats DPASV obtenus sur les eaux de ruissellement issues des deux parcelles expérimentales

Les polarogrammes obtenus sur les eaux de ruissellement de la parcelle NC permettent d'identifier un unique pic (P) à un E_p négatif bien inférieur à celui caractérisant le cuivre sous forme ionique (Figure VI-9A). Ce pic englobe deux signaux voisins caractérisant le cuivre complexé dans la double couche et le cuivre libre Cu^{2+} . Ceux obtenus sur les eaux de la parcelle C présentent soit un pic unique à un E_p négatif (P), soit deux pics bien distincts P et P'. Le second apparaît à l' E_p caractéristique de la forme Cu^{2+} (exemple de l'échantillon C6 Figure VI-9B).



Figures VI-9 A et B: Polarogrammes des échantillons naturels d'eaux de ruissellement des parcelles viticoles NC (A) et C (B).

Conditions expérimentales: Potentiel de déposition: -0,65 V, durée de l'électrolyse: 180 secondes, amplitude des pulsations 50 mV, balayage du potentiel de -0,65 à +0,2 V à 2 mV/s.

Les différents pics obtenus sur les eaux de la parcelle C permettent de différencier deux valeurs de potentiel de pic: -50 et -80 mV. Néanmoins, pour certains échantillons (C3, C5, C6), un second pic est détecté à l' E_p caractéristique du cuivre sous sa forme libre bien marqué pour l'échantillon C6 (Tableau VI-10). Ceux de la parcelles NC mettent en évidence trois valeurs de E_p dont -50 et -80 mV similaires à celles obtenues sur C et une valeur plus négative de -110 mV et aucun pic à l' E_p du cuivre libre n'est observé (Tableau VI-10). La détection de pics caractérisés par des valeurs négatives de E_p très inférieures à celle du cuivre sous forme libre traduit la présence de complexes électrochimiquement labiles du cuivre).

*Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:
Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne*

	Ep exp.	Ep ± (déviati on standard)
	mV	mV
C1	- 42	- 50 ± 10
C2	- 66	- 50 ± 10
C3	- 81 et +20	- 80 ± 10 et Ep (Cu ²⁺)
C4	- 93	- 80 ± 10
C5	- 49 et +36	- 50 ± 10 et Ep (Cu ²⁺)
C6	- 44 et +36	- 50 ± 10 et Ep (Cu ²⁺)
NC1	- 93	- 80 ± 10
NC2	- 76	- 80 ± 10
NC3	- 86	- 80 ± 10
NC4	- 80	- 80 ± 10
NC5	- 49	- 50 ± 10
NC6	- 123	- 110 ± 10

Tableau VI-10: Valeurs expérimentales des potentiels de pic (Ep) obtenus sur les eaux de ruissellement des parcelles C et NC. (*Valeurs exprimées en mV ± déviati on standard*).

La présence d'un pic au potentiel de pic caractéristique du cuivre libre permet de quantifier l'ion cuivrique présent à de très faibles concentrations respectivement égales à $2,5 \pm 0,5$; $1,1 \pm 0,9$ et $3,0 \pm 0,3$ nM pour les échantillons C3, C5 et C6. La quantification s'effectue à partir de la courbe d'étalonnage obtenue en milieu non complexant en se basant sur l'hypothèse que les hauteurs de pic sont proportionnelles à la concentration en cuivre ionique. Ces concentrations en cuivre libre sont très inférieures à la 72h-CE₅₀ de référence du cuivre ($0,08 - 0,11 \mu\text{M}$).

III-3 Estimation graphique et par le calcul de la capacité de complexation du cuivre dans les eaux de ruissellement de parcelles viticoles

Elle a été menée uniquement sur les échantillons non toxiques issus de la parcelle NC qui ne présentent pas de déformations de pics qui peuvent gêner l'interprétation des résultats polarographiques. De ce fait, même si l'échantillon C6 ne présente pas de toxicité directe, l'estimation de la capacité de complexation et de la constante de stabilité ne sera pas effectuée sur cet échantillon de façon à éviter une surestimation de la valeur de la capacité de complexation (Rodriguez Presa *et al.*, 1998 et références incluses).

III-3-1 Détermination graphique des capacités de complexation et des constantes de stabilité associées

La méthode des ajouts dosés de cuivre a été utilisée lors de l'analyse de la spéciation des échantillons naturels d'eaux de ruissellement par DPASV. Des additions de $0,16$; $0,79$; $1,57$; $2,36$; $3,15$; $3,93$ et $4,72 \mu\text{M}$ de cuivre puis des additions régulières de $1,57 \mu\text{M}$ ont été faites jusqu'à l'obtention du pic caractéristique de l'ion libre ($E_p = +30 \pm 10$ mV). La courbe des ajouts dosés de cuivre permet de distinguer deux régions. La première est caractérisée par la complexation des ions métalliques ajoutés et une concentration en ligands qui reste supérieure à la concentration totale (initiale + ajoutée) en cuivre. La seconde qui apparaît après un point

*Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:
Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne*

de rupture illustre la saturation des sites complexants. Ce point de rupture permet de déterminer et d'évaluer graphiquement la capacité de complexation des eaux (CC).

Exemple de l'échantillon NC5

Dans cet exemple, la détermination graphique de la CC donne une valeur de 3,1 µM (Figure VI-10). Si on considère les pentes des deux droites obtenues on peut également calculer la constante de stabilité K qui est définie par l'équation suivante (Pardo *et al.*, 1994):

$$K = (a_2 - a_1) / (a_1 * CC)$$

où a₁ et a₂ représentent respectivement les pentes de la première (a₁ = 36,755) et de la deuxième droite (a₂ = 86,815) et CC la capacité de complexation exprimée en M. Pour l'échantillon NC5, le logarithme de K ainsi calculé donne une valeur de 5,6.

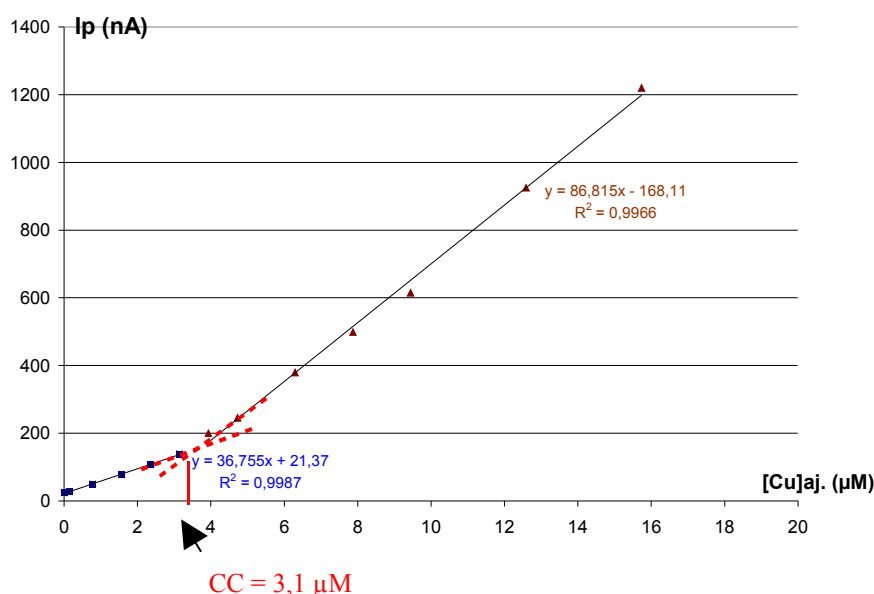


Figure VI-10: Estimation graphique de la capacité de complexation du cuivre pour l'échantillon NC5 à partir de la courbe obtenue par la méthode des ajouts dosés de cuivre.

Tous les résultats obtenus graphiquement sont compilés dans le tableau présenté en conclusion (Tableau VI-11) et seront comparés à ceux obtenus après linéarisation des données par la méthode de Ruzic (1982).

III-3-2 Linéarisation de Ruzic

Les données obtenues par la méthode des ajouts dosés de cuivre peuvent être linéarisées afin de calculer la capacité de complexation des eaux CC et la constante de stabilité associée K à partir de l'équation suivante (Ruzic, 1982):

$$[Cu'] / [[Cu]_T - [Cu']] = [Cu'] / [CC] + 1 / K * [CC]$$

*Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:
Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne*

Équation dans laquelle $[Cu']$ représente la concentration en cuivre électrochimiquement labile (y compris l'ion libre), $[Cu]_T$ la concentration totale en cuivre, CC la capacité de complexation du cuivre et K la constante de stabilité associée qui traduit le rapport $[ML] / [M]*[L]$.

En traçant la courbe $[Cu'] / [[Cu]_T - [Cu']]$ versus $[Cu']$, la pente de la droite obtenue est égale à $1/CC$ et l'ordonnée à l'origine est égale à $1/K*CC$ (Figure VI-11).

Afin de pouvoir établir une relation entre les résultats de toxicité et de spéciation, les échantillons n'ont subi aucune modification notable lors de l'étude par DPASV excepté l'ajout de l'électrolyte support inerte vis à vis du cuivre. De ce fait, dans la mesure où les ajouts dosés de cuivre ont été effectués dans un mélange complexe et potentiellement complexant (présence de matière organique naturelle hétérogène), on est contraint, pour pouvoir linéariser les données obtenues, d'effectuer une approximation des concentrations en cuivre labile $[Cu']$ qui seront estimées à partir de la courbe d'étalonnage du cuivre en milieu non complexant (KNO_3 , 0,1M).

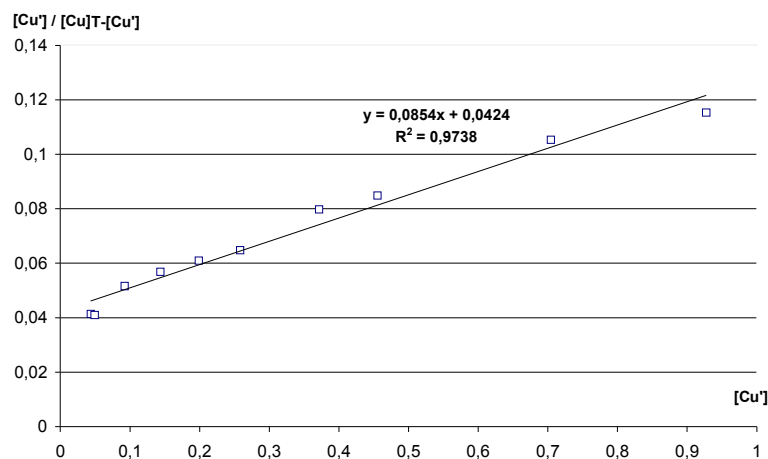


Figure VI-11: Linéarisation par la méthode de Ruzic des données obtenues lors des ajouts dosés effectués dans l'échantillon NC5.

Le tracé de la courbe des données linéarisées par l'équation de Ruzic (1982) permet d'accéder à la capacité de complexation égale à l'inverse de la pente de la droite obtenue. Dans l'exemple présenté la capacité de complexation prend une valeur de 11,7 μM (Figure VI-11). La constante de stabilité est quant à elle égale à l'inverse du produit entre la capacité de complexation (exprimée en M) et l'ordonnée à l'origine. Dans l'exemple choisi, le logarithme de K est de 6,3.

III-3-3 Conclusions

Les valeurs de CC estimées graphiquement et par la linéarisation de Ruzic sont équivalentes voire proches pour la plupart des échantillons excepté pour NC5 et NC6 (Tableau VI-11). Les CC estimées graphiquement varient de 2,35 à 4,0 μM , celles calculées de 3,5 à 11,7 μM . Cette différence peut être due à la présence de plusieurs types de ligands non pris en compte dans l'estimation des capacités de complexation, tout le raisonnement ayant été fondé sur

*Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:
Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne*

l'hypothèse de la présence d'un seul ligand. Classiquement, les substances humiques sont néanmoins divisées en acides humiques et fulviques. On estime, en effet, que la majorité de la matière organique naturelle est présente sous forme de 10% d'acides humiques et de 90% d'acides fulviques (Achterberg *et al.*, 1997 ; Huang et Wang, 2003).

Par ailleurs, les valeurs de log K sont du même ordre de grandeur, elles varient de 4,7 à 5,9 et de 6,3 à 7,0 respectivement en estimation graphique et par le calcul (Tableau VI-11). Elles sont caractéristiques de complexes faibles facilement dissociables.

	Graphiquement		Ruzic	
	CC	logK	CC	logK
	μM		μM	
NC1	3,6	4,7	3,5	7
NC2	3,6	5,1	3,7	6,8
NC3	4	5,1	4	6,9
NC4	3,2	5,4	5,1	6,75
NC5	3,1	5,6	11,7	6,3
NC6	2,35	5,9	6,3	6,7

Tableau VI-11: Compilation des valeurs de CC et de log K estimées graphiquement et par la linéarisation de Ruzic obtenues sur les échantillons non toxiques (parcelle NC uniquement).

IV- Relations potentielles entre Spéciation du Cuivre et Toxicité

Si on se réfère aux analyses polarographiques effectuées sur l'ensemble des échantillons d'eaux de ruissellement, la quasi-majorité ne présente pas de pic de cuivre libre ou possède des concentrations en cuivre libre de l'ordre du nM très inférieures à la 72h-CE₅₀ de référence du cuivre. Valeurs qui ne permettent pas d'expliquer la toxicité observée par l'élément cuivre. L'étude suivante nous permettra d'étudier les relations potentielles pouvant exister entre la nature des espèces de cuivre mises en évidence par DPASV et la toxicité engendrée par des additions contrôlées de cuivre menées exclusivement sur les échantillons d'eaux de ruissellement initialement non toxiques.

IV-1 Croisement des informations chimiques et biologiques

En parallèle de la méthode des ajouts dosés menée en DPASV, des additions de 0,10 ; 0,20 ; 0,39 ; 0,79 ; 1,57 ; 3,15 et 6,29 μM de cuivre ont été effectuées, lors de l'étude par bioessais, des échantillons d'eaux de ruissellement de la parcelle NC.

Le logiciel Regtox nous a, par la suite, permis d'estimer les ajouts nécessaires pour obtenir l'émergence de la toxicité que l'on fixe arbitrairement équivalente à la CE₁₀ (Buckley, 1994). On établit ensuite la correspondance avec les résultats obtenus en DPASV suite à des ajouts équivalents ou proches de ceux nécessaires à l'obtention de la CE₁₀ (Tableau VI-12), en posant l'hypothèse que le cuivre ajouté sous forme Cu(II) aux échantillons initialement non toxiques est responsable de l'émergence de la toxicité, et que les espèces mises en évidence par polarographie sont impliquées dans la toxicité observée. Les potentiels de pic caractérisant les espèces obtenues sont également reportés dans ce tableau.

*Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:
Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne*

	CE ₁₀	CE ₅₀	[Cu]ajouté (CE ₁₀)	Ep
	μM (intervalle de confiance 95%)		μM	mV (± déviation standard)
C6	0,17 (0,16 - 0,19)	0,77 (0,74 - 0,79)	0,16	- 44 et + 41 (± 10 mV)
NC1	1,26 (1,20 - 1,28)	3,89 (3,77 - 3,99)	1,57	-47 (± 10 mV)
NC2	0,57 (0,50 - 0,72)	1,5 (1,42 - 1,71)	0,8	-52 (± 10 mV)
NC3	1,51 (1,46 - 1,66)	3,07 (1,68 - 4,12)	1,57	-49 (± 10 mV)
NC4	1,29 (1,12 - 1,35)	3,12 (1,89 - 4,40)	1,57	-42 (± 10 mV)
NC5	2,85 (2,05 - 3,12)	5,99 (4,51 - 6,84)	3,15	22 (± 10 mV)
NC6	5,55 (4,53 - 6,38)	9,56 (9,21 - 10,82)	6,3	29 (± 10 mV)

Tableau VI-12: Ajouts de cuivre (μM) nécessaires pour obtenir les CE₁₀ et ₅₀ (estimation Regtox - intervalle de confiance 95%) dans l'ensemble des échantillons non toxiques. Potentiels de pic (Ep en mV) mesurés en DPASV pour des ajouts de cuivre proches de ceux nécessaires à l'obtention de l'émergence de la toxicité (CE₁₀).

Pour les échantillons NC5 et NC6 qui ont nécessité les ajouts en cuivre les plus importants, le pic détecté caractérise le cuivre sous forme libre, les Ep étant respectivement égaux à +22 et +29 mV. Il en est de même pour un des pics détecté sur l'unique échantillon non toxique issu de la parcelle carbonatée C6 (Ep = +41 mV). Tandis que pour les autres échantillons, les pics obtenus apparaissent à une valeur de potentiel de pic négative inférieure à celle du cuivre sous forme ionique. Les pics détectés sont caractérisés par un Ep négatif de $- 50 \pm 10$ mV. Les potentiels de pics à valeur négative sont caractéristiques d'espèces complexées mais électrochimiquement labiles du cuivre dans la mesure où des ajouts plus importants aboutissent à la mise en évidence d'un pic de cuivre libre (Davison, 1978 ; Van Leeuwen *et al.*, 1987 et 1989 ; Mota et Correia Dos Santos, 1995). Cette étude permet de conclure à la mise en évidence d'un complexe du cuivre labile CuL caractérisé par un Ep de $- 50 \pm 10$ mV. Ce complexe biodisponible semble être responsable de l'émergence de la toxicité dans les échantillons d'eaux de ruissellement initialement non toxiques. De plus, si on se reporte à l'étude préliminaire effectuée sur les échantillons naturels toxiques (sans addition de cuivre), ce potentiel de pic est mis en évidence pour les échantillons C1, C2, C5 (Tableau VI-10). Néanmoins, on souligne que ce complexe est également présent dans les échantillons naturels non toxiques C6 et NC5 mais vraisemblablement à une concentration non suffisante pour engendrer une réponse toxique.

En résumé, les deux études menées sur des échantillons initialement non toxiques, indiquent l'existence d'un complexe labile du cuivre CuL dont l'apparition est concomitante avec la toxicité lors d'additions successives de cuivre. Le potentiel de pic est cependant une bien pauvre information sur la nature probable de ce complexe. Par contre, sa différence avec la

*Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:
Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne*

valeur caractéristique de l'Ep du cuivre libre permet de conclure que l'émergence de la toxicité dans un cas, et l'inhibition totale de la croissance algale dans l'autre, sont liées à la présence d'un complexe électrochimiquement labile du cuivre.

L'émergence de la toxicité caractérisée par la valeur de la CE₁₀ (Buckley, 1994) est également une bonne estimation de la biodisponibilité du cuivre. Cet élément présent en excès par rapport à cette valeur est potentiellement biodisponible et susceptible d'inhiber de façon significative la croissance algale. La CE₁₀ peut être comparée aux valeurs de CC calculées par la méthode de Ruzic pour les eaux non toxiques de la parcelle NC (Tableau VI-13).

	CC	[Cu]aj. (CE ₁₀)	COD	[Cu] _T
	μM	μM	mg C/l	μM
NC1	3,5	1,6	5,6	0,55
NC2	3,7	0,8	12	0,8
NC3	4	1,6	10,4	0,7
NC4	5,1	1,6	8,3	0,4
NC5	11,7	3,15	17	1,1
NC6	6,3	6,3	10,7	0,3

Tableau VI-13: Comparaison des valeurs de CC obtenues par la linéarisation de Ruzic et des ajouts de cuivre nécessaires pour obtenir la CE₁₀ (μM). Concentrations en Carbone Organique Dissous (mg C/l) et totale en cuivre (μM) pour les échantillons non toxiques de la parcelle NC.

Les ajouts en cuivre effectués pour atteindre l'émergence de la toxicité sont inférieurs à ceux nécessaires pour saturer les ligands présents dans les eaux à l'exception de l'échantillon NC5. La mesure biologique (CE₁₀) semble être plus sensible que l'estimation chimique de la capacité de complexation. Ces résultats soulignent également le caractère toxique d'une espèce complexée du cuivre détectée par ailleurs par la méthode polarographique (DPASV). La détermination de la CE₁₀ semble être un meilleur moyen de prédiction de la biodisponibilité du cuivre que la méthode électrochimique en accord avec les conclusions de Neubecker et Allen (1983) et Buckley (1994). Elle apporte également des résultats complémentaires à la détermination de la CE₅₀.

IV-2 Calcul de la spéciation chimique par Mineql

Pour les échantillons toxiques d'eaux de ruissellement issues de la parcelle C, la détermination de la CE₁₀ n'est pas suffisante pour prédire la biodisponibilité du cuivre dans un contexte de multipollution.

De plus, de par la présence de pics additionnels lors de l'étude polarographique de ces échantillons, la capacité de complexation de ces eaux n'a pas pu être estimée ni graphiquement ni par la linéarisation de Ruzic. D'où l'utilisation d'une autre alternative pour déterminer la répartition des espèces du cuivre: le calcul par modélisation. Dans cette étude, nous avons opté pour l'utilisation du logiciel de calcul de spéciation Mineql. Il s'effectue par le logiciel de spéciation chimique Mineql+ version 3.01a (Schecher et McAvoy, 1994) à partir des constantes de stabilité obtenues, par la méthode des ajouts dosés de cuivre après

*Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:
Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne*

linéarisation des données obtenues par DPASV (Ruzic, 1982) uniquement sur les échantillons non toxiques de la parcelle NC. Ces valeurs exprimées en logarithme de K seront insérées dans le modèle au niveau du complexe Cu - substances humiques. Elles seront utilisées indifféremment pour le calcul de la répartition des espèces du cuivre dans les eaux des parcelles NC et C. Les mêmes conditions que celles développées précédemment ont été retenues.

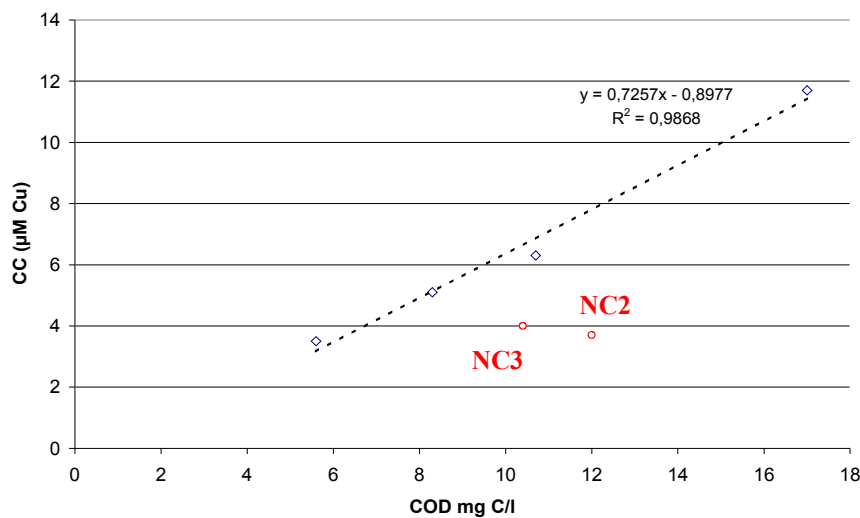
Les résultats de la répartition des espèces du cuivre dans les échantillons d'eaux de ruissellement des deux parcelles par le calcul Mineql sont les suivants. Dans les eaux de la parcelle NC, 99,5 à 99,9% du cuivre se trouve sous forme complexée avec la Matière Organique Naturelle (Cu-MON). La répartition des espèces du cuivre dans les eaux de la parcelle C figure dans le tableau VI-14.

	Cu-MON	Cu(OH) ₂	CuCO ₃
	% Total		
C1	59,8	37,9	2,1
C2	91,1	8,3	
C3	68	29,9	1,7
C4	62,4	34,6	1,9
C5	48,1	48,2	2,7
C6	78,7	20	1,1

Tableau VI-14: Répartition des espèces du cuivre dans les eaux de ruissellement de la parcelle C donnée par le calcul Mineql. (MON: Matière Organique Naturelle).

Dans la mesure où le nombre de sites de fixation des métaux est dépendant de la présence et de la nature de matière organique, une corrélation entre les valeurs de COD et de CC peut être attendue (Buykx *et al.*, 1999). Néanmoins, aucune corrélation simple n'est mise en évidence pour nos données excepté si les échantillons NC2 et NC3 sont négligés (Figure VI-12).

Figure VI-12: Comparaison des valeurs de capacité de complexation (µM Cu) et des concentrations en Carbone Organique Dissous (mg C/l) dans les eaux de ruissellement issues de la parcelle NC.



Cette non relation peut être imputable à la contribution des ligands inorganiques et des colloïdes organiques d'origines diverses et variées (Iyer et Sarin, 1992 ; Buykx *et al.*, 1999 ;

Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité du cuivre en présence d'une multipollution:

Suivis expérimentaux du bassin versant viticole de Roujan et de la Peyne

Van Veen *et al.*, 2002) non prise en compte dans le modèle à un seul type de ligand considéré lors de l'estimation de la capacité de complexation.

Jusqu'à présent les études qui concernaient la détermination de la capacité de complexation des eaux naturelles étaient basées sur des modèles simples à un voire deux ligands (Hart, 1981 ; Ruzic, 1982 ; Kyle, 1987 ; Van Leeuwen *et al.*, 1989 ; Pardo *et al.*, 1994 ; Achterberg *et al.*, 1997 ; Kozelka et Bruland, 1998) alors que des travaux récents ont permis de caractériser correctement respectivement trois (Pizeta et Branica, 1997) et quatre groupes de ligands différents (Lu et Allen, 2002) en laboratoire et en milieu naturel. Le modèle PROSECE (PRogramme d'Optimisation et de SpEciation Chimique dans l'Environnement) récemment développé en France (Université de Toulon) incorpore une représentation multi-ligands (Garnier *et al.*, 2004) plus proche de la réalité environnementale (hétérogénéité des sites fonctionnels de fixation). Ce modèle permet de mieux appréhender l'impact de la matière organique naturelle sur le comportement des métaux traces dans un milieu naturel complexe et de ce fait d'améliorer la définition de la spéciation des espèces présentes.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Les pollutions diffuses d'origine agricole sont devenues, à l'heure actuelle, une des préoccupations majeures pour la préservation des ressources en eau. Les produits phytosanitaires sont notamment, de plus en plus souvent, mis en cause dans la pollution des eaux de surface et souterraines (IFEN, 2002). Les pollutions engendrées par les métaux lourds issus d'activités anthropiques telles que la viticulture ou l'épandage de produits à valorisation agricole (boues résiduaire de station d'épuration, déjections animales) font partie des principales sources de contamination des sols, en France et en zones rurales, et sont susceptibles d'avoir un impact environnemental non négligeable sur les écosystèmes aquatiques récepteurs. Dans ce contexte, le travail effectué s'est appuyé sur un site soumis à l'influence de produits phytosanitaires organiques (Camargue, France). L'étude des facteurs influençant la biodisponibilité des métaux lourds a été effectuée sur deux sites, l'un, exclusivement exposé à une pollution métallique (cuivre, zinc) dans un milieu chargé en matières organiques (Solepur, Bretagne, France) et l'autre se situant dans un contexte de multipollution par des contaminants aussi bien métalliques qu'organiques (bassin versant viticole de Roujan, Hérault, France).

Dans un premier temps, l'étude méthodologique en laboratoire a permis de définir un gradient de toxicité pour les métaux et métalloïdes étudiés $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{As}$. Il est identique pour les deux algues étudiées, bien que *Chlorella sp.* soit une espèce algale plus tolérante que *Pseudokirchneriella subcapitata* aux contaminants métalliques. En effet, les 72h-CE₅₀ du zinc et de la forme V de l'arsenic obtenus avec *Chlorella sp.* sont respectivement sept et cinq fois plus élevées que celles observées avec *P. subcapitata*. Les niveaux d'effets qui ont été étudiés (croissance algale et activité estérasiq), présentent une sensibilité comparable pour la majorité des tests effectués à partir de standards de métaux et de métalloïdes. Cependant, l'activité estérasiq peut être stimulée en présence de certains contaminants, ce qui limite son intérêt en tant que marqueur d'effet chronique dans un milieu complexe.

Ces résultats illustrent la complexité des comparaisons entre les différentes données de la littérature de par les différents types de variabilités existantes qu'elles soient inter ou intra-laboratoires et/ou intra ou inter-espèces algales. A cela s'ajoute les facteurs liés à la procédure, à la nature du milieu de culture et aux variations de sensibilité des indicateurs d'effets spécifiques qui influencent également la réponse des contaminants.

Par la suite, l'étude du lien entre la spéciation du cuivre et du zinc dans des échantillons environnementaux et la toxicité observée a montré à la fois l'intérêt et les limites des outils utilisés. **L'analyse polarographique** des eaux a montré la coexistence de formes libre et complexées du cuivre dans le site viticole (Roujan) alors que sur le site chargé en matières organiques (Solepur), le cuivre est entièrement complexé. Le niveau de complexation du cuivre s'avère être fonction de la nature et de la quantité de matières organiques. Les complexes labiles du cuivre sont potentiellement biodisponibles voire toxiques pour les organismes aquatiques. Dans le cas du site viticole, il est délicat de lier la toxicité directe observée uniquement au cuivre de par la multipollution due aux pesticides organiques (e.g. Diuron) et à d'autres métaux ou métalloïdes (e.g. arsenic). De plus, l'influence des fongicides

utilisés en viticulture (Zineb, Maneb...) sur la spéciation du cuivre ne peut être négligée (complexes lipophiles et phénomènes d'interactions dus à la méthode d'analyse). Contrairement au cuivre, les polarogrammes obtenus sur des échantillons d'eaux de drainage et des solutions de sol (site Solepur), permettent d'identifier du zinc sous forme libre (environ 50% du zinc total). Les solutions de sol s'avèrent être toutes toxiques pour l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*, la réponse toxique pouvant être associée à l'élément zinc sous forme libre mis en évidence par polarographie.

Afin de définir la biodisponibilité du cuivre, des additions de cuivre ont été menées pour l'étude en parallèle des analyses polarographiques et des biotests sur des échantillons naturels initialement non toxiques. Cette étude nous a permis de mettre en évidence la **présence de complexes labiles avec le cuivre (CuL)**, responsables **de la toxicité** (article soumis).

Cette double approche (chimique – biologique) permet d'apporter des informations complémentaires sur la biodisponibilité des métaux. Cependant, même si cette étude a permis de mettre en évidence, la présence de complexes labiles avec le cuivre, aucune quantification n'a néanmoins été possible. La complexité de la composition des échantillons environnementaux rend difficile l'identification de ces complexes.

Il ressort, enfin, de l'étude de l'impact des traitements phytosanitaires de la riziculture, que l'interprétation finale des résultats de toxicité observée dans les eaux de riziculture, doit tenir également compte de la présence de métabolites de dégradation, de composés non détectés (limites de quantification ou contaminants non recherchés) et **des interactions ou non entre les différents polluants présents** (article en préparation).

En résumé, les études de laboratoire et les études de terrain mettent en lumière qu'une utilisation de plusieurs produits phytosanitaires a pour conséquence de rendre très complexe l'évaluation de l'exposition dans des contextes agricoles de multipollution ; chaque molécule nécessitant une évaluation précise de son devenir, de son comportement et de ses effets dans le contexte spécifique de l'étude. Par ailleurs, dans un environnement complexe soumis aux pressions des activités agricoles, les divers produits phytosanitaires présents sont susceptibles d'interagir entre eux et avec de nombreux composés dissous et particulaires (matières organiques naturelles et éléments minéraux).

Les tests *in vitro* n'apportent qu'une information relative à une espèce, en conditions contrôlées parfois éloignées des conditions réelles pour les populations autochtones. De ce fait, le peuplement périphytique, hautement et rapidement réactif aux variations du milieu aquatique, s'avère être un outil complémentaire pour la surveillance de la qualité des cours d'eau; il permet d'évaluer l'impact de la perturbation, à différentes périodes, notamment critiques (crue ou étiage) pour l'hydrosystème. Les perturbations engendrées par l'apport de produits phytosanitaires (Soldo et Behra, 2000) peuvent être abordées par:

Conclusions et Perspectives

- l'étude de la modification de la biodiversité (nombre total d'espèces différentes),
- la présence ou l'absence d'espèces sensibles à une pollution donnée ou au contraire d'espèces plus tolérantes,
- l'étude de la structure des populations (au sein d'une même espèce),
- l'étude de la reconstitution des populations phytoplanctoniques, en amont et en aval de la zone sous influence agricole,
- et l'utilisation d'indices de stress au niveau de l'organisme.

De plus, le phytoplancton n'est pas un acteur passif dans le processus de contamination, il est susceptible de modifier son environnement, en réponse à une pollution métallique. Les espèces planctoniques mettent en œuvre un certain nombre de mécanismes dont la synthèse de ligands intracellulaires (phytochélatines) et extracellulaires (exsudats), qui vont augmenter ou diminuer le prélèvement d'un métal en fonction de leurs besoins propres via la modification de sa spéciation. En perspective, l'analyse des phytochélatines pourraient s'avérer être un outil complémentaire dans la compréhension des mécanismes d'interaction des organismes avec leur milieu environnant, l'apparition d'un pool de phytochélatines pouvant être un excellent indicateur de pollution métallique (Pawlik-Skowronska, 2001). Il serait, par ailleurs, intéressant d'établir le rôle des exsudats comme indicateurs de stress, leur relargage étant considéré comme une stratégie cellulaire pour contrôler la biodisponibilité des métaux (Vasconcelos *et al.*, 2002).

Le couplage adéquat des méthodes de chimie analytique, de tests biologiques contrôlés et d'observations de l'état des populations *in situ* devraient servir de base à la caractérisation des risques liés aux activités agricoles en milieu méditerranéen pour les écosystèmes aquatiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Achterberg E.P., Van Ben Berg C.M.G., Boussemart M. and Davison W. (1997). Speciation and cycling of trace metals in Esthwaite Water : a productive english lake with seasonal deep-water anoxia. *Geochim. Cosmochim. Acta* **61**:5233-5253.

ADEME (1995). *Les micropolluants métalliques dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines*. Editions ADEME. Connaître pour agir : guides et cahiers techniques. 209 pp.

AFNOR (1977). Détermination de la résistivité ou de la conductivité électrique. Norme *NTF90-031*.

AFNOR (1985). Guide pour la détermination du carbone organique total. Norme *NTF90-102*.

AFNOR (1999). *Recueil de normes françaises. Qualité des sols*. AFNOR. France.

Agreste. Site statistique du Ministère de l'Agriculture. www.agreste.agriculture.gouv.fr

Agritox. Base de données et fiches d'information sur les substances actives phytopharmaceutiques. INRA. www.inra.fr/agritox/fiches.html

Ahner B.A., Kong S. and Morel F.M.M. (1995a). Phytochelatin production in marine algae. 1. An interspecies comparison. *Limnol. Oceanogr.* **40**:649-657.

Ahner B.A., Kong S. and Morel F.M.M. (1995b). Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. *Limnol. Oceanogr.* **40**:658-665.

Albanis T.A. (1992). Herbicide losses in runoff from the agricultural area of Thessaloniki in Thermaikos Gulf, N. Greece. *Sci. Total Environ.* **114**:59-71.

Allard P., Bardin O., Barthélémy C., Pailhès S. and Picon B. (2001). Eaux, poissons et pouvoirs, un siècle de gestion des échanges mer-lagune en Camargue. *NSS* **9**:5-18.

Alloway B.J. (1995). Soil processes and the behaviour of metals. In : *Heavy metals in soils*. Edited by B.J. Alloway, 2nd ed. London. Blackie Academic and Professional. 11-37.

Altenburger R., Backhaus T., Boedeker W., Faust M., Scholze M. and Grimme L.H. (2000). Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri* : mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**:2341-2347.

André F. (1995). Centre Français du Riz. In : *Recherches et production rizicole en France*. J. Chataignier & J-C. Mouret. *Cahiers Options Méditerranéennes* **24**:117-126

Andrea M. (1977). Determination of As species in natural waters. *Anal. Chem.* **49**:820-823.

Andrieux P., Bouzigues R., Joseph C., Voltz M., Lagacherie Ph. and Bourlet M. (1993). Le bassin versant de Roujan : caractéristiques générales du milieu. Montpellier, document INRA.

Andrieux P., Louchart X. and Voltz M. (1998). Effect of agricultural practices on run-off and erosion in vineyard fields in a Mediterranean climate. EGS General Assembly, Nice, France. *Annales Geophysicae*, **suppl. II, XXII**.

Antelo J.M., Arce F. and Penedo F. (1998). Effect of seasonal changes on the complexing of Cu(II) by dissolved organic matter in river water. *Water Res.* **32**:2714-2720.

APHA (1995). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Edited by APHA. Washington, 16th edition. 1268 pp.

Aposhian H.V., Zakharyan R.A. Avram M.D., Sampayo-Reyes A. and Wollenberg M.L. (2004). A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicol. Applied Pharmacol.* In press.

Apte S. and Batley G.E. (1995). Trace metal speciation of labile chemical species in natural waters and sediments: non electrochemical approaches. In: *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Edited by A. Tessier and D.R. Turner. New York, John Wiley and Sons. 259-306.

Arrêté du 8 janvier 1998. Prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées. *Journal officiel du 31/11/1998*:1563-1571.

Arsenault G., Cvetkovic A.D. and Popovic R. (1993). Toxic effects of copper on *Selenastrum capricornutum* measured by a flow cytometry based method. *Water Pollut. Res. J. Can.* **28**:757-765.

Arzul G. and Maguer J.F. (1990). Influence of pig farming on the copper content of estuarine sediments in Brittany, France. *Mar. Pollut. Bull.* **21**:91-107.

Aualiitia T.U. and Pickering W.F. (1986). Anodic stripping voltammetric study of the lability of Cd, Pb, Cu ions sorbed on humic acid particles. *Water Res.* **20**:1397-1406.

Aumaitre A. (1981). Utilisation of copper in pig-diet. In: *Copper in animal wastes and sewage sludge*. Edited by D. Reidel. Publishing Compagny, London. 25-37.

Backhaus T., Altenburger R., Boedeker W., Faust M., Scholze M. and Grimme L.H. (2000). Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**:2348-2356.

Baize D. (1994). Teneurs totales en 'métaux lourds' dans les sols français Premiers résultats du programme ASPITET. *Le courrier de l'environnement de l'INRA* **22**:37-46.

Baize D. (2000a). Teneurs totales en 'métaux lourds' dans les sols français. Résultats généraux du programme ASPITET. *Le courrier de l'environnement de l'INRA* n°**39**. 12 pp.

Baize D. (2000b). Guide des analyses en pédologie. Edité par l'INRA. 2^{ème} édition revue et augmentée, Paris. 257 pp.

Ballif J.L. (1995). Réduction de l'érosion hydrique d'un sol champenois. Conséquences de couverture de compost urbain et d'écorces broyées – Dispositif de Moussy (51), 1985-1994. *Bull. Réseau Erosion* **15**:437-448.

- Baron J. (1990). Etude sur les interactions des métaux lourds avec des boues d'épuration et des sols : complexation du cuivre et du cadmium des boues et spéciation dans des solutions de sols. Thèse de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour. 147 pp.
- Barrett M.R. and Lavy T. (1984). Effects of soil water content on oxadiazon dissipation. *Weed Sci.* **32**:697-701.
- Batey T., Berryman C. and Line C. (1972). Disposal of copper-enriched pig-manure slurry on grassland. *J. Br. Grassld. Soc.* **27**:139-142.
- Batley G.E. (1986). Interferences in the determination of copper in natural waters by anodic stripping voltammetry. *Anal. Chim. Acta* **189**:371-377.
- Beceiro-Gonzalez E., Taboada de la Calzada A., Alonso-Rodriguez E., Lopez-Mahia P., Muniategui-Lorenzo S. and Prada-Rodriguez D. (2000). Interaction between metallic species and biological substrates : approximation to possible interaction mechanisms between the alga *Chlorella vulgaris* and arsenic (III). *Trends Anal. Chem.* **19**:475-480.
- Belfroid A.C., Van Drunen M., Beek M.A., Schrap S.M., Van Gestel C.A.M. and Van Hattum B. (1998). Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* **222**:167-183.
- Benoit G. and Rozan T.F. (1999). The influence of size distribution on the particule concentration effect and trace metal partitioning in rivers. *Geochim. Cosmochim. Acta* **63**:113-127.
- Bentley-Mowat J.A. (1982). Application of fluorescence microscopy to pollution studies on marine phytoplankton. *Bot. Mar.* **25**:203-204.
- Bérard A. (1996). Effect of organic four solvents on natural phytoplankton assemblages : consequences for ecotoxicological experiments on herbicides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **57**:187-190.
- Berenbaum M.C. (1985). The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J. Theor. Biol.* **114**:413-431.
- Bernal M.P., Roig A., Lax A. and Navarro A.F. (1992). Effects of the application of pig slurry on some physico-chemical and physical properties of calcareous soils. *Bioresource Technol.* **42**:233-239.
- Besnard E. (1999). Influence d'amendements organiques sur la rétention du cuivre dans les sols du vignoble de Champagne : conséquences environnementales. Thèse de l'Université de Reims Champagne-Ardenne. 101 pp.
- Birraux C., Landry J-Cl. and Haerdi W. (1977). Application de l'électrode sélective au plomb à la détermination de constantes d'équilibre. *Anal. Chim. Acta* **90**:51-59.
- Bitton G. (1983). Bacterial and biochemical tests for assessing chemical toxicity in the aquatic environment : a review. *CRC. Crit. Rev. Environ. Control* **13**:51-67.

- Blanck H., Holmgren K., Lander L., Norin H., Notini M., Rosemarin A. and Sundelin B. (1989). Advanced hazard assessment of arsenic in the Swedish environment. In : *Chemicals in the aquatic environment. Advances Hazard Assessment*. Edited by L. Lander. Springer, Berlin. 256-328.
- Blair A.M. and Martin T.D. (1988). A review of the activity, fate and mode of action of sulfonylurea herbicides. *Pestic. Sci.* **22**:195-219.
- Blaise C. and Menard L. (1998). A micro-algal solid phase test to assess the toxic potential of freshwater sediments. *Water Qual. Res. J. Can.* **33**:133-151.
- Bliss C.I. (1939). The toxicity of poisons applied jointly. *Annu. Rev. Appl. Biol.* **26**:585-615.
- Botelho C.M.S., Boaventura R.A.R. and Simoes Goncalves M.L.S. (2002). Copper complexation with soluble and surface freshwaters ligands. *Electroanalysis* **14**:1713-1721.
- Boussemart M., Menargues L. and Benaïm J-Y. (1993). Anodic Stripping Voltammetry of copper in natural waters : a qualitative approach to the additional peaks occurrence. *Electroanalysis* **5**:125-133.
- Bradley B.L., Graber G., Condon R.J. and Frobish L.T. (1983). Effects of graded levels of dietary copper on copper and iron concentrations in swine tissues. *J. Anim. Sci.* **56**:625-630.
- Braude R. (1980). Twenty five years of widespread use of copper as an additive to diets of growing pigs. In : *Copper in animal wastes and sewage sludge*. Edited by P. L'Hermite and J. Dehandschutter. Proc. EEC Workshop, INRA Publisher, Bordeaux, France. 3-15.
- Branas J. (1984). Histoire et fonction du cuivre dans la viticulture de qualité. *Le Progrès Agricole et Viticole* **22**:521-523.
- Branch S., Corns W., Ebdon L. and al. (1991). Determination of As by hybride generation inductively coupled plasma mass spectrometry using a tubular membrane gas-liquid separator. *J. Anal. Atomic Spectrometry* **6**:155-158.
- Breeuwer P., Drocourt J-L., Bunschoten N., Zwietering M.H., Rombouts F.M. and Abee T. (1995). Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1614-1619.
- Bresnahan W.T., Crant C.L. and Weber J.H. (1978). Stability constant for the complexation of copper (II) ions with water and soil fulvic acids measured by an ion selective electrode. *Anal. Chem.* **50**:1675-1679.
- Brookes J.D., Geary S.M., Ganf G.G. and Burch M.D. (2000). The use of FDA and flow cytometry to assess metabolic activity. *J. Plankton. Res.* **22**:1579-1589.
- Brown H.M. (1990). Mode of action, crop selectivity and soil relation of the sulfonylurea herbicides. *Pestic. Sci.* **29**:263-281.

- Brown H.M. and Kearney P.C. (1991). Plant biochemistry, environmental properties and global impact of the sulfonylurea herbicides. In : *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals II*. American Chemical Society Symposium Series, Vol. 443.
- Brun L.A. (1998). Étude de l'accumulation, de la biodisponibilité et de la phytotoxicité du cuivre dans les sols viticoles de l'Hérault. Thèse de l'ENSA de Montpellier. 212 pp.
- Boedeker W., Altenburger R., Faust M. and Grimme L.H. (1992). Synopsis of concepts and models for the quantitative analysis of combination effects : from biometrics to ecotoxicology. *Arch. Complex Environ. Studies* **4**:45-53.
- Bolan N.S, Khan M.A., Donaldson D.C., Adriano D.C. and Matthew C. (2003). Distribution and bioavailability of copper in farm effluent. *Sci. Total Environ.* **309**:225-236.
- Bond A.M. (1980). *Modern polarographic methods in analytical chemistry*. M. Duinker Inc.
- Bond A.M. and Jones R.D. (1980). The analytical performance of direct current, normal pulse and differential pulse polarography with static mercury drop electrode. *Anal. Chim. Acta* **121**:1-11.
- Buckley J.A. (1994). The bioavailability of copper in wasterwater to *Lemna minor* with biological and electrochemical measures of complexation. *Water Res.* **28**:2457-2467.
- Buffle J.P. and Mallevalle J. (1974). Le rôle des matières humiques envisagées comme agent d'accumulation et véhicule des substances toxiques dans les eaux. *Tech. Sci. Mes.* **6**:331-340.
- Buffle J., Greter F-L. and Haerdi W. (1977). Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion-selective electrodes. *Anal. Chem.* **49**:216-222.
- Buffle J. (1980). A critical comparison of studies of complex formation between copper (II) and fulvic substances of natural waters. *Anal. Chim. Acta* **118**:29-44.
- Buffle J. (1988). *Complexation reactions in natural systems : an analytical approach*. Ellis Hordwood, Chichester.
- Buykx S.E.J., Cleven R.F.M.J., Hoegge-Wehmann A.A. and Van den Hoop M.A.G.T. (1999). Trace metal speciation in European river waters. *Fresenius J. Anal. Chem.* **363**:599-602.
- Cabaniss S.E. and Shuman M.S. (1986). Combined Ion-Selective Electrode and fluorescence quenching detection for copper-dissolved organic matter titrations. *Anal. Chem.* **58**:398-401.
- Campbell P.G.C. (1995). Interactions between trace metals and aquatic organisms : a critique of the free-ion activity model. In : *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Edited by A. Tessier and D.R. Turner. New York, John Wiley and Sons. 45-102.
- Campbell P.G.C., Errecalde O., Fortin C., Hiriart-Baert V.P. and Vigneault B. (2002). Metal bioavailability to phytoplankton – applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochem. Physiol. Part C* **113**:189-206.

Caux P-Y., Ménard L. and Kent R.A. (1996). Comparative study of the effects of MCPA, butylate, atrazine, and cyanazine on *Selenastrum capricornutum*. *Environ. Pollut.* **92**:219-225.

CERAFEL (1999). Cahier des charges pour l'utilisation des matières fertilisantes organiques en zones légumières. Comité Économique Régional Agricole Fruits et Légumes de Bretagne. Chambres d'Agriculture de Bretagne, version I du 3 juin 1999. 28 pp.

Chaignon V. (2001). Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées – Cas des sols viticoles contaminés par les fongicides. Thèse de l'Université d'Aix-Marseille. 165 pp.

Chauvelon Ph. (1996). Hydrologie quantitative d'une zone humide méditerranéenne aménagée - le Bassin de Fumemorte en Grande Camargue, Delta du Rhône. Thèse de l'Université de Montpellier II. 275 pp.

Cheng J., Chakrabarti C.L., Back M.H. and Schroeder W.H. (1994). Chemical speciation of Cu, Zn, Pb and Cd in rain water. *Anal. Chim. Acta* **288**:141-156.

Chèvre N. (2000). Etude et modélisation des effets écotoxiques d'un micropolluant organique sur *Daphnia magna* et *Pseudokirchneriella subcapitata*. Thèse de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne. 127 pp sans annexes.

Christensen T.H. and Lun X.Z. (1989). A method for determination of cadmium species in solid waste leachates. *Water Res.* **23**:285-291.

Christensen J.B., Botma J.J. and Christensen T.H. (1999). Complexation of Cu and Pb by DOC in polluted groundwater : a comparison of experimental data and predictions by computer speciation models (WHAM and MINTEQA2). *Water Res.* **33**:3231-3228.

Christie P. and Beattie J.A.M. (1989). Grassland soil microbial biomass and accumulation of potentially toxic metals from long-term slurry application. *J. Appl. Ecology* **26**:597-612.

Cid A., Fidalogo P., Herrero C. and Abalde J. (1995). Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum* : effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic Toxicol.* **31**:165-174.

Cid A., Herrero C., Torres E. and Abalde J. (1996). Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry. *Cytometry* **25**:32-36.

Clark G.M. and Goolsby D.A. (2000). Occurrence and load of selected herbicides and metabolites in the lower Mississippi River. *Sci. Total Environ.* **248**:101-113.

Clevers M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Letters* **142**:185-194.

Cobbett C.S. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* **123**:825-832.

Cole L., Nicholson R. and Casida J.E. (1993). Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pestic. Biochem. Physiol.* **46**:47-54.

- CMT 18/11/92 & CMT 14/01/98. Commission d'étude de la toxicité des produits antiparasitaires à usage agricole et assimilé.
- Coppenet M. (1974). L'épandage du lisier de porcherie : ses conséquences agronomiques. *Annales Agronomiques* **25**:403-423.
- Coppenet M., Golven J., Simon J.C., Le Corre L. and Le Roy M. (1993). Evolution chimique des sols en exploitation d'élevage intensif : exemple du Finistère. *Agronomie* **13**:77-83.
- Corralès M. (1987). Contribution à l'étude électrochimique du cuivre en milieu hydrogénocarbonate. Thèse de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour. 199 pp.
- Couture P., Vissier S.A., Van Coillie R. and Blaise C. (1985). Algal bioassays: their significance in monitoring water quality with respect to nutrients and toxicants. *Schweiz. Z. Hydrol.* **47**:127-158.
- Croot P.L., Karlson B., Van Elteren J.T. and Kroon J.J. (1999). Uptake of ⁶⁴Cu-Oxine by marine phytoplankton. *Environ. Sci. Technol.* **33**:3615-3621.
- Daniele S., Baldo M.A, Ugo P. and Mazzocchin G.A. (1989). Determination of heavy metals in real samples by anodic stripping voltammetry with mercury microelectrodes. 2 -Application to rain and seawaters. *Anal. Chim. Acta* **219**:19-26.
- Das A.K., de la Guardia M. and Cervera M.L. (2001). Literature survey of on-line elemental speciation in aqueous solutions. *Talanta* **55**:1-28.
- Das A.C., Debnath A. and Mukherjee D. (2003). Effect of the herbicide oxadiazon and oxyfluorfen on phosphates solubilizing microorganisms and their persistence in rice fields. *Chemosphere* **53**:217-221.
- Davison. W. (1978). Defining the electroanalytically measured species in a natural water sample. *J. Electroanal. Chem.* **87**:395-404.
- Davison W., De Mora S.J., Harrison R.M. and Wilson S. (1980). pH and ionic strength dependence of the ASV response of cadmium, lead and zinc in solution which simulate natural waters. *Sci. Total Environ.* **60**:35-44.
- Dayan and Duke (1997). In : *Herbicides Activity, Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*. IOS Press, Amsterdam.11-35.
- Degoe L.W., Wahlstrom R.C. and Emerick R.J. (1971). Studies of high level copper supplementation to rations for growing swine. *J. Anim. Sci.* **33**:53-57.
- De Mora S.J. and Harrison R.M. (1983). The use of physical separation techniques in trace metal speciation studies. *Water Res.* **17**:723-733.
- Dexter A.G., Gunsolus J.L. and Curran W.S. (1994). Herbicide mode of action and sugarbeet injury symptoms. North Dakota State University. Document internet. <http://www.ext.nodak.edu/extpubs/plantsci/rowcrops/a1085w.html>

Directive du 30/09/96. Adaptation de la Directive 67/548 de la Communauté Économique Européenne de 1967. *Rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses*. *Journal officiel n°196 du 16/08/1967*. 1-5

Directive 70/524 de la Communauté Économique Européenne (1970). *Additifs dans l'alimentation des animaux*. *Journal officiel n° L 270 du 14/12/1970*. 1-17.

Directive 91/676 de la Communauté Économique Européenne (1991). *Protection des eaux contre la pollution par les nitrates à partir de sources agricoles*. *Journal officiel n° L 375 du 31/12/1991*. 1-8.

Di Toro D.M., Allen H.E., Bergman H.L., Meyer J.S., Paquin P.R. and Santore R.C. (2001). Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1- Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**:2383-2396.

Donat J.R., Lao K.A. and Bruland K.W. (1994). Speciation of dissolved copper and nickel in South San Francisco Bay : a multi-method approach. *Anal. Chim. Acta* **284**:547-571.

Dorsey J., Yentsch C., Mayo S. and McKenna C. (1989). Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae. *Cytometry* **10**:622-628.

Duke S.O., Romagni J.G. and Dayan F.E. (2000). Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection* **19**:583-589.

El Jay A. (1996). Toxic effects of organic solvents on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **57**:191-198.

Environment Canada (1992). *Biological test method : growth inhibition test using the freshwater algae Selenastrum capricornutum*. EPS1/RM/25. Environment Canada. Ottawa, Ontario, Canada.

Errecalde O., Seidl M. and Campbell P.G.C. (1998). Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum* : an exception to the free-ion model. *Water Res.* **32**:419-429.

Eyrolle F. and Benaim J-Y. (1999). Metal available sites on colloidal organic compounds in surface waters (Brazil). *Water Res.* **33**:995-1004.

Fahl G.M., Kreft L., Altenburger R., Faust M., Boedeker W. and Grimme L.H. (1995). pH dependent sorption, bioconcentration and algal toxicity of sulfonylurea herbicides. *Aquatic Toxicol.* **31**:175-187.

Fairchild J.F., Ruessler D.S. and Carlson A.R. (1998). Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor and metachlor. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**:1830-1834.

Faust M., Altenburger R., Backhaus T., Blanck H., Boedeker W., Gramatica P., Hamer V., Scholze M., Vighi M. and Grimme L.H. (2001). Predicting the joint algal toxicity of multi-

- component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquatic Toxicol.* **56**:13-32.
- Faust M., Altenburger R., Backhaus T., Blanck H., Boedeker W., Gramatica P., Hamer V., Scholze M., Vighi M. and Grimme L.H. (2003). Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals in predictable by the concept of independent action. *Aquatic Toxicol.* **63**:43-63.
- Feng Y-L., Chen H-Y., Tian L-C. and Narasaki H. (1998). Off line separation and determination of inorganic arsenic species in natural water by high resolution inductively plasma mass spectrometry with hybriide generation combined with reaction of arsenic(V) and L-cysteine. *Anal. Chim. Acta.* **375**:167-175.
- Feron V.J. and Groten J.P. (2002). Toxicological evaluation of chemical mixtures. *Food Chem. Toxicol.* **40**:825-839.
- Figura P. and McDuffie B. (1979). Use of chelex resin for determination of labile trace metal fractions in aqueous ligand media and comparison of the method with anodic stripping voltammetry. *Anal. Chem.* **51**:120-125.
- Figura P. and McDuffie B. (1980). Determination of labilities of soluble trace metal species in aqueous environmental samples by anodic stripping voltammetry and chelex column and batch methods. *Anal. Chem.* **52**:1433-1439.
- Fish W. and Morel F.M. (1985). Propagation of errors in fulvic acid titration data: a comparison of three analytical methods. *Can. J. Chem.* **63**:1185-1193.
- Fisher J.C. and Martel M. (1992). Les métaux traces dans l'environnement marin. *Analisis Magazine* **20**:M38-M41.
- Florence T.M. and Batley G.E. (1977). Determination of the chemical forms of trace metals in natural waters, with special reference to copper, lead, cadmium and zinc. *Talanta* **24**:151-158.
- Florence T.M. and Batley G.E. (1980). Chemical speciation in natural waters. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* **9**:219-296.
- Florence T.M. (1982a). Development of physico-chemical speciation procedures to investigate the toxicity of copper, lead, cadmium and zinc towards aquatic biota. *Anal. Chim. Acta* **141**:73-94.
- Florence T.M. (1982b). The speciation of trace elements in waters. *Talanta* **29**:345-364.
- Florence T.M., Lumsden B.G. and Fardy J.J. (1983). Evaluation of some physico-chemical techniques for the determination of the fraction of dissolved copper toxic to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Anal. Chim. Acta* **151**:281-295.
- Florence T.M. (1986). Electrochemical approaches to trace element speciation in waters. A review. *Analyst* **111**:489-502.
- Flores-Rodriguez J. (1992). Les métaux toxiques dans les eaux pluviales en milieu urbain- Caractéristiques physico-chimiques. Thèse de l'Université de Paris XII. 229 pp.

- Flores-Velez L.M., Ducaroir J., Jaunet A.M. and Robert M. (1996). Study of the distribution of copper in an acid sandy vineyard soil by three different methods. *Eur. J. Soil Sci.* **47**:523-32.
- Forbes V.E. and Forbes T.L. (1997). *Ecotoxicologie : théorie et applications*. INRA. Paris.
- Franklin N.M., Stauber J.L., Markich S.J. and Lim R.P. (2000). pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*). *Aquatic Toxicol.* **48**:275-289.
- Franklin N.M., Stauber J.L. and Lim R.P. (2001a). Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**:160-170.
- Franklin N.M., Adams M.S., Stauber J.L. and Lim R.P. (2001b). Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **40**:469-480.
- Franklin N.M., Stauber J.L., Apte S.C. and Lim R.P. (2002). Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**: 742-751.
- Gala W. and Giesy J.P. (1994). Flow cytometric determination of the photoinduced toxicity of anthracene to the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Environ. Toxicol. Chem.* **13**:831-840.
- Galéa G. and Ramez P. (1995). Maîtrise du ruissellement et de l'érosion en vignoble de coteau. Guide à l'usage des aménageurs. Gestion des milieux aquatiques n° 10. Edité par le Cemagref.
- Gaggi C., Sbrilli G., Hasab El Naby A.M., Bucci M., Duccini M. and Bacci E. (1995). Toxicity and hazard ranking of s-triazine herbicides using microtox two green algal species and a marine crustacean. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**:1065-1069.
- Garmouma M., Blanchard M., Chesterikoff A., Ansart P. and Chevreuil M. (1997). Seasonal transport of herbicides (triazines and phenylureas) in a small stream draining an agricultural basin : Melarchez (France). *Water Res.* **31**:1489-1503.
- Garmouma M., Teil M.J., Blanchard M. and Chevreuil M. (1998). Spatial and temporal variations of herbicide (triazines and phenylureas) concentrations in the catchment basin of the Marne river (France). *Sci. Total Environ.* **224**:93-107.
- Garnier C., Pizeta I., Mounier S., Benaïm J-Y. and Branica M. (2004). Influence of the type of titration and of data treatment methods on metal complexing parameters determination of single and multi-ligand systems measured by stripping voltammetry. *Anal. Chim. Acta* **505**:263-275.
- Geoffroy L., Teisseire H., Couderchet M. and Vernet G. (2002). Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **72**:178-185.

- Gekeler W., Grill E., Winnacker E.L. and Zenk H. (1988). Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.* **150**:197-202.
- Geis S.W., Fleming K.L., Korthals E.T., Searle G., Reynolds L. and Karner D.A. (2000). Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**:36-41.
- Giannissis D. (1986). Etude des interactions des substances humiques avec les cations des métaux lourds. Thèse de l'Université de Rennes.
- Gibbs R. (1973). Mechanisms of trace metal transport in rivers. *Science* **180**:71-73.
- Gilbert F., Galgani F. and Cadiou Y. (1992). Rapid assessment of metabolic activity in marine microalgae : application in ecotoxicology tests and evaluation of water quality. *Mar. Biol.* **112**:199-205.
- Gilbin R. (2002). Caractérisation de l'exposition des écosystèmes aquatiques à des produits phytosanitaires - Spéciation, Biodisponibilité et Toxicité. Thèse des Universités de Montpellier I et de Genève (Suisse). 192 pp. ISBN 2-940153-34-5.
- Gimeno-Garcia E., Andreu V. and Boluda R. (1996). Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. *Environ. Pollut.* **92**:19-25.
- Gisy U. (1996). Synergistic interaction of fungicides in mixtures. *Phytopathology* **86**:1273-1279.
- Graymore M., Stagnitti F. and Allinson G. (2001). Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ. International* **26**:483-495.
- Grill E., Loeffler S., Winnacker E.L. and Zenk M.H. (1995). Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptide transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**:6838-6842.
- Grossmann K., Berghaus R. and Retzlaff G. (1992). Heterotrophic plant cell suspension cultures for monitoring biological activity in agrochemical research. Comparison with screens using algae, germinating seeds and whole plants. *Pestic. Sci.* **35**:283-289.
- Guéguen C. and Dominik J. (2003). Partitioning of trace metals between particulate, colloidal and truly dissolved fractions in a polluted river: the Upper Vistula River (Poland). *Applied Geochem.* **18**:457-470.
- Guéguen C., Gilbin R., Pardos M. and Dominik J. (2004). Water toxicity and metal contamination assessment of a polluted river : The Upper Vistula River (Poland). *Applied Geochem.* **19**:153-162.
- Guillot P. (1995). La riziculture française. *Cahiers Options Méditerranéennes* 15 n°4.

- Hanck K.W. and Dillard J.W. (1977). Evaluation of micro-molar compleximetric titrations for the determination of the complexing capacity of natural waters. *Anal. Chim. Acta* **89**:329-338.
- Hart B.T. (1981). Trace metal complexing capacity of natural waters : a review. *Environ. Technol. Letters* **2**:95-110.
- Hart B.T. and Davies S.H.R. (1981). Copper complexation capacity of waters in the Magela Creek system, Northern Australia. *Environ. Technol. Letters* **2**:205-214.
- Hartmann J. (1978). Identifying the priority contaminants toxicological aspects of animal effluents. In : *Animal and Human Health Hazards associated with the utilization of animal effluents*. Edited by W.R. Kelly. EEC Publication, Dublin, Ireland. 35-56.
- Heurteaux P., Mestres R. and Vaquer A. (1973). Contamination of the aquatic environment of the Camargue by pesticide residues. *Terre & Vie* **27**:33-61.
- Herteaux P. (1992). Modifications du régime hydrique et salin des étangs du système Vaccarès (Camargue, France) liées aux perturbations anthropiques des cinquantes dernières années. *Ann. Limnol.* **28**:157-174.
- Herteaux P. (1994). Essai de quantification des termes du bilan hydrique des étangs du système Vaccarès (Camargue, France). *Ann. Limnol.* **30**:131-144.
- Hertzberg R.C. and MacDonell M.M. (2002). Synergy and other ineffective mixture risk definitions. *Sci. Total Environ.* **288**:31-42.
- Heijerick D.G., Bossuyt B.T.A. and Janssen C.R. (2001). EuroEcole-Subproject 4. Evaluation and improvement of the ecological relevance of laboratory generated toxicity data. Draft final report for the international copper association.
- Heijerick D.G., Janssen C.R., Karlen C., Odnevall Wallinder I. and Leygraf C. (2002). Bioavailability of zinc in runoff water from roofing materials. *Chemosphere* **47**:1073-1080.
- Heyrovsky J. (1966). *Principles of polarographic*. Academic Press, New York and London.
- Hewlett P.S. and Plackett R.L. (1959). A unified theory for quantal responses to mixtures of drugs: non-interactive action. *Biometrics* **15**:591-609.
- Hill A. (1910). The possible effects of aggregation of the molecule of hemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.* **40**:IV-VII.
- Hu J-Y., Aizawa T. and Magara Y. (1999). Analysis of pesticides in water with liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Water Res.* **33**:417-425.
- Huang S. and Wang Z. (2003). Application of anodic stripping voltammetry to predict the bioavailable/toxic concentration of copper in natural water. *Applied Geochem.* **18**:1215-1223.

- Huang J-H. and Ilgen G. (2004). Blanck values, adsorption, pre-concentration and sample preservation of arsenic speciation in environmental water samples. *Anal. Chim. Acta* **512**:1-10.
- Hudson R.J.M. (1998). Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota ? Observations and predictions of non-equilibrium effects. *Sci. Total Environ.* **219**:95-115.
- Hughes M.F. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Letters* **133**:1-16.
- Hung D.Q., Nekrassova O. and Compton R.G. (2004). Analytical methods for inorganic arsenic in water : a review. *Talanta*. In press.
- Iyer V.N. and Sarin R. (1992). Modified anodic stripping voltammetry titration technique for estimating complexation capacity of natural waters. *Anal. Letters* **25**:1915-1927.
- Institut Français de l'ENvironnement - IFEN (2002). Les pesticides dans les eaux. Bilan annuel 2002. Etudes et Travaux n°36, Paris.
- INRA (1989). *L'alimentation des animaux monogastriques: porcs, lapins, volailles.* Documents INRA Paris. 282 pp.
- ISO (1999). Soil Quality. Guidance on the ecotoxicological characterisation of soils and soil materials. Normes *ISO TC 190/SC 7 ISO/DIS 15799*, Genève, Suisse. 36 pp.
- Jain C. and Ali I. (2000). Arsenic : occurrence, toxicity and speciation techniques. *Water Res.* **34**:4304-4312.
- Japenga J., Dalenberg J.W., Wiersma D., Scheltens S.D., Hesterberg D. and Salomons W. (1992). Effects of liquid animal manure application on the solubilization of heavy metals from soil. *International J. Environ. Anal. Chem.* **46**:25-39.
- Jondreville C., Revy P.S., Jaffrezic A. and Dourmad J.Y. (2002). Le cuivre dans l'alimentation du porc : oligo-élément essentiel, facteur de croissance et risque potentiel pour l'homme et l'environnement. *Productions animales* (INRA) **15**:247-265.
- Jonasson I.R. (1977). Geochemistry of sediment/water interactions of metals, including observations on availability. In: *The fluvial transport of sediment-associated nutrients and contaminants.* IJC/PLUARG. Edited by H. Shear and A.E.P. Watson. Windsor, Ontario, Canada. 255-271.
- Joubert G. (1980). A bioassay application for quantitative toxicity measurements using the green algae *Selenastrum capricornutum*. *Water Res.* **14**:1759-1763.
- Jung K., Bitton G. and Koopman B. (1995). Assessment of urease inhibition assays for measuring toxicity of environmental samples. *Water Res.* **29**:1929-1933.

- Juste C., Chassin P., Gomez A., Linères M., Mocquot B., Feix I. and Wiart J. (1995). Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduares des stations d'épuration urbaines. Convention Ademe/INRA. 209 pp.
- Källqvist T. and Romstad R. (1994). Effects of agricultural pesticides on planktonic algae and cyanobacteria - examples of interspecies variations. *Norwegian J. Agricult. Sci. Supplement* **13**:117-131.
- Kammerbauer J. and Moncada J. (1998). Pesticide residue assessment in three selected agricultural production systems in the Choluteca River Basin of Honduras. *Environ. Pollut.* **103**:171-181.
- Kasai F. and Hatakemaya S. (1993). Herbicide susceptibility in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Chemosphere* **27**:899-904.
- Kasai F. (1999). Shifts in herbicide tolerance in paddy field periphyton following herbicides application. *Chemosphere* **38**:919-931.
- Keddy C., Greene J.C. and Bonnell M.A. (1994). Examen des biotests effectués sur des organismes entiers pour l'évaluation de la qualité des sols, des sédiments et des eaux douces au Canada. Environnement Canada, Direction générale de la conservation des écosystèmes. Etude n°198, série scientifique. Ottawa (Ontario).
- Kim S.D., Ma H., Allen, H.E. and Cha D.K. (1999). Influence of dissolved organic matter on the toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia* : effect of complexation kinetics. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**:2433-2437.
- Knauer K., Behra R. and Sigg L. (1997). Effects of free Cu²⁺ and Zn²⁺ ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**:220-229.
- Knauer K., Ahner B., Xue H.B. and Sigg L. (1998). Metal and phytochelatin content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**:2444-2452.
- Knauer K., Behra R. and Hemond H. (1999). Toxicity of inorganic and methylated arsenic to algal communities from lakes along an arsenic contamination gradient. *Aquatic Toxicol.* **46**:221-230.
- Kolpin D.W., Thurman E.M. and Linhart S.M. (1998). The environmental occurrence of herbicides : the importance of degradates in ground water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **35**:385-390.
- Könemann W.H. and Pieters M.N. (1996). Confusion of concepts in mixture toxicology. *Food Chem. Toxicol.* **34**:1025-1031.
- Kozelka P.B. and Bruland K.W. (1998). Chemical speciation of dissolved Cu, Zn, Cd, Pb, in Narragansett Bay, Rhode Island. *Mar. Chem.* **60**:267-282.
- Kreuger J. (1998). Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990-1996. *Sci. Total Environ.* **216**:227-251.

Kyle J.H. (1987). The variation in apparent trace metal complexing capacity of natural waters with plating potential using Anodic Stripping Voltammetry. *Environ. Technol. Letters* **8**:181-188.

Label Écologique Communautaire (1998). Règlement de certification applicable aux amendements pour sols de la Communauté Européenne. Annexe 1. AFNOR.

Lafforgue M. (1928). La bouillie bordelaise. Communication au 1^{er} Congrès International de la Vigne et du Vin, Bordeaux, France.

Lara-Cazenave M-B. (1994). Spéciation de métaux lourds (Cadmium, Cuivre, Plomb et Zinc) dans les eaux de ruissellement. Thèse de Université de Pau et des Pays de l'Adour. 150 pp.

Laskowski R. (1995). Some good reasons to ban the use of NOEL, LOEC and related concepts in ecotoxicology. *OIKOS* **73**:140-144.

Laxen D.P.H. and Harrison R.M. (1981). A scheme for the physico-chemical speciation of trace metals in freshwater samples. *Sci. Total Environ.* **19**:59-82.

Lecomte J. (1981). Étude d'un schéma de spéciation du cadmium et du plomb - Application à l'étude de la préozonation d'eaux de rivière. Thèse de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour. 250 pp.

Legrand M.F., Costentin E. and Bruchet A. (1991). Occurrence of 38 pesticides in various French surface and ground waters. *Environ. Technol.* **12**:985-996.

Lennartz B., Louchart X., Voltz M. and Andrieux A. (1997). Diuron and Simazine losses in runoff water in Mediterranean vineyards. *J. Environ. Qual.* **26**:1493-1502.

Le Roux S. (1996). Etude de l'accumulation des métaux lourds (Cu, Zn, Fe, Co) sur un sol soumis à des épandages intensifs de lisiers de porcs. DEA Université de Bretagne Occidentale.

Levasseur P. and Texier C. (2001). Teneurs en éléments traces métalliques, des aliments et des lisiers de porcs à l'engrais, de truies et de porcelets. *Journées Recherche Porcine en France* **33**:57-62.

L'Herroux L., Le Roux S., Appriou P. and Martinez J. (1997). Behaviour of metals following intensive pig slurry applications to a natural field treatment process in Brittany (France). *Environ. Pollut.* **97**:19-130.

L'Herroux L. (1997). Devenir des éléments métalliques provenant des effluents d'élevage apportés aux parcelles agricoles. Étude du modèle expérimental "Solepur" et cas de l'estuaire de l'Aber-Wrach. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale. 211 pp.

Locatelli C. and Torsi G. (2000). Determination of Se, As, Cu, Pb, Cd, Zn and Mn by anodic and cathodic stripping voltammetry in marine environmental matrices in the presence of reciprocal interference. Proposal of a new analytical procedure. *Microchem. J.* **65**:293-303.

- Loez C.R., Topalian M.L. and Salibian A. (1995). Effects of zinc on the structure and growth dynamics of a natural freshwater phytoplankton assemblage reared in the laboratory. *Environ. Pollut.* **88**:275-281.
- Louchart X., Causeret F., Andrieux P., Lagacherie P., Rio P. and Voltz M. (1997). Première évaluation des risques et origines de la pollution diffuse des eaux de surface par les pesticides en zone viticole languedocienne. Document INRA, Montpellier.
- Lu Y. and Allen H.E (2002). Characterization of copper complexation with natural dissolved organic matter (DOM) – link to acidic moieties of DOM and competition by Ca and Mg. *Water Res.* **36**:5038-5101.
- Luoma S.N. (1995). Predictions of metal toxicity in nature from bioassays : limitations and research needs. In : *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Edited by A. Tessier and D.R. Turner. New York, John Wiley and Sons. 609-660.
- Ma H., Kim S.D., Cha D.K. and Allen H.E. (1999). Effect of kinetics of complexation by humic acid on toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**:828-832.
- MacGrath (1980). Implications of applying copper rich pig slurry to grassland: effects on plant and soil. In : *Copper in animal wastes and sewage sludge*. Edited by P. L'Hermite and J. Dehandschutter. Proc. EEC Workshop, INRA Publisher, Bordeaux, France. 144-153.
- Mahammedi D. (2001) Spéciation et biodisponibilité du cuivre et du zinc dans un sol ayant subi des épandages massifs de lisiers de porc. *DEA Géosciences de l'Environnement, Aix-Marseille III*.
- Mansouri E., Potin-Gautier M., Castetbon A. and Astruc M. (1992). Determination of the copper complexing capacity of dilute aqueous solutions of humic acids by DPASV titration in acetate buffer. *Environ. Technol.* **13**:969-978.
- Marking L.L. (1985). Toxicity of chemical mixtures. In : *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Edited by G.M. Rand and S.R. Petrocelli. Hemisphere, New York. 164-176.
- Marquardt D. (1963). An algorithm for the least squares estimation of non-linear parameters. *J. Soc. Indus. Appl. Math.* **11**:431-441.
- Martinez J. and Guiziou F. (1995). Mise au point et évaluation de la faisabilité d'un procédé naturel de traitement du lisier de porcs par le sol. 27^{èmes} Journées de la Recherche Porcine.
- Martinez J., Burton C.H., Sneath R.W. and Farrent J.W. (1995). A study of the potential contribution of sedimentation to aerobie treatment processes for pig slurry. *J. Agricult. Engineering Res.* **61**:87-96.
- Martinez J. (1997). Solepur : a soil treatment process for pig slurry with subsequent denitrification of drainage water. *J. Agricult. Engineering Res.* **66**:51-62.
- Martinez J. and Peu P. (1999). Étude de suivi d'un dispositif expérimental (biologique et physico-chimique) de sur-épandage de lisiers de porcs (1000 m³/ha/an). Suivi macrolysimètre SOLEPUR - Interactions Lisier-Sol-Eau. Editions du Cemagref, Rennes. 1-22.

- Martinez J. and Peu P. (2000a). Nutrient fluxes from a soil treatment process for pig slurry. *Soil Use and Management* **16**:1-8.
- Martinez J. and Peu P. (2000b). Evolution de la composition chimique des eaux de drainage dans un système d'épuration du lisier par le sol. *La Houille Blanche* **6**:61-66.
- Mathé D., Guillou D. and Flesselle S. (2001). Conséquences d'apports réduits en cuivre dans l'aliment du porc en croissance finition. *Journées Recherche Porcine en France* **33**:37-42.
- Mathevet R. and Mesleard F. (2002). The origins and functioning of the private wildfowling lease system in a major Mediterranean wetland : the Camargue (Rhône river delta : Southern France). *Land Use Policy* **19**:277-286.
- Mathevet R., Mouret J-C. and Mesléard F. (2002). Du mondial au local : originalité et dépendances de la riziculture camarguaise. *Faire Savoir* **2**:49-56.
- Mayer P., Cuhel R. and Nyhölml N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Res.* **31**:2525-2531.
- Meeus-Verdinne K., Scokart P.O. and De Borger R. (1986). Évaluation des risques pour l'environnement provenant des métaux lourds contenus dans les déchets animaux. *Revue de l'Agriculture* **39**:801-817.
- Menzi H. and Kessler J. (1998). Heavy metal content of manures in Switzerland. In: *Proceedings of the Eight International Conference of the FAO Network on Recycling of Agricultural Municipal and Industrial residues in Agriculture.*
- Meybeck M. (1986). Composition chimique des ruisseaux non pollués de France. *Sci. Geol. Bull.* **39**:3-77.
- Moffet J. (1997). Cu speciation and cyanobacterial distribution in harbours subject to anthropogenic Cu inputs. *Limnol. Oceanogr.* **42**:789-799.
- Mohan S.V., Mohan S.K. and Reddy S.J. (2000). Determination of organic matter in water using organo-metal complexes. *Water Res.* **34**:3761-3764.
- Molénat N., Holeman M. and Pinel R. (2000). L'arsenic, polluant de l'environnement : origines, distribution, biotransformations. *L'actualité chimique* **6**:12-23.
- Morel F.M. (1983). *Principles of Aquatic Chemistry*. New York : Wiley Interscience.
- Morrison G.P.M. and Florence T.M. (1989). Comparison of physicochemical speciation procedures with metal toxicity to *Chlorella pyrenoidosa*. Copper complexation capacity. *Electroanalysis* **1**:107-112.
- Mota A.M. and Correia Dos Santos M.M. (1995). Trace metal speciation of labile chemical species in natural waters - electrochemical approaches. In: *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Edited by A. Tessier and D.R. Turner. New York, John Wiley and Sons. 205-258.

- Muller F.L.L. (1996). Interactions of copper, lead and cadmium with the dissolved, colloidal and particulate components of estuarine and coastal waters. *Mar. Chem.* **52**:245-268
- Muyssen B.T.A. and Janssen C.R. (2001). Zinc acclimation and its effect on the zinc tolerance of *Raphidocelis subcapitata* and *Chlorella vulgaris* in laboratory experiments. *Chemosphere* **45**:507-514.
- Nagy G. and Korom I. (1983). Spale Hautsymptome der Arsenvergiftung aut Grund der Arsendemic in Bugae – Alsomonostor. *Z. Hautkr.* **58**:961-964.
- National Academy of Sciences (1977). *Medical and Biological Effects of Environmental Pollutants – Arsenic*. Washington, DC. 117-172.
- Nelson A. and Mantoura F. (1984). *J. Electroanal. Chem.* **164**: 237-267.
- Neubecker T.A. and Allen H.E. (1983). The measurement of complexation capacity and conditional stability constants for ligands in natural waters. *Water Res.* **17**:1-14.
- Newman M. and Jagoe C. (1994). Ligands and the bioavailability of metals in aquatic environments. In : *Bioavailability – Physical, Chemical and Biological Interactions*. Edited by J.L.L Hamelin., P.F. Bergman and H.L. Benson. USA, Lewis Pub. INC. 39-41.
- Nicholson F.A., Chambers B.J., Williams J.R. and Unwin R.J. (1999). Heavy metal contents of livestock feeds and animal manures in England and Wales. *Bioresource Technol.* **70**:23-31.
- Nicholson F.A., Smith S.R., Alloway B.J., Carlton-Smith C. and Chambers B.J. (2003). An inventory of heavy metals to agricultural soils in England and Wales. *Sci. Total Environ.* **311**:205-219.
- NRC (1998). *Nutrient requirements of surine*. 10th Edition. National Academy Press. Washington DC.
- Nyström B. and Blanck H. (1998). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and macromolecular synthesis in the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Aquatic Toxicol.* **43**:25-39.
- Nyström B., Björsäter B. and Blanck H. (1999). Effects of sulfonylurea herbicides on target aquatic micro-organisms. Growth inhibition of micro-algae and short-term inhibition of adenine and thymidine incorporation in periphyton communities. *Aquatic Toxicol.* **47**:9-22.
- O'Dell B.L. (1989). Mineral interactions relevant to nutrient requirements. *J. Nutr.* **119**:1832-1838.
- O'Donnel J.R., Kaplan B.M. and Allen H.E. (1985). Bioavailability of trace metals in natural waters. In : *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*. Seventh Symposium. Philadelphia.
- Okamura H., Piao M., Aoyama I., Sudo M., Okubo T. and Nakamura M. (2002). Algal growth inhibition by river water pollutants in the agricultural area around Lake Biwa, Japan. *Environ. Pollut.* **117**:411-419.

- Osteryoung J. and Hasebe K. (1976). Pulse polarography – Theory and application. *Review of Polarography* **22**:1-25.
- Paboeuf F., Nys Y. and Corlouër A. (2000). Réduction des rejets en cuivre et en zinc chez le porc charcutier par la diminution de la supplémentation minérale. *Journées Recherche Porcine en France* **32**:59-66.
- Paboeuf F., Calvar C., Landrain B. and Roy H. (2001). Impact de la réduction des niveaux alimentaires en matières azotées totales, en phosphore, en cuivre et en zinc sur les performances et les rejets des porcs charcutiers. *Journées Recherche Porcine en France* **33**:49-56.
- Pagenkopf G.K. (1983). Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes : role of complexation, pH and water hardness. *Environ. Sci.Technol.* **17**:342-347.
- Pardo R., Barrado E., Vega M., Deran L. and Tascon M.L. (1994). Voltammetric complexation capacity of waters of the Pisuerga river. *Water Res.* **28**:2139-2146.
- Pardos M., Benninghoff C. and Thomas R.L. (1998). Photosynthetic and population growth response of the test alga *Selenastrum capricornutum* Printz to zinc, cadmium and suspended sediment elutriates. *J. Appl. Phycol.* **10**:145-151.
- Paulsson M., Nyström B. and Blanck H. (2000). Long-term toxicity of zinc to bacteria and algae in periphyton communities from the river Göta Älv, based on a microcosm study. *Aquatic Toxicol.* **47**:243-257.
- Pawlik-Skowronska B. (2001). Phytochelatine production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water : effects of some environmental factors. *Aquatic Toxicol.* **52**:241-249.
- Petelet E. (1998). Application de la géochimie à l'étude des mouvements d'eaux à moyenne et petite échelle - Les bassins versants de l'Hérault et de la Peyne (France). Utilisation des éléments majeurs, traces et des isotopes du Sr et du Pb. Thèse de l'Université Montpellier II.
- Peterson H.G., Boutin C., Martin P., Freemark K.E., Ruecker N.J. and Moody M.J. (1994). Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. *Aquatic Toxicol.* **28**:275-292.
- Peterson S.M. and Stauber J.L. (1996). New algal enzyme bioassay for the rapid assessment of aquatic toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **56**:750-757.
- Peynot F. (1989). Influence des techniques électrochimiques sur la valeur mesurée de la capacité complexante. Évaluation de la labilité de certains complexes. Thèse de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour. 118 pp.
- Phinney J. and Bruland K. (1994). Uptake of lipophilic organic Cu, Cd and Pb complexes in the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environ. Sci.Technol.* **28**:1781-1790.

- Phinney J. and Bruland K. (1997a). Effects of dithiocarbamate and 8-hydroxyquinoline additions on algal uptake of ambient copper and nickel in South San Francisco Bay water. *Estuaries* **20**:66-76.
- Phinney J. and Bruland K. (1997b). Trace metal exchange in solution by the fungicides ziram and maneb (dithiocarbamates) and subsequent uptake of lipophilic organic zinc, copper and lead complexes into phytoplankton cells. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**:2046-2053.
- Pizeta I. and Branica M. (1997). Simulation and fitting of anodic stripping voltammetry data for determination of the metal complexing capacity. *Anal. Chim. Acta* **351**:73-82.
- Plackett R.L. and Hewlett P.S. (1952). Quantal responses to mixtures of poisons. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* **14**:143-163.
- Playle R.C. (1998). Modelling metal interactions at fish gills. *Sci. Total Environ.* **219**:147-163.
- Pösch G. (1993). Combined effects of drugs and toxic agents. Modern evaluation in theory and practice. Springer, Berlin, Germany.
- Pointed K. and Milliet A. (2000). PAHs analysis of fish whole gall bladders and livers from the Nature Reserve of Camargue by GC/MS. *Chemosphere* **40**:293-299.
- Pouget R. (1990). Histoire de la lutte contre le phylloxéra de la vigne en France (1865-1895). Document INRA, Paris. OIV, **103-110**:145-147.
- Poulsen H.D. (1998). Zinc and copper as feed additives, growth factors or unwanted environmental factors. *J. Anim. Feed Sci.* **7**:135-142.
- Power M., Attrill M.J. and Thomas R.M. (1999). Trends in agricultural pesticide (Atrazine, Lindane, Simazine) concentrations in the Thames Estuary. *Environ. Pollut.* **104**:31-39.
- Priem R. and Maton A. (1980). The influence of the content of trace metal elements in the feed on the composition of liquid manure of pig. In: Effluents from livestock. Edited by J.K.R. Gasser. Applied Science Publishers, Baking. 9-22.
- Price N.M. and Morel F.M.M. (1994). Trace metal nutrition and toxicity in phytoplankton. In: Algae and Water Pollution. Edited by L.R. Rai, J.P. Gaur and D.J. Soeder. Verlag, Stuttgart, Germany. 79-97.
- Procopio R., Viana O. and Henandez H. (1997). Microcolumn ion exchange method for kinetic speciation of copper and lead in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* **31**:3081-3085.
- Rachlin J.W. and Farran M. (1974). Growth response of the green algae *Chlorella vulgaris* to selective concentrations of zinc. *Water Res.* **8**:575-577.
- Ramade F. (1993). Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement. Ediscience international, Paris. 822 pp.

- Ran Y., Fu J.M., Sheng G.Y., Beckett R. and Hart B.T. (2000). Fractionation and composition of colloidal and suspended particulate materials in rivers. *Chemosphere* **41**:33-43.
- Raven J.A., Evans M.C. and Korb R.E. (1999). The role of trace metal in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynth. Res.* **60**:111-149.
- Regel R.H. (1997). The response of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) to heavy metals and stormwater. Honors thesis, University of Adelaide, SA, Australia.
- Regel R.H., Ferris J.M., George G.G. and Brookes J.D. (2002). Algal esterase activity as a bioassay of environmental degradation in a freshwater creek. *Aquatic Toxicol.* **59**:209-223.
- Reiriz S., Cid C., Torres E., Abbade J. and Herrero C. (1994). Different responses of the marine diatom *P. tricornutum* to copper toxicity. *Microbiologia* **10**:263-272.
- Reuters J.H. and Perdue E.M. (1977). Importance of heavy metal-organic matter interactions in natural waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* **41**:325-334.
- Revy P.S., Joindreville C., Dourmad J.Y. and Nys Y. (2003). Le zinc dans l'alimentation du porc : oligo-élément essentiel et risque potentiel pour l'environnement. *Productions animales INRA* **16**:3-18.
- Ribolzi O. (1996). Etude des mécanismes de genèse des crues par traçage naturel (chimique et isotopique) sur un bassin versant méditerranéen (Roujan, Hérault, France). Thèse de l'Université d'Aix-Marseille III. 191 pp.
- Ribolzi O., Andrieux P., Valles V., Bouzigues R., Bariac T. and Voltz, M. (2000). Contribution of groundwater and overland flows to storm flow generation in a cultivated Mediterranean catchment. Quantification by natural chemical tracing. *J. Hydrol.* **233**:241-257.
- Ribolzi O., Valles V., Gomez L. and Voltz M. (2002). Speciation and origin of particulate copper in runoff water from a Mediterranean vineyard catchment. *Environ. Pollut.* **117**:261-271.
- Rijstenbil J.W. and Wijnholds J.A. (1996). HPLC analysis of nonprotein thiols in planktonic diatoms : pool size, redox state and response to copper and cadmium exposure. *Mar. Biol.* **127**:45-54.
- Rioboo C., Gonzalez O., Herrero C. and Cid A. (2002). Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. *Aquatic Toxicol.* **59**:225-235.
- Roche H., Buet A., Jonot O. and Ramade F. (2000). Organochlorine residues in european eel (*Anguilla anguilla*), crucian carp (*Carassius carassius*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*) from Vaccares lagoon (French National Nature Reserve of Camargue) - effects on some physiological parameters. *Aquatic Toxicol.* **48**:443-459.
- Roche H., Buet A. and Ramade F. (2002). Relationships between persistent organic chemicals residues and biochemical constituents in fish from a protected area - The French National

- Nature Reserve of Camargue. *Comparative Biochem. Physiol. Part C* **133**:393-410.
- Rodriguez-Presa M.J., Catoggio J.A., Posadas D. and Tucceri R.I. (1998). Determination of the complexation capacity of waters. Measurements on model systems and natural waters employing copper as the titrating ion. *Environ. Technol.* **19**:45-54.
- Rousseau (1995). Utilisation du Cu en agriculture biologique. Impact sur l'environnement et perspectives de diminution des doses employées. Étude réalisée pour le Ministère de l'Environnement par l'Institut Technique de l'Agriculture Biologique, Paris.
- Rozan T. F. and Benoit G. (1999). Intercomparaison of DPASV and ISE for the measurement of Cu complexation characteristics of NOM in freshwater. *Environ Sci. Technol.* **33**:1766-1770.
- Ruzic I. (1982). Theoretical aspects of the direct titration of natural waters and its informations yield for trace metal speciation. *Anal. Chim. Acta* **140**:99-113.
- Sabater C., Cuesta A. and Carrasco R. (2002). Effects of bensulfuron-methyl and cinosulfuron on growth of four freshwater species of phytoplankton. *Chemosphere* **46**:953-960.
- Saenz M.E., Di Marzio W.D., Alberdi J.L. and Tortorelli M.C. (2001). Algal growth recovery studies after paraquat exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **66**:263-268.
- Salomon W. and Forstner U. (1984). *Metals in the hydrocycle*. Springer Verlag, New York. 349 pp.
- Sanders J.G. (1989). Effects of arsenic speciation and phosphate concentration on arsenic inhibition of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* **15**:424-428.
- Schecher W.D. and McAvoy D.C. (1994). *MINEQL+, User's Manual*. Environmental Research Software, Hallowell, ME.
- Schmalfuss J., Matthes B. and Böger P. (2000). Chloroacetamide mode of action. Abstract. Meeting Weed Science Society of America, Toronto **40**:117-118.
- Schmidt R.R. (1997). HRAC Classification of Herbicides according to mode of action. Brighton Crop Protection Conference. *Weeds* 1133-1140.
- Shuman M.S. and Cromer J.L. (1979). Copper association with aquatic fulvic and humic acids. Estimation of conditional formation constants with a titrimetric anodic stripping voltammetry procedure. *Environ. Sci. Technol.* **13**:543-545.
- Seyler P. and Elbaz-Poulichet F. (1996). Biogeochemical control on the temporal variability of trace element concentrations in the Oubangui river (Central African Republic). *J. Hydrol.* **180**:319-332.
- Sen Tran T., Cote D. and N'Dayegamiye A. (1996). *Agrosol.* **9**:21-30
- Sigg L., Stumm W. and Behra P. (1992). *Chimie des milieux aquatiques. Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement*. Editions Masson, Paris. 391pp.

- Simkiss K. and Taylor M.G. (1995). Transport of metals across membranes. In: *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Edited by A. Tessier and D.R. Turner. New York, John Wiley and Sons. 1-44
- Singer P.C. (1977). Influence of dissolved organic on the distribution, transport and fate of heavy metals in aquatic systems. In : *Fate of pollutants in the air and water environment*. Part I. Edited by I.H. Suffet. New York. 155-188.
- Snell T.W., Mitchell J.L. and Burbank S.E. (1996). Rapid toxicity assessment with microalgae using in vivo esterase inhibition. In : *Techniques in Aquatic Toxicology*. CRC Lewis. Chapitre II.
- Squibb K.S. and Fowler B.A. (1983). The toxicity of arsenic and its compounds. In : *Biological and Environmental Effects of Arsenic*. Edited by B.A. Fowler. Elsevier, New York. 233-269.
- Soderlund D.M. and Bloomquist J.R. (1989). Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Ann. Rev. Entomol.* **34**:77-96.
- Soldo D. and Behra R. (2000). Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquatic Toxicol.* **47**:181-189.
- Solomons N.W. (1983). Competitive mineral-mineral interaction in the intestine. Implications for zinc absorption in humans. In : *Nutritional bioavailability of zinc*. Edited by E.G. Inglett. American Chemical Society, Washington, DC. 247-271.
- Spliid N.H. and Koppen B. (1998). Occurrence of pesticides in Danish shallow ground water. *Chemosphere* **37**:1307-1306.
- Sprague J.B. (1970). Measurement of pollutant toxicity to fish. II - Utilizing and applying bioassay results. *Water Res.* **4**:3-32.
- Stauber J.L. and Florence T.M. (1987). Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Mar. Biol.* **94**:511-519.
- Stauber J.L. (1995). Toxicity testing using marine and freshwater unicellular algae. *Australas. J. Ecotox.* **1**:15-24.
- Stauber J.L. and Davies C.M. (2000). Use and limitations of microbial bioassays for assessing copper bioavailability in the aquatic environment. *Environ. Rev.* **8**:255-301.
- Stevens M.M., Helliwell S. and Warren G.N. (1998). Fipronil seed treatment for the control of chironomid larvae (Diptera : Chironomidae) in aerially-sown rice crops. *Field Crop Res.* **57**:195-207.
- St-Laurent D., Blaise C., MacQuarrie P., Scroggins R. and Trottier B. (1992). Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedures. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **7**:35-48.

- Stoeppler M. (1992). *Hazardous Metals in the Environment*. Elsevier. 1-98.
- Stumm W. and Lee G.F. (1961). Oxygenation of ferrous iron. *Ing. Eng. Chem.* **53**:143-146.
- Stumm W. and Morgan J. (1996). *Aquatic Chemistry – Chemical equilibria and rates in natural waters*. Third Ed. New York, John Wiley and Sons. 1022 pp.
- Sunda W.G. and Huntsman S.A. (1983). Effect of competitive interactions between manganese and copper on cellular manganese and growth in estuarine and oceanic species of the diatom *Thalassiosira*. *Limmol. Oceanogr.* **28**:924-934.
- Sunda W.G. (1989). Trace metal interactions with marine phytoplankton. *Biol. Oceanogr.* **6**:411-442.
- Sunda W.G. and Huntsman S.A. (1998). Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects : phytoplankton as model systems. *Sci. Total Environ.* **219**:165-181.
- Templeton D., Ariese F.N., Cornelis R. et al. (2000). IUPAC guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements : definitions, structural aspects and methodological approaches. *Pure Appl. Chem.* **72**:1453-1470.
- Tessier D.M. and Clark J.M. (1995). Quantitative assessment of the mutagenic potential of environmental degradation products of Alachlor. *J. Agricult. Food Chem.* **43**:2504-2512.
- Tessier A. and Turner D.R. (Eds.) (1995). *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. New York : John Wiley and Sons. 679 pp.
- Thompson J.A. (1997). Cellular fluorescence capacity as an endpoint in algal toxicity testing. *Chemosphere* **35**:2027-2037.
- Thornton I. (1999). *Copper in the environment*. Part I : Ecological cycling. Edited by J.O. Nriagu. John Wiley and Sons, New York. 171-216.
- Tiwangye N. (1995). An overview of electroanalytical methods to trace element speciation in natural waters. Symposium in Analytical Chemistry, Uganda.
- Torslov J. (1993). Comparison of bacterial toxicity tests based on growth, deshydrogenase activity and esterase activity of *Pseudomonas fluorescens*. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **25**:33-40.
- Toussaint M.W., Shedd T.R., Van Der Schalie W.H. and Leather G.R. (1995). A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**:907-915.
- Town R.M., Tercier M-L., Parthasarthy N., Bujard F., Rodak S., Bernard C. and Buffle J. (1995). A versatile macro- to micro-size stationary mercury drop electrode. *Anal. Chim. Acta* **302**:1-8.
- Town R. and Filella M. (2000). A comprehensive systematic compilation of complexation parameters reported for trace metals in natural waters. *Aquatic. Sci.* **62**:252-295.

- Tubbing D.M.J., Admiraal W., Cleven R.F.M.J., Iqbal M., Van de Meent D. and Verweij W. (1994). The contribution of complexed copper to the metabolic inhibition of algae and bacteria in synthetic media and river water. *Water Res.* **28**:37-44.
- Tuschall J.R.J. and Brezonik P.L. (1981). Evaluation of the copper anodic stripping voltammetry complexometric titration for complexing capacities and conditional stability constants. *Anal. Chem.* **53**:1986-1989.
- Underwood E.J. and Suttle N.F. (1999). Zinc. In: *The mineral nutrition of livestock*. 3rd edition. CABI Publishing, Wallingford, UK. 477-512.
- Unwin R.J. (1981). The application of copper in sewage sludge and pig slurry manure to agricultural land in England and Wales. In: *Copper in animal wastes and sewage sludge*. Edited by D. Riedel Publishing Company, London. 103-114.
- Urasa I.T. (1996). Development of new methods of speciation analysis. In: *Element speciation in bioorganic chemistry*. Edited by S. Caroli. J. Wiley and Sons. Chemical Analysis Series. **135**:121-151.
- Ure A.M. and Berrow M.L. (1982). The chemical constituent of soils. In: *Environmental Chemistry*. Edited by H.J.M. Bowen. Burlington House, London. 94-202.
- US. E.P.A. (1989). Green algae, *Selenastrum capricornutum*, Growth Test. Test method 1003.0, EPA/600/4-91/002. *Short-Term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. Cincinnati, USEPA.147-174.
- US. E.P.A. (1994). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Test method, EPA/600/4-91/002. Cincinnati, USEPA.
- Valenta P. (1983). Voltammetric studies on trace metal speciation in natural waters. Part I. In: *Methods in Trace Speciation in Surface Waters*. Edited by G.G. Leppard. Plenum Press, New York. 49-70.
- Valles S.M. and Koehler P.G. (1998). Insecticides used in the urban environment - Mode of action. Serie ENY-282 of the Entomology and Nematology Department. Institut of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 3 pp.
- Van Coillie R., Vissier S.A. and Couture P. (1981). Utilisation des bioessais avec des algues pour l'étude des répercussions liées à la mise en eau des réservoirs. *Ann. Limnol.* **17**:79-
- Van den Berg C.M.G., Wong P.T.S. and Chau Y.K. (1979). Measurement of complexing materials excreted from algae and their ability to ameliorate copper toxicity. *J. Fish. Res. Board Can.* **36**:901-905.
- Van der Heever J.A. and Grobbelaar J.U. (1998). In vivo chlorophyll *a* fluorescence of *Selenastrum capricornutum* as a screening bioassay in toxicity studies. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **35**:281-286.

- Van der Weiden C.H., Arnoldus M.J.H.L. and Meurs C.T. (1977). Desorption of metals from suspended material in the Rhine Estuary. *Neth. J. Sea Res.* **11**:130-145.
- Van Leeuwen H.P. (1987). Voltammetric titrations involving metal complexes : effect of kinetics and diffusion coefficients. *Sci. Total Environ.* **60**:45-55.
- Van Leeuwen H.P., Cleven R. and Buffle J. (1989). Voltammetric techniques for complexation measurements in natural aquatic media : role of the size of macromolecular ligands and dissociation kinetics of complexes. *Pure Appl. Chem.* **61**:256-274.
- Van Veen E., Burton N., Comber S. and Gardner M. (2002). Speciation of copper in sewage effluents and its toxicity to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**:275-280.
- Varney M.S., Turner D.R., Whitfield M. and Mantoura R.F.C. (1983). The use of electrochemical techniques to monitor complexation capacity titrations in natural waters. In : *Complexation of trace metals in natural waters*. Proceedings of the International Symposium, May 2-6, Texel, The Netherlands. 33-46.
- Vasconcelos M. and Gomes C. (1997). Complexation properties of natural and synthetic polymers of environmental and biological interest in the presence of Cu(II) at neutral pH. *European Polymer J.* 631-639.
- Vasconcelos M.T.S.D and Leal M.F.C. (2001). Adsorption and uptake of Cu by *Emiliania huxleyi* in natural seawater. *Environ. Sci. Technol.* **35**:508-515.
- Vasconcelos M.T.S.D., Leal M.F.C. and Van den Berg C.M.G. (2002). Influence of the nature of the exudates released by different marine algae on the growth, trace metal uptake and exudation of *Emiliania huxleyi* in natural seawater. *Mar. Chem.* **77**:187-210.
- Vasseur P., Dive D., Sokar Z. and Bonnemain H. (1988). Interactions between copper and some carbamates used in phytosanitary treatments. *Chemosphere* **17**:767-82.
- Vertes F. (1995). Accumulation en phosphore et en métaux lourds dans les sols d'exploitations d'élevage intensif en Bretagne. EAT. *Ingénierie* 45-50.
- Vindimian E., Robault C. and Fillion G. (1983). A method for co-operative and non co-operative binding studies using non linear regression analysis on a microcomputer. *J. Appl. Biochem.* **5**:261-268.
- Vindimian E. (2000). MSEXcel macro Regtox.6.3 freely available from Eric Vindimian, INERIS, France. <http://perso.wanadoo.fr/eric.vindimian>
- Vocke R.W., Sears K.L., O'Toole J.J and Wildman R.B. (1980). Growth response of selected freshwater algae to trace elements and scrubber ash slurry generated by coal-fired power plants. *Water Res.* **14**:141-150.
- Voltz M., Andrieux P., Bouzigues R., Moussa R., Ribolzi O., Joseph C. and Trambouze W. (1997). Main hydrological processes in a farmed catchment of the Mediterranean area. In : *Ecohydrological processes in small basins*. Edition Viville and Littlewood. 6th ERB conf., Strasbourg, France. Technical Document in Hydrology, Unesco, Paris **14**:111-115.

- Walsh G.E. and Merrill R.G. (1984). Algal bioassays of industrial and energy process effluents. In : *Algae as ecological indicators*. Edited by L.E. Shubert. Academic Press, London, U.K. 329-360.
- Wang J. (1985). *Stripping analysis – Principles, instrumentation and application*. VCH Publishers Inc.
- Ward T.L., Watkins K.L., Southern L.L, Hoyt P.G. and French D.D. (1991). Interactive effects of sodium zeolite-A and copper in growing swine : growth and bone and tissue mineral concentrations. *J. Anim. Sci.* **69**:726-733.
- Waters (1996). Operator's manual. Water Capillary Ion Analysis. Revised version 3, USA, Waters, Inc.
- Wauchope R.D., Buttler T.M., Hornsby A.G. and Augustijn-Beckers P.W.M. (1991). The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **123**:1-164.
- Wells P., Lee K. and Blaise C. (1997) (Eds). *Microplate Testing in Aquatic Toxicology*. Advances, Techniques and Practice. Boca Raton, CRC Press. 679 pp.
- Westall J.C., Zachary J.V. and Morel F.M. (1976). *MINEQL, a computer program for the calculation of chemical equilibrium composition of aqueous systems*. Ralph Parson Water Quality lab. Tech. Note 18. Mass. Inst. Tech.
- Wilson S.A., Huth T.C., Arndt R.E. and Skogerboe R.K. (1980). Voltammetric methods of determination of metal binding fulvic acid. *Anal. Chem.* **52**:1515-1518.
- Witter A.E., Mabury S.A. and Jones A.D. (1998). Copper (II) complexation in northern California rice field waters : an investigation using differential pulse anodic and cathodic stripping voltammetry. *Sci. Total Environ.* **212**:21-37.
- Wolska L., Wiergowski M., Galer K., Gorecki T. and Namiesnik J. (1999). Sample preparation for GC analysis of selected pesticides in surface water. *Chemosphere* **39**:1477-1486.
- Wong S.L., Nakamoto L. and Wainwright J.F. (1994). Identification of toxic metals in affected algal cells in assays of wastewaters. *J. Appl. Phycol.* **6**:405-414.
- Wren M.J. and McCarroll D.M. (1990). A simple and sensitive bioassay for the detection of toxic metals material using a unicellular green alga. *Environ. Pollut.* **64**:87-91.
- Ying G.G. and Williams B. (2000a). Laboratory study of the interaction between herbicides and sediments in water systems. *Environ. Pollut.* **107**:399-405.
- Ying G.G. and Williams B. (2000b). Dissipation of herbicides in soil and grapes in a South Australian vineyard. *Agricult. Ecosys. Environ.* **78**:283-289.

Yruela I., Alfonso M., Oritiz de Zarate et al. (1993). Precise location of the copper inhibitory binding site in higher plant and bacterial photosynthetic reaction centers as probed by light-induced absorption changes. *J. Biol. Chem.* **268**:1684-1689.

Yruela I., Alfonso M., Baron M. and Picorel R. (2000). Copper effect on the protein composition of photosystem II. *Physiol. Plant* **110**:551-557.

ANNEXES

FIGURES & TABLEAUX PRESENTES EN ANNEXES

Figures:

Figure X-1: Présentation géographique de la Camargue et de ses étangs.

Figure X-2: Les bassins de drainage de Grande Camargue (Chauvelon, 1996).

Figure X-3: Délimitation des espaces protégés de Camargue.

Figure X-4: Carte de la densité porcine en France par département (Source Agreste).

Figure X-5: Schéma du dispositif Solepur (TR: Parcelle Traitée et TE: Parcelle Témoin).

Figure X-6: Localisation du Bassin Versant de Roujan.

Figure X-7: Carte géologique simplifiée de la Basse Vallée du Bassin Versant de la Peyne (D'après E. Petelet, 1998).

Tableaux:

Tableau X-1: Calendrier des opérations culturales en fonction des différents stades de développement du riz (D'après F. André, 1995 / Centre Français du Riz).

Tableau X-2: Herbicides disponibles permettant de lutter contre les principales adventices des rizières de Camargue (*Herbicides à action polyvalente). Périodes et conditions d'application.

Tableau X-3: Part de la production agricole bretonne dans la production nationale. Principales productions animales et végétales et nombre de tête de bétail en millions (Source Agreste).

Tableau X-4: Recommandations des teneurs limites en zinc et en cuivre dans l'alimentation du porcelet et du porc charcutier par différents organismes compétents en relation avec les préconisations de l'actuelle directive.

Tableaux X-5 A&B: Teneurs en éléments métalliques répertoriées dans la littérature (valeurs exprimées respectivement en poids frais **A** et en poids secs **B**). Concentrations présentes dans les lisiers de porcs en fonction du stade physiologique et présentation des seuils réglementaires imposés, par les mesures préventives, pour limiter l'épandage des métaux lourds sur les sols cultivés (B).

Tableau X-6: Caractéristiques physico-chimiques du sol de départ (en 1991) de la parcelle traitée.

Tableau X-7: Teneurs totales en éléments traces dans les sols français (Ure et Berrow, 1982, Baize, 1994 et 2000a). *[Les médianes et la fourchette de concentrations comprises entre le 1^{er} et le 9^{ième} décile regroupent 80% des valeurs obtenues].*

Tableau X-8: Bilan des apports d'éléments sur la parcelle lors des épandages cumulés (1991 à 1995).

ANNEXE 1

I- La Camargue

1- Description du contexte, du milieu naturel, des caractéristiques climatiques

L'Île de Camargue ou Grande Camargue est située sur le 43° Nord de latitude, en bordure du bassin méditerranéen. Elle s'étend entre les deux bras du Rhône (Petit et Grand Rhône) (Figure X-1). A l'ouest du petit Rhône, la petite Camargue et la Camargue Gardoise et entre le Grand Rhône, la plaine du Crau et le Plan du Bourg prolongent cet espace deltaïque qui couvre au total 145 300 ha répartis entre terres à vocation agricole, pâturages, marais et étangs. Les milieux doux de la Haute Camargue liés à l'activité agricole, les milieux salés de la basse Camargue liés à l'activité salinière et les milieux saumâtres de la réserve nationale contribuent tous à la diversité biologique du delta.

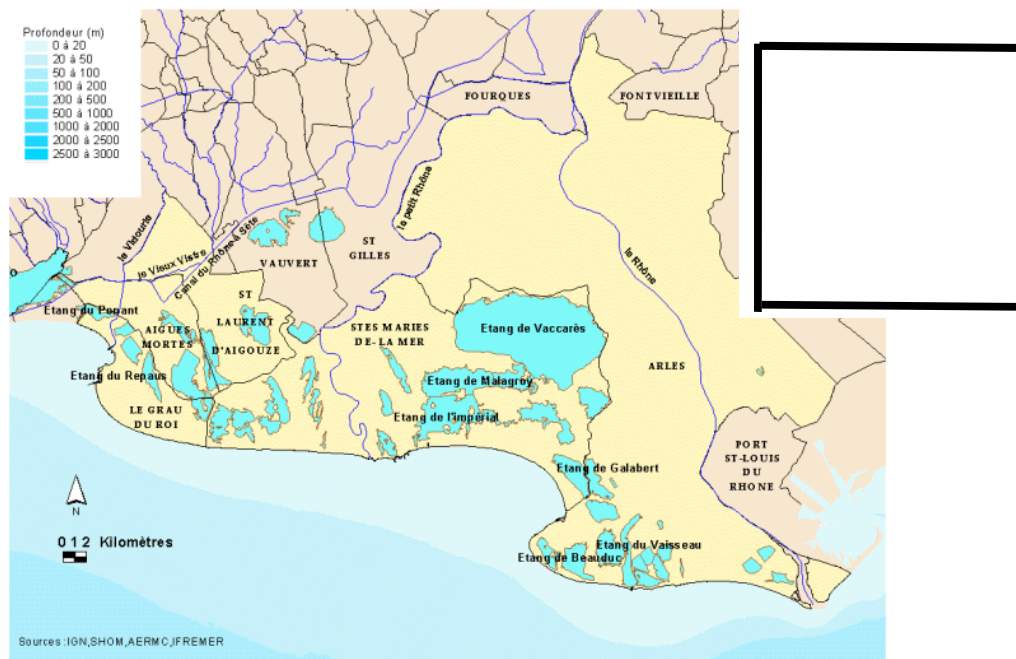


Figure X-1: Présentation géographique de la Camargue et de ses étangs.

La Camargue est un milieu marqué par des activités « antagonistes » qui par le passé ont donné lieu à des situations conflictuelles entre les agriculteurs, les pêcheurs, les saliniers et les protecteurs de la nature. L'actuelle configuration biogéochimique de la Camargue résulte de divers aménagements historiques destinés à favoriser des activités agricoles productives en luttant contre trois des contraintes naturelles majeures: les inondations du fleuve et de la mer, la salinité des sols et la présence de marais. Les endiguements réalisés ont permis de bien isoler hydrauliquement la zone des salins du reste de la Camargue. Les aménagements hydro-agricoles conçus pour la viticulture, puis améliorés et complétés lors du développement important de la riziculture ont conduit à la poldérisation de la plus grande partie de la Camargue agricole (Allard *et al.*, 2001).

1-1-La configuration des étangs du 'Système' Vaccarès

En Grande Camargue, la zone des étangs centraux est partagée par la presqu'île de Mornès qui sépare l'étang de Vaccarès au Nord (environ 6 600 ha) d'une mosaïque d'étangs au sud appelés étangs inférieurs du Vaccarès (environ 4 500 ha) (Figure X-1). Du fait des intercommunication qui existent (présence de passes et réseaux de chenaux naturels), l'ensemble des étangs forme une unité hydraulique fonctionnelle nommée 'Système Vaccarès'. Suite à la construction de la digue littorale (« Digue à la mer » 1857-1863), les échanges avec la mer sont contrôlés par l'homme au niveau de pertuis aménagés (Chauvelon, 1996 ; Allard *et al.*, 2001). Les étangs du système Vaccarès sont peu profonds. La profondeur moyenne du Vaccarès est de 1,4 m pour moins de 40 cm à la côte zéro pour les étangs inférieurs (Herteaux, 1992).

1-2 Les sols

Tous les sols de Camargue sont calcaires (15 à 20%), avec une prédominance d'éléments fins. La granulométrie est très variée. Elle est liée à la situation topographique, on retrouve des limons à bourrelets alluviaux en Haute Camargue au nord de l'étang du Vaccarès, des argiles sur les dépressions et des sables sur les cordons littoraux fluviaux marins. A faible profondeur, est présente une nappe d'eau à forte teneur en sel qui remonte naturellement par capillarité. Ce phénomène peut être stabilisé par la culture du riz qui exige une submersion permanente pendant environ 5 mois, période durant laquelle la nappe salée est « repoussée » (Guillot, 1995).

1-3 Le climat

La Camargue est soumise au climat méditerranéen 'provençal' et présente des particularités dues à la morphologie du milieu. Le climat de cette région est caractérisé par :

- la rareté des pluies réparties de façon très irrégulière dans l'année,
- une forte amplitude des températures,
- la violence et la fréquence des vents.

1-3-1 Le régime pluviométrique

Les pluies sont peu abondantes le plus souvent à caractère orageux. Le régime pluviométrique est caractérisé par une grande variabilité interannuelle et spatiale (Chauvelon, 1996). La situation particulière de la Camargue, entre le débouché du couloir rhodanien et la mer, conduit à un gradient pluviométrique orienté sud - nord. Les moyennes annuelles des précipitations varient de 550 à 600 mm pour 75 jours en moyenne de pluie par an. Elles se répartissent comme suivent :

- au printemps, la moyenne mensuelle est de 40 mm,
- en été, les précipitations sont rares avec un minimum pour le mois de juillet,
- la période de septembre à décembre présente les moyennes mensuelles les plus élevées (70 mm).

1-3-2 Le régime des températures et des vents

Les températures présentent une forte amplitude avec des minima de -5°C en hiver et des maxima de +30°C en été. Cette amplitude se manifeste également en intersaison, de -5°C à +15°C en hiver et de +10°C à +30°C en été.

De par sa situation géographique, en débouché de l'axe rhodanien, et de par sa large ouverture sur la mer, la Camargue est fréquemment balayée par des vents violents qui naissent en contact des masses d'airs marin et continental. Le mistral est le plus fréquent, il se manifeste toute l'année souvent violemment. Il entraîne la diminution de la température de l'air, de l'hygrométrie et de la nébulosité. Les vents marins provoquent l'effet inverse.

L'effet cumulé des vents, de la température et de l'insolation provoque une évaporation importante de l'ordre de 1500 mm/an. Au delà du déficit hydrique qu'il crée, ce phénomène provoque une remontée par capillarité des eaux salées de la nappe phréatique qui stérilisent les couches superficielles du sol. L'action du vent n'est pas totalement néfaste puisqu'il évite les gelées printanières en brassant l'air, il repousse également l'eau des étangs vers le sud (cas du mistral) et abaisse le niveau du rivage, ce qui favorise les écoulements des eaux de drainage.

2- La riziculture

La production rizicole en France est limitée au delta du Rhône dans la région de La Camargue (43°30'N, 4°30'E) où la superficie actuelle est de 24 000 ha. On en trouve également sur des petites surfaces dans les départements de l'Aude et de l'Hérault. Parmi les exploitations (au nombre de 220 en 2000), 53% ont plus de 100 ha de Surface Agricole Utile (S.A.U.) et exploitent 85% des terres cultivables de Camargue. La S.A.U. moyenne des exploitations rizicoles est de 160 ha et les exploitations cultivant plus de 150 ha de riz produisent la moitié du riz de Camargue (Mathevet *et al.*, 2002).

2-1 La culture du riz: calendrier cultural

2-1-1 Apport de pesticides

L'enchaînement des opérations culturales est réalisé de façon à caler le cycle végétatif du riz en fonction de ses exigences climatiques. Les pertes de productivité en riz ont des origines diverses: les adventices, les maladies foliaires et caulaires (virus, champignons, bactéries) et la présence d'insectes ravageurs (pyrales, chironomes, cicadelles) en sont les principales causes. Le tableau suivant (**X-1**) dresse une synthèse chronologique des principales opérations culturales effectuées en riziculture camarguaise (lutte contre le développement des adventices et contre la destruction de la récolte par les insectes ravageurs) en fonction du stade de maturation du riz.

Tableau X-1: Calendrier des opérations culturales en fonction des différents stades de développement du riz (D'après André, 1995 / Centre Français du Riz).

Périodes	Stades du riz	Opérations culturales
Après récolte De novembre à mars		Brûlis des pailles : limites les résidus – Déchaumage <i>cover crop</i> Travail du sol profond : labour ou outils à dents Nivellement : gestion optimale de la lame d'eau
Avril		Fertilisation de fond Préparation du lit de semences : <i>cover crop</i> et/ou herse rotative, rouleau
20 avril au 10 mai		Semis soit : * dans l'eau : semis à la volée avec épandeur d'engrais centrifuge * à sec : semis à la volée, semis en paquets, semis en ligne
20 avril à fin mai	Avant semis / début levée	Traitements herbicides contre les panisses – Algicide - Vermicide
Fin mai à début juin	À partir du stade 1 feuille À partir du stade 2-3 feuilles Début tallage (3-4 feuilles)	Herbicides de post-levée, contre les <i>Echinochloa</i> Herbicides de post-levée, action complémentaire anti-cypéracées Premier apport azoté de couverture
Début juillet	Plein tallage Début montaison Stade « épi 1cm »	Herbicides anti-cypéracées Second apport azoté de couverture
Fin juillet à début août	Début épiaison	Traitement contre la pyrale du riz (<i>Chilo suppressalis</i> w.)
Mi-septembre à fin octobre	Maturation	Récolte

2-1-2 La lutte contre les adventices: apports d'herbicides

Parmi les plantes adventices qui peuvent entrer en compétition avec le riz et les stratégies de lutte contre leur développement, on distingue:

- **Les riz sauvages** ('crodo') qui représentent le handicap majeur, notamment dans les situations de monoculture. Dans le cadre d'un desherbage en pré-semis, le traitement préconisé (Tableau X-2) est appliqué dans les jours suivant la mise en eau (lame d'eau 5 à 10 cm). Dans le cadre d'une destruction mécanique, la réalisation du lit de semence permet la levée des riz 'crodo' qui sont alors détruits mécaniquement juste avant le semis du riz cultivé (fin avril - début mai).
- Les **Cypéracées et les Echinochloa** sont détruits par l'application de différentes molécules présentées dans le tableau X-2.

Dans certaines situations, il est nécessaire de lutter contre des **adventices secondaires** soit en utilisant des herbicides anti-panisses et/ou anti-triangles ayant une efficacité secondaire identifiée sur les adventices présentes, soit en adoptant des programmes de desherbage diversifiés d'une année sur l'autre avec des herbicides ayant des spectres d'activité et des modes d'action différents. Les Heteranthera (*H. limosa* et *H. reniformis*), les Graminées perennes type *Paspalum paspalodes*, *Polygon monspeliensis* et *Leersia oryzoides*, les Dicotylédones type *Ammania coccinea*, *Lindernia dubia* et *Bidens sp.*, et *Typhja sp.* sont les principales adventices secondaires des rizières répertoriées par le Centre Français du Riz.

Adventices	Traitements	Période d'application Stade du riz	Niveau d'eau pour le traitement
Crodo - Riz sauvage	Oxadiazon	Pré-semis	5-10 cm
	Prétilachlore	Pré-semis	5-10 cm
	Prétilachlore + Fenclorim*	Racine 0.5-1 cm	5-10 cm
Echinochloa - Panisses	Molinate	Semis	5-10 cm
	Prétilachlore + Fenclorim*	Racine 0.5–1 cm	5-10 cm
	Quinchlorac*	1 feuille	gatile
	Cyhalofop-butyl	1 feuille	gatile
	Propanil*	3-4 feuilles	assec
	Azimsulfuron	3 feuilles	1-2 cm
Cypéracées - Triangles	Propanil*	3-4 feuilles	assec
	Azimsulfuron	3 feuilles	1-2 cm
	Bensulfuron-méthyle	2-3 feuilles	5-10 cm
	Cinosulfuron	2-3 feuilles	5-10 cm
	Bentazone	2-3 feuilles	assec
	Bentazone + Dichlorprop-p	plein tallage	assec
	2.4 MCPA	3-4 feuilles	assec

Tableau X-2: Herbicides disponibles permettant de lutter contre les principales adventices des rizières de Camargue (*Herbicides à action polyvalente). Périodes et conditions d'application.

2-2 Gestion hydraulique: réseaux d'irrigation et de drainage complexes

Le développement de la riziculture après la seconde guerre mondiale entraîna l'aménagement d'une vaste infrastructure hydraulique bouleversant radicalement le régime hydrique de la Camargue. Inondées de mai (éventuellement mi-avril) à septembre, les rizières nécessitent un apport d'eau du Rhône dont l'importance varie avec le mode de distribution. Herteaux (1994) estime qu'un hectare de rizière « consomme » en moyenne par saison 28 000 m³ d'eau. Les pertes par évaporation s'élèvent à 30 à 40% celles par infiltration à 18 à 36%. L'infiltration provoque la remontée des eaux souterraines et favorise le drainage de la nappe (2 à 3000 m³/ha) alors que 8000 à 12 000 m³/ha sont exportés par le réseau de drainage dans le milieu récepteur environnant (Herteaux, 1994). Plus de 200 km de canaux de drainage sont recensés en Haute Camargue (Chauvelon, 1996). La Grande Camargue est subdivisée en six bassins cultureux (Figure X-2), chacun possédant son propre réseau de drainage.

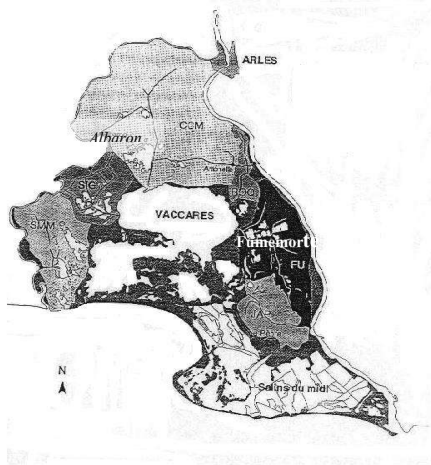


Figure X-2: Les bassins de drainage de Grande Camargue (Chauvelon, 1996).

CCM: Correge et Camargue – Major

FU: Fumemorte

JAP: Japon

SMM: Saintes Marie de la Mer

SIG: Sigoulette

Les rizières, zones humides artificielles et temporaires, nécessitent la disponibilité d'une ressource en eau constante durant la période la plus sèche de l'année impliquant une gestion hydraulique efficace.

2-2-1 Gestion de l'eau d'irrigation pour la riziculture

Le déficit hydrique peut apparaître dès le mois de mars et se prolonge en moyenne jusqu'au mois de septembre inclus. Pour une mise en valeur agricole des terres camarguaises, l'irrigation semble s'imposer. De ce fait, pour les besoins de l'agriculture en eau douce, un complexe réseau d'irrigation et de drainage a été développé, en aval des systèmes de pompage dans le Rhône.

La culture du riz est pratiquée en Camargue sur des parcelles drainées par des fossés et délimitées par des bourrelets de terre appelés levadons. Des seuils déversoirs y sont aménagés pour permettre de fixer le niveau d'eau maximum dans la rizière et d'en effectuer la vidange, l'arrivée d'eau d'irrigation se faisant à partir de petits canaux. La gestion de l'eau est fonction des différentes étapes du cycle cultural et des impératifs agronomiques.

2-2-1-1 Le semis et la levée

Le grain de riz semé avant ou peu de temps après la mise en eau, germe et se développe sous une lame d'eau de quelques centimètres. De la levée au début du tallage, le riziculteur va pratiquer un ou plusieurs « assecs » sur la culture, la rizière est ainsi vidée de son eau et le sol passe par un état de boue liquide ou « gâtille ». Les assecs sont limités dans le temps (8 à 10 jours) et leur positionnement adapté à celui des apports en herbicides et en azote pour maximiser leur efficacité (germination des semences favorisée par une meilleure oxygénation de la surface du sol).

2-2-1-2 Le « faux semis »

Cette technique de lutte contre la prolifération du riz sauvage (ou riz « crodo ») consiste à effectuer des mises en eau précoces (fin mars – début avril) susceptibles de déclencher la germination du riz crodo. Au stade de jeunes plantules, ils seront traités par un herbicide ou

éliminés de façon mécanique par un hersage. Dans les deux cas, une vidange supplémentaire (voire plus) est nécessaire par rapport au cycle cultural classique.

2-2-1-3 Le reste de la saison

Une lame d'eau de 6 à 10 cm est maintenue dans les rizières. Deux types d'irrigation sont pratiqués:

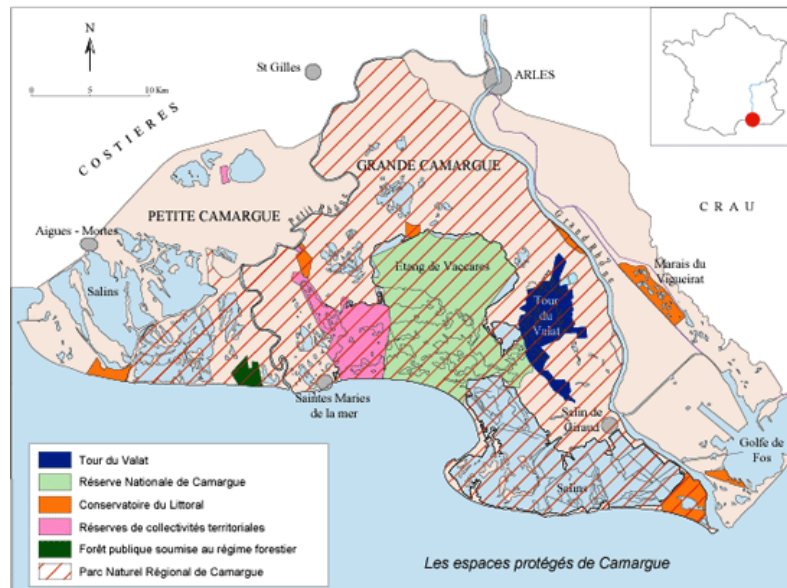
- classique: réajustement périodique de niveau de la lame d'eau,
- à la « surverse »: apport maintenu d'un flux constant d'eau d'irrigation, le trop-plein étant évacué par les seuils de déversements.

2-2-2 Autres usages des eaux d'irrigation et de drainage

Les principales cultures irriguées autres que le riz sont les vergers, les prairies et luzernières, les céréales (maïs, sorgho, soja, blé dur), le tournesol et autres oléagineux, les maraîchages et les asperges. Sur le secteur d'irrigation, des parcs piscicoles également alimentés par des eaux de drainage couvrent quelques hectares. De plus, l'approvisionnement en eau des fermes est assuré par les canaux d'irrigation. Il inclut en outre les besoins ménagers, l'arrosage des jardins, des potagers, l'abreuvement des manades et du bétail de ferme.

Le plus souvent, à l'état naturel, les marais temporaires sont secs de juillet aux premières pluies de l'automne. Cependant, pour la Grande Camargue, quelques 3000 ha de marais sont aménagés et maintenus en eau en été pour la chasse aux gibiers d'eau. Pour attirer les canards hivernants de retour de migration en août et rentabiliser la chasse au gibier d'eau, les marais de chasse sont maintenus en eau tout l'été par des apports rhodaniens directs et/ou des retours d'irrigation rizicole.

La figure suivante (X-3) illustre la répartition des différentes activités rencontrées en Camargue dans un souci d'harmonisation de la protection des espaces protégés et des activités annexes.



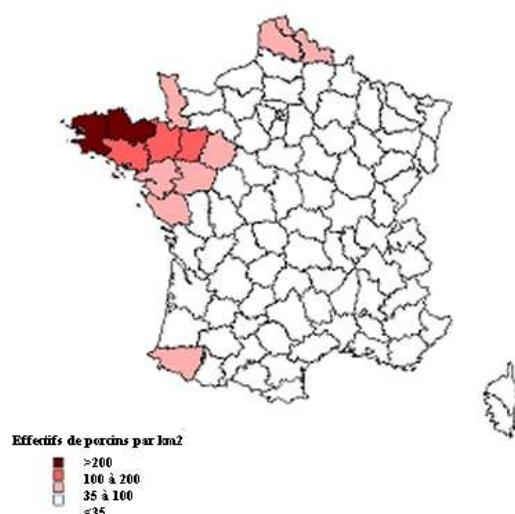
Figures X-3 : Délimitation des espaces protégés de Camargue

II- Le dispositif SOLEPUR

1 La Bretagne: les conditions climatiques et le contexte agricole

En Bretagne, le climat purement océanique, est caractérisé par de faibles variations annuelles de températures et une forte humidité. Les pluies y sont fréquentes mais peu abondantes. L'activité économique de cette région repose essentiellement sur une agriculture devenue intensive et sur un des plus importants élevages porcins d'Europe. En France, la production porcine est très concentrée géographiquement: le Nord, les Pays de la Loire, la Basse Normandie et la Bretagne représentent aujourd'hui plus de 70% du cheptel national (Figure X-4). La Bretagne est de loin la première région productrice de porcs aussi bien en France qu'en Europe. La production porcine représente plus de 57% de la production nationale sur seulement 6% de la surface agricole française (Tableau X-3). Cette place de « leader » n'est pas sans conséquence pour l'environnement. L'épandage de lisiers a conduit à une contamination reconnue des sols et par suite des eaux superficielles (eutrophisation des cours d'eau et des côtes) et souterraines (teneurs excédant les normes de potabilité) par les ions nitrates, phosphates, potassium en excès ainsi que certains éléments métalliques (cuivre et zinc en particulier) (Batey *et al.*, 1972 ; Meeus-Verdinne *et al.*, 1986 ; Christie et Beattie, 1989 ; Japenga *et al.*, 1992 ; Coppenet *et al.*, 1993 ; Vertes, 1995 ; Sen Tran *et al.*, 1996 ; L'Herroux *et al.*, 1997 ; Menzi et Kessler, 1998 ; Poulsen, 1998 ; Nicholson *et al.*, 1999, 2003 ; Bolan *et al.*, 2003). En Bretagne, l'augmentation des teneurs en cuivre et zinc dans les sols serait de l'ordre de 4 à 7 mg/kg pour le cuivre et de 15 à 20 mg/kg pour le zinc (Coppenet *et al.*, 1993 ; Baize, 2000a). Ces derniers sont exclusivement apportés par l'alimentation (Levasseur et Texier, 2001 ; Jondreville *et al.*, 2002 ; Revy *et al.*, 2003).

Figure X-4: Carte de la densité porcine en France par département. (Source Agreste)



	Production Bretonne	Nbre de têtes
Productions animales		
Porcs	57%	15 millions
Volailles (Poulets-Dindes)	40%	500 millions
Bovins	23%	
Lait	20%	2 millions
Productions végétales		
Choux-fleurs	73%	
Artichauds	72%	
Haricots verts	23%	

Tableau X-3: Part de la production agricole bretonne dans la production nationale. Principales productions animales et végétales et nombre de tête de bétail en millions.

(Source Agreste)

Actuellement, la mise en œuvre de procédés de traitement des lisiers vise exclusivement la réduction de leur teneur en azote. Dans le cas du phosphore, une réflexion est menée pour la mise en place d'une réglementation visant à raisonner les apports sur la base des quantités de P apportées. En revanche, pour les métaux, il n'existe aucun cadre fixant des limites pour les apports alimentaires, la législation actuelle (directive 70/574/CEE) préconisant des teneurs bien supérieures aux besoins réels des animaux. Pourtant des études françaises récentes (Mathé *et al.*, 2001 ; Paboeuf *et al.*, 2000 et 2001) ont montré expérimentalement que l'abaissement de la supplémentation en cuivre et en zinc dans l'alimentation des porcs en engraissement permet de réduire les rejets de ces éléments de façon significative (environ 75% pour le cuivre) sans modifier les performances des animaux.

L'augmentation significative des teneurs en ces deux métaux dans les sols pose la question de leur devenir et de leur impact sur les écosystèmes cultivés. Il faut en outre souligner que, simultanément à l'apport de ces métaux, ont été apportées des quantités élevées de matières organiques susceptibles de jouer un rôle important dans la spéciation, la mobilité chimique et par suite le transfert vers les eaux superficielles et souterraines d'une part (redistribution spatiale après épandages) et vers les organismes vivants d'autre part (biodisponibilité et toxicité de ces micropolluants).

2- L'épandage de lisiers de porcs: Apport de cuivre et de zinc

2-1 Apports par l'alimentation

Le cuivre et le zinc sont ajoutés en grande quantité aux aliments destinés à l'alimentation porcine (Levasseur et Texier, 2001 ; Jondreville *et al.*, 2002 ; Revy *et al.*, 2003). En raison de ses propriétés stimulantes sur la croissance, l'introduction de 150 à 250 mg/kg de cuivre (sous forme de sulfate de cuivre) dans l'alimentation du porc est pratiquée depuis les années 1950

(Braude, 1980). L'effet stimulant de l'addition de cuivre est surtout constaté chez le porcelet en post-sevrage, il s'amenuise pour les animaux en croissance (Ward *et al.*, 1991) et est pratiquement inexistant en période de finition (Bradley *et al.*, 1983).

Le zinc est, quant à lui, connu pour son effet antagoniste sur le cuivre. Cet effet s'exercerait par l'induction de la synthèse de métallothionéines qui séquestrent le cuivre dans l'entérocyte, empêchant son transfert vers la séreuse (Solomons, 1983 ; O'Dell, 1989). La tolérance du porc à des apports importants de cuivre est donc intimement liée à l'apport de zinc. Ainsi, nécrose du foie, ulcères gastriques et lésions rénales sont décrits par Degoey *et al.* (1971) chez des porcs en engraissement recevant un aliment contenant 500 mg/kg de cuivre non supplémenté en zinc. Ces signes disparaissent avec l'apport de 100 mg/kg de zinc dans l'aliment, sans modification de la teneur en cuivre du foie. Le zinc est également utilisé pour prévenir le développement d'une maladie de peau, la parakérose (Coppenet *et al.*, 1993).

Le cuivre et le zinc sont également des oligo-éléments essentiels qui participent à de nombreuses fonctions physiologiques dont l'intégrité ne peut être maintenue qu'en assurant un apport alimentaire suffisant de ces éléments. Ils entrent également dans la composition ou sont des co-facteurs de nombreuses enzymes (Underwood et Suttle, 1999). Les directives européennes actuelles (70/574/CEE) imposent des teneurs limites en cuivre et en zinc dans l'aliment en rapport avec l'âge de l'animal (Tableau X-4). Teneurs qui restent bien supérieures aux véritables besoins des animaux (Levasseur et Texier, 2001 ; Jondreville *et al.*, 2002 ; Revy *et al.*, 2003).

Tableau X-4: Recommandations des teneurs limites en zinc et en cuivre dans l'alimentation du porcelet et du porc charcutier par différents organismes compétents en relation avec les préconisations de l'actuelle directive (70/574/CEE).

	Recommandations INRA		Recommandations NRC		Directive actuelle 70/574/CEE	
	mg/kg					
	Zn	Cu	Zn	Cu	Zn	Cu
Porcelet	100	10	100	6	250	175
Porc charcutier	100	10	60	4	250	100

2-2 Teneurs métalliques dans les déjections animales

Priem et Maton (1980) ont démontré que la majeure partie du cuivre et du zinc apportée en compléments alimentaires n'est pas absorbée et se retrouve dans les fèces. De plus, la fraction assimilée est en partie éliminée par voie biliaire et urinaire. Environ 75% du cuivre et 95% du zinc ingérés se retrouvent dans les lisiers. D'autres métaux comme le manganèse, le cobalt et le cadmium sont également présents dans les déjections animales mais à ces concentrations plus faibles.

Le tableau (X-5) présente des teneurs en éléments métalliques répertoriées dans la littérature (valeurs exprimées respectivement en poids frais X-5A et en poids secs X-5B). Les seuils réglementaires imposés, par les mesures préventives, pour limiter l'épandage des métaux

lourds sur les sols cultivés sont également présentés (Tableau X-5B). Ces nouvelles réglementations concernent les boues de stations d'épuration d'eaux usées (Arrêté du 8 janvier 1998), les produits de jardinerie amateurs (Label Écologique Communautaire, 1998), tous produits organiques bruts ou transformés destinés aux principales zones légumières bretonnes (CERAFEL, 1999). Baize (2000a) estime que les seuils actuels sont placés trop haut pour signaler la plupart des anomalies, qu'elles soient naturelles ou anthropiques, il propose donc d'autres valeurs pour un seuil d'investigation plus fin (Tableau X-5B).

A	Fe		Mn		Zn		Cu		Co		Cd		Références
	mg/kg						µg/kg						
n													
132	355	42,6	65,2 ± 22,4	40,7 ± 11,3	360	36	Coppenet, 1974						
	140	18		32		160	Meeus-Verdinne <i>et al.</i> , 1983						
5	1175 ± 92	15,6 ± 9,4	42,5 ± 27,2	28,8 ± 17	Bernal <i>et al.</i> , 1992								
43			57,0 ± 19,7	40,8 ± 14,8	Martinez <i>et al.</i> , 1995								
	350	45	60	40	350	40	Le Roux, 1996						
49			57,4 ± 18,8	40,9 ± 14,2	Martinez, 1997								
10	265 ± 61	47 ± 8	65 ± 14	44,4 ± 11,6	320 ± 40	29 ± 6	L'Herroux, 1997						
			53,2	36,7	Martinez et Peu, 1999								

Les niveaux de concentration en cuivre et zinc dans les lisiers étant très dépendants de l'âge des porcs et du niveau de supplémentation dans l'aliment (Nicholson *et al.*, 1999). De ce fait, l'étude menée par Levasseur et Texier (2001) a pris en considération les stades physiologiques des animaux pour tenir compte des disparités inter-stade. (Tableau X-5B).

B	Fe		Mn		Zn		Cu		Cd		Cr		Ni		Pb		As		Références
	mg/kg (Matière sèche)																		
Stade physiologique																			
	2620 ± 613	576 ± 195	1120 ± 213	838 ± 243															Aumaitre, 1981*
	5000	600	919	574	0,5	11	20	10	1,7	Meeus-Verdinne <i>et al.</i> , 1986*									
				351	0,3	2,8	10,4	2,5	1,7	Nicholson <i>et al.</i> , 1999									
Porcelet	2106	624	1886	742	0,3	5	ND	4,15	1	Levasseur et Texier, 2001									
Porc à l'engrais	1733	583	1301	837	0,32	2,2	8,6	ND	0,4	Levasseur et Texier, 2001									
Truie allaitante	1219	419	1185	98	ND	14,1	ND	ND	0,39	Levasseur et Texier, 2001									
Truie gestante	1572	537	1414	180	0,77	13,3	ND	1,5	1,14	Levasseur et Texier, 2001									
			650	470	0,4	7	14	8	2	Nicholson <i>et al.</i> , 2003									
	mg/kg																		
	3000	1000	15*	1000	200	800	Arrêté du 8 janvier 1998												
	300	75	1,5	140	50	140	CERAFEL												
	300	100	1	100	50	100	10	Label Ecologique Communautaire											
	150	35	0,7	100	70	60	Proposition de valeurs seuils (Baize, 2000)												

Tableau X-5: Teneurs en éléments métalliques répertoriées dans la littérature (valeurs exprimées respectivement en poids frais **A** et en poids secs **B**). Concentrations présentes dans les lisiers de porcs en fonction du stade physiologique et présentation des seuils réglementaires imposés, par les mesures préventives, pour limiter l'épandage des métaux lourds sur les sols cultivés (**B**).

De telles pratiques conduisent à la production de lisiers riches en cuivre et en zinc dont l'épandage pose des problèmes d'ordre environnemental. En effet, peu lessivables, le cuivre et le zinc s'accumulent dans les sols (principalement dans l'horizon superficiel) et des

phénomènes de phytotoxicité (en particulier pour le cuivre) pourraient apparaître à moyen terme dans certaines régions d'élevage intensif (Coppenet *et al.*, 1993 ; L'Herroux, 1997).

L'augmentation significative des teneurs métalliques en surface des sols reste la principale conclusion des études menées sur le devenir des métaux provenant de lisiers de porcs (Batey *et al.*, 1972 ; Meeus-Verdinne *et al.*, 1986 ; Christie et Beattie, 1989 ; Coppenet *et al.*, 1993 ; L'Herroux *et al.*, 1997 ; Bolan *et al.*, 2003 ; Nicholson *et al.*, 2003). Elle pose la question de leur devenir et de leur impact sur les écosystèmes récepteurs. Ces métaux sont, en effet, susceptibles de quitter la parcelle lors de fortes précipitations et de s'accumuler dans les écosystèmes aquatiques récepteurs. Même si la quasi-majorité des métaux provenant des effluents agricoles s'accumule dans la couche supérieure du sol, des études montrent qu'une partie peut tout de même passer en solution (Japenga *et al.*, 1992), les lessivages entraînant une partie des métaux en profondeur (Meeus-Verdinne *et al.*, 1986).

3- Description du dispositif expérimental SOLEPUR

3-1 Infrastructure

Le dispositif expérimental est implanté dans le nord-ouest de la commune de Plouvorn (Finistère-Nord), près de la ferme des Kéroignant. Le pilote (Figure X-5) se compose de:

- Parcelle aménagée appelée par la suite « **Parcelle Traitée** » et notée **TR** de 3280 m² (80m*40m), sur laquelle ont eu lieu les épandages intensifs de lisiers de porcs de 1991 à 1995,
- **Parcelle Témoin** de 100 m² notée **TE** bâchée et drainée intégralement, qui ne reçoit aucun épandage de lisier,
- Local technique qui contient tout le matériel technique,
- Fosse de stockage du lisier d'une capacité de 160 m³,
- Bassin de stockage de 450 m³, destiné à recueillir les eaux de percolation des parcelles durant les saisons de drainage,
- Bassin réacteur de 350 m³ conçu pour la dénitrification des eaux de drainage après apport de lisiers (source de carbone organique),
- Parcelle épuratrice finale de 800 m², naturelle et irriguée avec l'effluent dénitrifié.

Les parcelles témoin et traitée sont cultivées avec du ray-grass anglais (*Lolium perenne*). Le couvert végétal a été renouvelé à la fin de chaque saison d'épandage.

3-2 Mise en place et fonctionnement du pilote

Les parcelles traitée et témoin ont été spécialement aménagées en drainage intégral. Elles sont hydrologiquement isolées, un film polyane étanche (15/100) recouvrant les bords et le fond des parcelles. Les drains en PVC, situés à 80 cm de profondeur, sont recouverts de graviers et d'une géomembrane anticollmatage. Le réseau de drainage de la parcelle TR se compose de 6 drains de 74 m (diamètre 100 mm) distants de 6 m, celui de parcelle TE de 2 drains de 10 m

distants de 5 m. L'eau de drainage de la parcelle TR s'écoule par gravité le long du réseau de drainage, elle est collectée en sortie de drains par un préleveur automatique (*ISCO 2100*) installé dans le local technique qui collecte un échantillon de 250 ml toutes les 6 heures soit un flacon de 1 litre par jour, échantillon stocké à température ambiante. Un débitmètre (*ISCO 3210*) mesure en continu le débit (sonde ultrasons) et le volume cumulé d'eau drainée. Le pH, le potentiel Eh ainsi que la conductivité sont mesurés en continu.

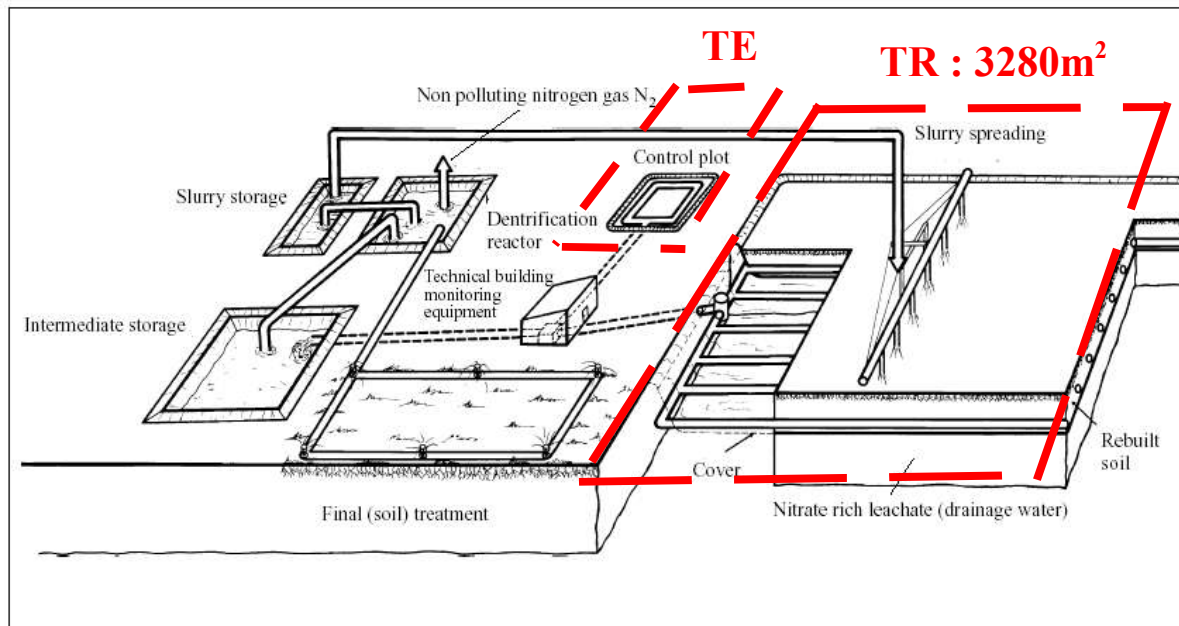


Figure X-5: Schéma du dispositif Solepur (TR: Parcelle Traitée et TE: Parcelle Témoin).

3-3 Caractéristiques physico-chimiques du sol

Le substrat de la parcelle traitée est constitué par les micashistes de la Penzé. Il s'agit d'un sol brun facilement lessivé à texture limon moyen sableux. Les principales caractéristiques du sol de départ (en 1991) sont présentées dans le tableau (II-6), les données résultent de travaux antérieurs réalisés par Martinez et Guiziou (1995) et L'Herroux (1997).

Caractéristiques physico-chimiques du sol de départ	Horizons		
	0-20 cm	20-40 cm	40-60 cm
pH	5,9	5,2	5,1
Argiles (%)	14,1	13,2	17,5
Limons (%)	63,4	59,4	50,7
Sables (%)	22,5	27,4	31,8
N-Total (‰)	1,76	1,39	0,71
C-Total (‰)	18,2	13,8	7,1
C/N	10,4	10,1	10
Phosphore-Dyer (mg/kg)	361	221	216
Potassium-échangeable (mg/kg)	416	286	216
Cu (mg/kg)	21 ± 2	26 ± 3	34 ± 4
Cuivre-échangeable-EDTA (mg/kg)	2,8	2,2	1,3
Zn (mg/kg)	66 ± 7	89 ± 8	96 ± 8
Zinc-échangeable-EDTA (mg/kg)	2,7	2,3	0,8
Fe (mg/kg)	27300 ± 2100	29500 ± 2100	36700 ± 2500
Mn (mg/kg)	710 ± 70	810 ± 70	830 ± 80
Co (mg/kg)	12 ± 3	18 ± 4	27 ± 6
Cd (mg/kg)	0,24 ± 0,08	0,29 ± 0,12	0,12 ± 0,06

Tableau X-6: Caractéristiques physico-chimiques du sol de départ (en 1991) de la parcelle traitée.

Au départ de l'étude, le sol était exempt de toute contamination métallique, les teneurs métalliques présentées dans le tableau X-7 sont en accord avec les valeurs médianes des sols français (Baize, 1994 et 2000a) et proches de celles du « bruit de fond » déterminé par Ure et Berrow (1982) (Tableau X-7).

Références	Cu	Zn	Fe	Mn	Co	Cd
	mg/kg					
Baize, 1994						
n	100	101		89	91	88
1 ^{er} décile	7,7	47		11,6	7,1	0,03
Médiane	13,3	88		924	16,5	0,17
9 ^{ième} décile	36,6	419		6950	50	0,69
Baize, 2000						
n	787	804	767	735	695	768
1 ^{er} décile	5	31	12700	149	3,1	0,03
Médiane	12,8	80	32400	754	14	0,16
9 ^{ième} décile	27,2	275	64700	3332	32,4	1,06
Ure et Berrow, 1982						
Moyenne	25,8	59,8	32000	760	12	0,62

Tableau X-7: Teneurs totales en éléments traces dans les sols français (Ure et Berrow, 1982 ; Baize, 1994 et 2000a).

[Les médianes et la fourchette de concentrations comprises entre le 1^{er} et le 9^{ième} décile regroupent 80% des valeurs obtenues].

3-4 Les campagnes d'épandages de lisiers de porcs: apports à la parcelle

Le lisier brut complet, stocké dans la fosse prévue à cet effet, est épandu à l'aide d'une rampe frontale de 38 m entraînée par un enrouleur type *OCMIS* irrigation. Une pompe d'un débit de 60 m³/h amène le lisier de la fosse de stockage jusqu'à l'enrouleur. Les cinq campagnes d'épandage ont eu lieu durant des périodes comprises entre mars-avril et septembre-novembre. Ainsi aménagée la parcelle traitée a subi 30 épandages massifs de lisiers de porcs entre 1991 et 1995 soit un total cumulé de 4931 m³ de lisier/hectare (en moyenne 1000 m³/ha/an) avec un apport moyen de 160 m³ de lisier/ha/épandage. Le volume annuel de lisiers épandu correspond à un apport 20 fois plus élevé que celui autorisé par la législation (Directive 91/676/CEE). Au terme des cinq années d'expérimentation, cette parcelle a reçu l'équivalent d'un siècle d'épandage aux doses agronomiques maximales autorisées. Des analyses régulières de matières sèches (MS), de matières organiques (MO), de carbone total (C-Total), d'azote ammoniacal (N-NH₄) et total (N-Total), de phosphore (P-Total), de potassium (K-Total), de cuivre et de zinc total ont été effectuées entre 1991 et 1995 (Martinez et Peu, 2000). Les résultats sont reportés dans le tableau suivant (Tableau X-8).

Années	Volume épandu m ³ /ha	MS	MO t/ha	C-Total	kg/ha					
					N-NH ₄	N-Total	P-Total	K-Total	Cu	Zn
1991	1436	43,8	28,8	17,1	3258	5004	1480	1643	33,5	60,7
1992	793	49,9	35,2	22,9	2507	3704	1216	1289	29	37,1
1993	963	57,4	38,4	21,9	3353	4929	1579	1722	42,1	51
1994	727	64,9	46,3	26,6	3246	5053	1655	1669	36	49,2
1995	1012	68,3	47,7	26,2	3869	5810	2034	1936	42,8	68
TOTAL	4931	284,3	196,4	114,7	16233	24536	7964	8259	183,4	266

Tableau X-8: Bilan des apports d'éléments sur la parcelle lors des épandages cumulés (1991 à 1995).

Les épandages de lisiers de porcs contiennent des éléments traces ajoutés à l'alimentation notamment le cuivre et le zinc. Compte tenu de la faible valeur de rétention du cuivre et du zinc, la réglementation actuelle (Directive 70/524/CEE) qui autorise un apport alimentaire en métaux largement au dessus des besoins pour les animaux, conduit à la production de lisiers très riches en ces éléments. Ainsi, les apports de cuivre sur la parcelle TR s'établissent à 37 kg Cu/ha/an en moyenne soit un total de plus de 180 kg Cu apportés au sol. Les apports en zinc s'établissent à 53 kg Zn/ha/an soit un total cumulé de 266 kg Zn. L'enrichissement des sols en métaux n'est pas sans conséquence pour l'environnement. L'apport au sol de ces métaux peut engendrer des risques de phytotoxicité (Hartmans, 1978; Coppenet *et al.*, 1993), de toxicité pour la microflore et microfaune du sol ainsi que des problèmes de toxicité pour l'animal (ruminants, ovins) ayant pâture sur des prairies fertilisées avec du lisier de porcs (Poulsen *et al.*, 1998). Cette absorption excessive est davantage attribuée à l'ingestion de particules de sol riches en cuivre qu'à celle des fourrages produits sur ces sols (Hartmans, 1978). Bien que les métaux apportés par les épandages de déjections animales s'accumulent préférentiellement dans la couche supérieure du sol (McGrath, 1980; Meeus-Verdinne *et al.*, 1986; Arzul *et*

Maguer, 1990), une partie peut tout de même être exportée par les eaux de drainage (McGrath, 1980 ; Japenga *et al.*, 1992 ; L'Herroux, 1997).

III – Le bassin versant viticole de Roujan

1 Caractéristiques générales

Il s'agit d'un petit bassin versant viticole méditerranéen (91 ha, 50 m de dénivelé, altitude comprise entre 75 et 125 m) situé sur la commune de Roujan à 60 km à l'Ouest de Montpellier (43°30'N, 3°19'E) (Ribolzi *et al.*, 2000) (Figure X-6). C'est un site représentatif du contexte viticole languedocien qui présente une variété de situations topographiques et géomorphologiques, avec un exutoire bien défini, qui en fait un site privilégié pour les études hydrologiques.

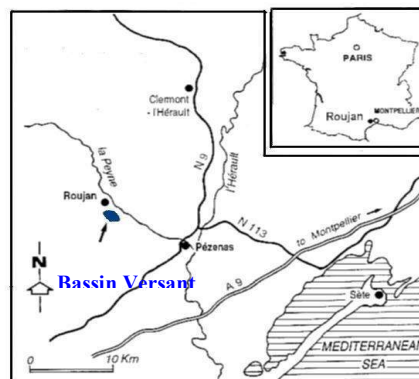


Figure X-6: Localisation du Bassin Versant de Roujan

1-1 Contexte géomorphologique

Ce bassin versant se caractérise par une dissymétrie de répartition des corps sédimentaires avec des dépôts exclusivement continentaux du Pliocène et Villafranchien. Il est constitué de quatre unités géomorphologiques distinctes sur lesquelles se sont développés des sols ayant des caractéristiques propres à leur mise en place et évolution (Andrieux *et al.*, 1993 ; Chaignon, 2001):

[1] - Le plateau constitué de formations pliocènes ou villafranchiennes en plaques, à sols caillouteux de texture fine et de couleur brun-rouge en surface et rougeâtre en profondeur. Ce sont des sols fersialitiques (fertialsols) plus ou moins décarbonatés et acides avec des galets de quartz mêlés à une fraction fine sablo-argileuse, ou calcaire avec une matrice de texture fine argileuse et parfois calcaire.

[2] - Les versants aménagés en terrassettes (pente accentuée) à sols bruns-calcaires (calcosols) qui présentent une texture moyenne avec quelques éléments grossiers et un substratum sablo-gréseux, ou une charge importante d'éléments grossiers ou blocs calcaires mêlés à une matrice argileuse (matériaux molassiques).

[3] - Le glacis colluvial à sols de texture fine, peu caillouteux, faiblement calcaires et enrichis en argile dans l'horizon sous cultural.

[4] - La dépression centrale à les sols calcaires, essentiellement limoneux ou argileux et caillouteux.

1-2 Contexte hydrologique

D'autre part, deux réservoirs hydrogéologiques se distinguent (Andrieux *et al.*, 1993):

[1] - Des nappes temporaires de 3 à 6 m de profondeur s'installent sur le plateau lors des fortes pluies d'automne. En période de crue, la nappe affleure. La vidange s'opère par des écoulements latéraux en bordure de plateau (suintements en tête de talweg principal) ou par des mouillères en milieu de versant.

[2] - Le système glacis-dépression contient une nappe permanente sur une couche porteuse à 6 à 8 m de profondeur. Elle oscille entre la surface et 1 m de profondeur suivant les précipitations, et subit l'influence du déversement de la nappe présente sur le plateau. Le rabattement est assuré par le réseau de fossés.

1-3 Caractéristiques des crues

Le fonctionnement hydrologique du bassin versant peut être expliqué par quatre étapes principales (Voltz *et al.*, 1997):

[1] - Le ruissellement hortonien à la surface des parcelles, phénomène majoritaire sur sols croûtés,

[2] - La collecte du ruissellement de surface par les fossés,

[3] - La recharge de la nappe de plateau par infiltration à travers le sol ou réinfiltration de l'eau circulant dans les fossés,

[4] - La nappe de plateau soutenant le débit jusqu'à sa vidange complète. L'écoulement à l'exutoire du bassin versant hors période de crue (débit de base) correspond alors à la vidange de la nappe de la dépression par les fossés.

Ribolzi (1996) a fait ressortir par traçage naturel - isotopique et chimique - de plusieurs crues que le ruissellement de surface intervient dans l'écoulement rapide de crue et qu'il constitue le processus majeur de la genèse de la crue. Les nappes souterraines interviennent seulement en période humide, avec cependant une contribution inférieure au ruissellement. Les écoulements hypodermiques sont quant à eux non significatifs.

Ces conclusions illustrent l'intérêt du site pour l'étude du transfert des polluants dissous et particulaires par ruissellement et l'étude de leur impact potentiel sur les écosystèmes aquatiques récepteurs. Les risques de contamination des eaux superficielles par les produits phytosanitaires de la vigne dépendent à la fois du risque lié à la matière active et à son mode d'application et du risque à la parcelle. Les risques de contamination des eaux liés à la matière active sur une parcelle sont évalués à partir des propriétés physico-chimiques des molécules.

On y inclue également les caractéristiques liées aux calendriers cultureux (nature des produits et quantités épandues, dates d'application sur la parcelle). Les risques liés à la parcelle dépendent strictement de son aptitude à alimenter les flux de surface de par sa topographie (pente, longueur de pente), son type de sol (croûté, battant, très organique), ses propriétés hydrologiques intrinsèques (infiltrabilité) et les pratiques culturelles (labour modifiant l'état de surface).

Sur ce bassin versant, la vigne occupe plus de 80% de la S.A.U avec une production principale de vin rouge «de table». Toutefois, sur ce bassin versant comme dans toute la région, une amorce significative d'amélioration des cépages et de diversification culturelle se fait ressentir. Certaines parcelles du bassin versant, principalement des terrassettes d'accès difficile sont laissées à l'abandon. Certaines parcelles sont réservées à la culture de l'asperge (2,4% de S.A.U.), d'autres aux céréales généralement du blé (3,4% de la S.A.U) (Andrieux *et al.*, 1993).

2- La viticulture

2-1 Généralités

Au cours du XIX^{ème} siècle, un parasite (*Plasmopora viticola*), responsable du mildiou de la vigne, a envahi presque tout le vignoble français et la plupart des vignobles européens (Lafforgue, 1928). A partir de 1895, l'utilisation du cuivre en viticulture pour lutter contre le mildiou s'est généralisée et des applications de bouillie bordelaise par pulvérisation sur le feuillage ont été systématiquement réalisées dans l'ensemble des régions viticoles de France (Branas, 1984). La bouillie bordelaise est le résultat de la neutralisation d'une solution aqueuse de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) par le lait de chaux ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) (Pouget, 1990). L'activité antifongique et bactéricide des ions cuivriques Cu^{2+} intervient à plusieurs niveaux: le cuivre bloque les processus respiratoires, freine la biosynthèse des protéines et ralentit les transferts d'éléments en diminuant l'activité membranaire (Rousseau, 1995). Cependant le sulfate de cuivre n'est pas la seule forme de ce métal qui soit utilisée pour protéger la vigne. En effet, le cuivre entre dans la composition de nombreux produits phytosanitaires sous différentes formes (oxychlorure, hydroxyde ou oxyde de cuivre, divers fongicides organiques de synthèse...) ou est systématiquement utilisé en association avec d'autres produits phytosanitaires d'origine organique. L'utilisation de fongicides organiques de synthèse comme:

- les dérivés de l'acide dithiocarbamique: Zinèbe (présence de zinc), Manèbe (présence de manganèse), Mancozèbe (présence de zinc et de manganèse), Mancopper (présence de cuivre et de manganèse),
- les acétamides: Cymoxanil toujours utilisé en association avec le cuivre,
- les phtalimides: Captafol, Folpel,
- les produits systémiques: Metaxyl, Phosetyl-Al...,

en association avec le cuivre s'est généralisée depuis une cinquantaine d'années pour améliorer les performances anti-mildiou (actions essentiellement préventives et curatives). Néanmoins, les sels de cuivre restent aujourd'hui les rares fongicides autorisés en agriculture biologique (Rousseau, 1995).

2-2 Pratiques culturales employées sur le bassin versant viticole de Roujan

La gamme de produits phytosanitaires utilisée sur la vigne est importante et couvre l'ensemble des pesticides (acarides, fongicides, herbicides et insecticides). Certains traitements sont systématiques et « standardisés », comme le sulfatage et l'application de la traditionnelle bouillie bordelaise sur la partie aérienne des ceps de vigne (Louchart *et al.*, 1997 ; Brun, 1998 ; Besnard, 1999 ; Chaignon, 2001).

Parmi les pesticides appliqués et hormis le cuivre, connu pour son effet fongicide sur les végétaux, les herbicides et en particulier l'Aminotriazole, le Diuron, la Simazine, le Terbuthylazine et le Glyphosate ainsi que deux fongicides (Cymoxanil et Métaloxyl) présentent un risque majeur de pollution des eaux aussi bien superficielles que souterraines pour le Diuron, la Simazine et l'Aminotriazole et les fongicides (Legrand, 1991 ; Albanis, 1992 ; Garmouna *et al.*, 1997-1998 ; Spliid et Koppen, 1998 ; Power *et al.*, 1999 ; Clark et Goolsby, 2000).

Dans le cadre de cette étude et après enquête auprès du viticulteur (Gilbin, 2002), les principaux herbicides utilisés (Diuron, Simazine, Diquat, Paraquat, Terbuthylazine et Glyphosate) sont appliqués au printemps, principalement en avril. Les principaux fongicides (Cuivre, Folpel, Metalaxyl, Dinocap, Manèbe, Mirante, Mancozèbe et Cymoxanil) sont quant à eux appliqués sur l'ensemble de la période de croissance de la vigne (mars à fin août - début septembre). De plus, l'arsenic semble avoir été utilisé pour la protection de la vigne sous forme de produits phytosanitaires d'origine diverse (arséniate de plomb, composés arsenicaux méthylés présents dans certains herbicides).

IV Le bassin de la Peyne

La spécificité de ce bassin, par rapport à d'autres bassins versants étudiés en France concernent principalement sa forte anthropisation, sa zone climatique méditerranéenne (forte variabilité inter- et intra-annuelle du régime pluviométrique avec des crues prononcées) et son système de culture (couverture végétale discontinue et enracinement très hétérogène de la vigne).

1- Caractéristiques générales

1-1 Caractéristiques climatiques

Les caractéristiques climatiques sont de type méditerranéen sub-humide à saison sèche prolongée, avec une pluviométrie annuelle moyenne de 650 mm (70 à 80 jours de pluie par an, maximum en octobre et en février) et une évapotranspiration annuelle moyenne

(ETP) de 1090 mm. Toutefois la pluviométrie est sujette à une variabilité inter et intra-annuelle caractérisée par des orages diluviens et des crues parfois dévastatrices survenant après des périodes prononcées de sécheresse.

La température moyenne est de 10°C en hiver et de 20°C en été (minima en janvier de 3 à +11°C et maxima en juillet de +18 à 30°C). Les vents dominants sont la tramontane (orientation NW, 33,7% des relevés), le mistral (NE, 16,4%), le grec (SE, 11,6%) et le marin (S, 10,6%).

1-2 Contexte hydrogéologique

Le **bassin versant de la Peyne** (117 km², latitude 43°30'N, longitude 3°19E) peut être divisé en deux ensembles géographiques distincts (Petelet, 1998):

[1] - La Haute vallée (zone amont) présente un relief accidenté (100 à 480 m d'altitude) et un réseau hydrographique dense. Elle est essentiellement occupée par un écosystème naturel (forêt sclérophylle méditerranéenne à chêne vert dominant, présence de châtaigniers, d'arbousiers) et une végétation de type garrigue.

[2] - La Basse vallée ou zone de plaine alluviale (zone aval) présente un relief plus adouci (20 à 100 m d'altitude) de petites collines cultivées principalement en vignes et fortement anthropisées.

1-2-1 La haute vallée de la Peyne

Elle peut être subdivisée en trois entités (Petelet, 1998):

[1] - Le nord du bassin constitué de basaltes quaternaires, de marnes, argiles et conglomérats de l'Eocène ainsi que des schistes Ordoviciens. L'exploitation des gisements de bauxite qui reposait sur des dolomites du Jurassique a donné lieu à la mise à jour de profondes excavations qui captent la totalité des écoulements superficiels.

[2] - La partie médiane, composée de calcaires et de dolomies du Dévonien répartis en deux bandes Est-Ouest séparées par des schistes du Silurien. La bande nord draine la vallée de la Peyne et alimente les captages et les sources de Pezènes les Mines, celle du sud présente des zones de perte où les eaux disparaissent en partie.

[3] - La partie sud constituée d'un massif shisto-gréseux du Silurien et de flyschs du Carbonifère est considérée comme imperméable. Le barrage des Olivettes est construit sur cette partie du bassin versant.

1-2-2 La basse vallée de la Peyne

On peut distinguer quatre formations géologiques principales (Petelet, 1998 ; Figure X-7):

[1] - Le haut de la basse vallée composé d'argiles, de grès et de calcaires (Trias),

[2] - La majeure partie est recouverte par des terrains du Miocène, constitués d'argiles gréseuses, de molasses sableuses ou de marnes avec des bancs calcaires et des conglomérats. Localement on trouve des calcaires lacustres avec des niveaux de quartz (Roujan, Caux, Alignan-du-Vent),

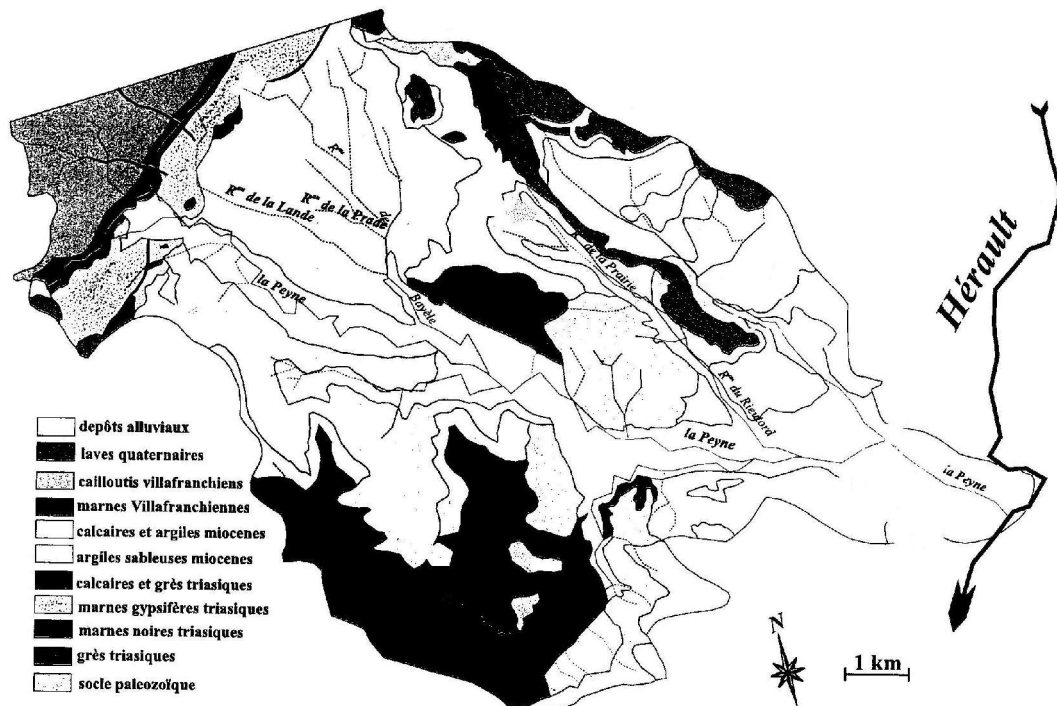
[3] - Des terrains pliocènes composés de brèches et d'argile rouge à graviers et marnes jaunes sont présents localement aux alentours de Caux et d'Alignan-du-Vent,

[4] - Dans les lits des principaux ruisseaux, on trouve des formations alluviales.

2- La rivière: La Peyne

La Peyne s'étend sur 31,7 km de long, elle est alimentée par trois ruisseaux principaux: le ruisseau de la Bayèle, de la Prairie et de St Martial. A l'échelle du bassin versant, la Peyne est un affluent de petite taille, il en résulte une extension latérale réduite du lit de la rivière (100 m) accompagnée d'une réduction de l'épaisseur des alluvions qui devienne plus fine et plus argileuse, paramètres impliquant une capacité réduite des formations aquifères. Hormis quelques puits répartis sur la basse vallée, le bassin versant de la Peyne est considéré comme sans ressource en eau exploitable pour des usages collectifs d'irrigation ou d'eau potable. Le barrage des Olivettes, écrêteur de crues et réserve d'eau pour l'irrigation, constitue une barrière physique entre les deux parties du bassin versant. Sa capacité est de 6,7 millions de m³. Il impose des débits entrant dans la partie aval relativement faibles. À l'étiage, la plus grande partie des débits de la Peyne est apportée par le drainage des formations de la basse vallée principalement constituées par les nappes alluviales, miocènes et pliocènes de la basse vallée.

Figure X-7: Carte géologique simplifiée de la Basse Vallée du Bassin Versant de la Peyne (D'après Petelet, 1998).



ANNEXE 2

I - La voltampérométrie

La polarographie ou voltampérométrie introduite en chimie analytique par Heyrovsky en 1922 (Heyrovsky, 1966) est aujourd'hui une méthode physico-chimique très largement utilisée en spéciation. Elle permet d'accéder aux formes électrochimiquement labiles des métaux complexés ou non et de déterminer leur capacité de complexation et leur constante de stabilité en fonction de leur labilité.

I-1- Principe et Appareillage

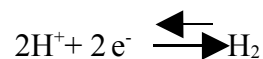
La voltampérométrie est une méthode d'analyse qui s'appuie sur une mesure de courant en fonction du potentiel appliqué, dans des conditions qui permettent la réduction ou l'oxydation de l'espèce à l'électrode de travail choisie (Tiwangye, 1995). Le graphique – intensité de courant en fonction du potentiel appliqué à l'électrode - obtenu expérimentalement, est appelé voltampérogramme ou polarogramme.

L'appareillage permettant d'effectuer ces mesures est constitué d'une cellule comprenant trois électrodes plongées dans la solution à analyser à laquelle on ajoute un électrolyte inerte appelé électrolyte-support.

I-1-1 Les Électrodes

I-1-1-1 Électrode de référence

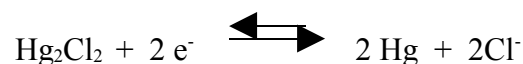
Pour les solutions aqueuses, l'électrode de référence adoptée par convention internationale pour exprimer les potentiels d'électrode relatifs est l'Électrode Normale à Hydrogène (ENH), correspondant au système électrochimique:



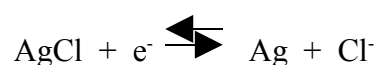
pour une solution à pH=0 saturée d'hydrogène gazeux sous pression de 1 atm.

Dans la pratique, l'ENH étant d'une utilisation difficile, on lui préfère des électrodes de référence «opérationnelles» basées sur d'autres systèmes électrochimiques. Pour les solutions aqueuses, les deux principales sont:

- Hg/Hg₂Cl₂/KCl saturé, électrode de référence au calomel (ECS):



- Ag/AgCl/KCl saturé, électrode de référence au chlorure d'argent (Ag/AgCl):



Les valeurs de potentiel de référence E_{ref} par rapport à l'ENH sont respectivement égales à 0,244V pour l'électrode au calomel (KCl sat.) et à 0,197V pour celle au chlorure d'argent

(KCl sat.) à 25 °C. Il existe entre l'électrode de référence au calomel et l'électrode au chlorure d'argent la relation suivante: $(E_{1/2})_{Ag} = (E_{1/2})_{ESC} + (-0,042)$ le tout exprimé en volt.

I-1-1-2 Électrode de travail

Elle est encore nommée électrode indicatrice, c'est à son contact que va se produire la réaction d'oxydation ou de réduction de l'analyte suite à la variation de potentiel. Plusieurs types d'électrode existent:

- **Électrode à film mince de mercure** TMPE (Thin Mercury Film Electrode), caractérisée par un champ de diffusion linéaire décrivant le flux des espèces électroactives,
- **Électrode à goutte de mercure tombante** DME (Dropping Mercury Electrode), caractérisée par un renouvellement des gouttes de mercure à un rythme contrôlé,
- **Électrode à goutte de mercure pendante** HMDE (Hanging Mercury Drop Electrode), caractérisée par une goutte de mercure stationnaire suspendue à un capillaire de verre, sur laquelle est appliqué tout le balayage de tension, précédé généralement d'un enrichissement,
- **Électrode à goutte de mercure statique** SMDE (Static Mercury Drop Electrode). Elle réunit les propriétés de la DME et de la HMDE. Pendant la mesure, la surface de la goutte reste constante et statique (comme pour la HMDE) mais la phase complète de balayage de tension requiert plusieurs gouttes (renouvellement comme pour la DME).

I-1-1-3 Électrode auxiliaire

Afin de minimiser les effets de la chute ohmique, on introduit cette troisième électrode, généralement en platine, ce qui a pour conséquence de diminuer la déformation des voltampérogrammes et de boucler le circuit d'électrolyse. Il faut, tout de même, veiller à limiter la chute ohmique à une valeur raisonnable d'où la nécessité de rajouter, en complément de la contre électrode, un électrolyte-support à la solution à analyser.

I-1-2 Électrolyte-support

L'analyse polarographique est toujours effectuée en présence d'un électrolyte suffisamment concentré, non électroactif donc « indifférent » vis-à-vis des réactions aux électrodes. Son emploi permet de rendre la solution plus conductrice et de minimiser le courant de migration (Wang, 1985). Les ions de cette substance additionnelle interviennent principalement pour assurer le transport du courant électrique au sein de la solution électrolytique, sans nécessiter un fort champ électrique donc avec une chute ohmique de tension minimale. A l'interface mercure/solution, le courant n'est dû qu'à la réduction ou à l'oxydation de l'ion électroactif. Par contre dans le reste de la solution, le courant est transporté par le mouvement des ions de l'électrolyte-support.

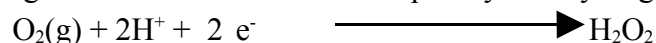
I-1-3 Origine du courant résiduel

Ce courant a deux composantes. On peut attribuer une partie de celui-ci à la présence d'impuretés électroactives, apportées soit par l'électrolyte-support, soit par la surface de l'électrode. Il sera restreint par l'utilisation de produits de qualité ultrapure et par un nettoyage très soigné des électrodes et de la cellule électrolytique. Il convient, également, de chasser au maximum l'oxygène dissous électroactif, autre responsable de cette composante du courant résiduel. La seconde composante est constituée par le courant capacitif qui résulte d'un flux d'électrons qui charge la goutte de mercure par rapport à la solution. Cette composante du courant résiduel non faradique mène à la formation d'une double couche chargée à l'interface électrode/solution.

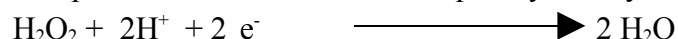
I-1-4 Dégazage des solutions

L'oxygène dissous dans les solutions est réductible et doit être éliminé avant l'enregistrement des polarogrammes. Une solution aqueuse au contact de l'atmosphère présente à l'électrode de mercure deux vagues distinctes liées à la présence d'oxygène dont l'une se distingue par un maximum prononcé.

La première vague résulte de sa réduction en peroxyde d'hydrogène



La seconde correspond à la réduction en eau du peroxyde d'hydrogène formé



La présence et la réduction de l'oxygène peuvent constituer une gêne lors du dosage en couvrant les signaux des substances analysées (cas de l'analyse de traces). De plus, le peroxyde d'hydrogène formé au premier stade de la réduction de l'oxygène peut réagir avec certaines substances présentes dans la solution et créer ainsi des interférences.

I-2 Amélioration des techniques d'analyses voltampérométriques

En voltampérométrie, on impose une programmation de potentiel à l'électrode de travail. Cette perturbation entraîne une réponse caractéristique du courant sur laquelle se base la méthode.

- La programmation la plus classique est le **balayage linéaire en potentiel**, pour lequel le potentiel appliqué à l'électrode varie linéairement. Le courant résultant est enregistré simultanément en fonction du temps et du potentiel. C'est la **polarographie à courant continu** améliorée avec le mode 'tast' (intégration partielle du courant) qui permet de mesurer le courant seulement en fin de goutte (DCT: Direct Current Tast). Le polarogramme qui en résulte se présente sous forme de paliers, ces principaux avantages résident dans un temps d'analyse plus court et une exploitation simplifiée des résultats.

- Il existe une autre programmation de type **impulsion de potentiel**. C'est la **polarographie impulsionnelle** (DP: Differential Pulse). Pour ce qui est de la mesure proprement dite, elle consiste à effectuer soit une lecture de courant (DPN: Differential Pulse Normal) soit successivement deux brèves (DPP: Differential Pulse Polarography), la première juste avant le départ de l'impulsion et la seconde juste avant sa fin. La différence Δi entre ces deux mesures de courant est affichée en fonction de la tension de balayage. La courbe différentielle résultante revêt l'aspect d'un pic dont la hauteur est directement proportionnelle à la concentration de l'analyte.
- La **polarographie impulsionnelle différentielle** est beaucoup plus sensible que la méthode polarographique classique. La plus grande sensibilité de cette méthode est liée au fait qu'elle privilégie considérablement le courant faradique par rapport au courant capacitif. En effet, les mesures étant effectuées à la fin de la vie de la goutte moment où le courant capacitif est le plus faible, cette technique permet d'obtenir des mesures très précises du courant faradique contrairement à la polarographie classique où la partie capacitive du courant est le facteur limitatif de la sensibilité (Osteryoung et Hasebe, 1976 ; Bond, 1980 ; Bond et Jones, 1980). Pour s'affranchir de la trop grande faiblesse du courant faradique par rapport au courant capacitif enregistré, en particulier lorsque la concentration de la substance électroactive à déterminer est trop faible, le courant faradique est rehaussé. On procède ainsi, préalablement à la détermination voltampérométrique, à une accumulation de substance électroactive près de la surface de l'électrode indicatrice. C'est la méthode par **redissolution anodique** (ASV: Anodic Stripping Voltammetry) qui peut être améliorée en superposant à la rampe classique des impulsions d'une valeur de quelques millivolts (**DPASV**: Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry), qui ont pour but d'accroître la sensibilité de la méthode et d'améliorer la limite de détection pour atteindre le domaine de l'analyse de traces (10^{-7} - 10^{-10} mol/l) (Bond, 1980 ; Davison *et al.*, 1987). L'ASV comme la DPASV permettent d'accéder à de très faibles concentrations métalliques et d'évaluer des capacités de complexation et des constantes de stabilité dans des eaux naturelles de composition complexe (présence de divers métaux et de matières organiques hétérogènes) (Shuman et Cromer, 1979 ; Wilson *et al.*, 1980 ; Bond et Jones, 1980 ; Kyle, 1987).

II- Optimisation des paramètres et des conditions opératoires de la DPASV

II-1 Ajout d'un tampon et/ou d'un électrolyte-support

De nombreuses controverses existent au sujet des conditions d'analyses des métaux labiles. Certains chercheurs préfèrent effectuer les analyses au pH de l'échantillon (Town *et al.*, 1995), d'autres les effectuent après addition d'un tampon, généralement, acétate. Tampon, qui d'après Peynot (1989), présente des propriétés complexantes vis-à-vis du cuivre. Il nous semble comme Florence (1982/b) le préconise, que la détermination de la fraction toxique des métaux doit être réalisée en absence de tampon pour éviter d'altérer l'échantillon originel.

Compte tenu de cette remarque, nous avons choisi de ne pas utiliser de tampon mais seulement un électrolyte support.

Le chlorure de potassium (KCl) pouvant modifier les équilibres et par conséquent la forme initiale des espèces (Urasa, 1996), le KNO_3 semble être l'électrolyte-support le plus « neutre » vis-à-vis des substances présentes dans les échantillons qui seront analysés ultérieurement. Il sera directement ajouté en excès (0,1 M) à l'échantillon à tester sous forme de poudre de composition pure de sorte que la migration n'influence pas la valeur du courant limite (Town *et al.*, 1995).

II-2 Le temps de dégazage

L'oxygène est réductible à l'électrode à goutte de mercure et sa réduction peut masquer les autres phénomènes (Urasa, 1996). Une opération de désoxygénation est nécessaire pour éliminer l'oxygène. Elle se réalise en faisant barboter de l'azote pur (gaz inerte) dans la solution à analyser. Différents essais ont été réalisés, la durée du barbotage variant de 5 à 30 minutes. Tout l'oxygène potentiellement réductible à l'électrode de mercure est éliminé par un dégazage sous azote pur de seulement 5 minutes (Shuman et Cromer, 1979 ; Aualiitia et Pickering, 1986 ; Tubbing *et al.*, 1994). Durant la totalité de l'enregistrement, on conserve une atmosphère d'azote au-dessus de la solution.

II-3 La taille de la goutte

Elle doit posséder une faible surface afin d'être facilement polarisable et un faible volume afin d'optimiser la concentration de l'espèce électroactive et de minimiser son épuisement dans la solution. Ces caractéristiques doivent être constantes tout au long de la manipulation et reproductibles d'un dosage à l'autre. Conformément aux travaux de Town *et al.* (1995) une taille de goutte intermédiaire d'une surface de $0,4 \text{ mm}^2$ a été retenue.

II-4 La durée d'équilibrage

C'est le temps nécessaire pour revenir à un régime de diffusion pure. Dans la littérature, les valeurs pour ce paramètre oscillent entre 10 et 60 secondes. On a opté pour une durée de 30 secondes en référence aux travaux de Cheng *et al.* (1994).

II-5 La durée et le potentiel de préélectrolyse

La préélectrolyse est nécessaire à la formation de l'amalgame métal-mercure. La sensibilité de la méthode dépend de sa durée. Elle est, le plus couramment, située entre 2 à 10 minutes. On a choisi de travailler avec une durée de préélectrolyse de 3 minutes (Mansouri *et al.*, 1992). Le potentiel de la préélectrolyse, quant à lui, correspond à une valeur de potentiel à laquelle on peut réduire le ou les cations à analyser. Le choix est fonction de la nature de l'élément à doser et du milieu dans lequel est effectué l'étude (dosage d'un élément unique ou d'un mélange complexe).

Dans le cas de l'étude de la spéciation du cuivre, on restreint le potentiel de déposition à $-0,65\text{V}$ pour éviter la formation d'intermétalliques et la réduction d'autres métaux présents

dans les échantillons. Dans le cas d'une recherche de plusieurs métaux (cas des eaux de drainage et des solutions de sol) on impose un potentiel de préélectrolyse de $-1,65$ V.

II-6 L'agitation de la solution

Elle s'effectue grâce à un axe rotatif qui tourne à vitesse constante et fait tendre à la réhomogénéisation du liquide appauvri en substances. Aucun réglage pour la vitesse de rotation n'est possible avec l'appareillage utilisé. La durée de l'agitation sera fonction de la durée de la préconcentration, les deux étapes étant simultanées.

II-7 Les paramètres électrochimiques

Pour que la substance dosée puisse donner lieu à une mesure qui ne subisse pas d'interférences avec un autre composé présent dans la solution analysée, il est nécessaire que son pic polarographique soit suffisamment distinct des autres pics. Deux paramètres doivent être définis de façon à obtenir la meilleure séparation possible des pics polarographiques.

II-7-1 La vitesse de balayage

D'après Town *et al.* (1995) la vitesse de balayage doit être inférieure à 5 mV/s pour des analyses en DPASV, et comprise entre 5 et 20 mV/s pour l'ASV. La vitesse de balayage choisie (2 mV/s) est la plus précise pour l'appareil utilisé et est conforme aux différents travaux de Florence (1982/b et 1989).

II-7-2 L'amplitude des impulsions

L'amplitude des impulsions doit permettre d'obtenir à la fois une bonne sensibilité et une sélectivité satisfaisante (Town *et al.*, 1995). Le choix d'une amplitude d'impulsions de 50 mV constitue un bon compromis pour obtenir à la fois une bonne sensibilité et une sélectivité satisfaisante à l'analyse d'échantillons d'eaux naturelles.

Le tableau **II-1** présenté dans le chapitre Méthodologies compile les valeurs retenues, pour les différents paramètres d'analyse précédemment détaillés, pour des conditions opératoires optimisées en DPASV en mode HMDE.

ANNEXE 3

Les expérimentations et travaux de terrain ont été soutenus par plusieurs programmes scientifiques nationaux :

- Programme ACI « Eau et usage en zone méditerranéenne cultivée: diagnostic, prévision et gestion de la contamination des eaux par les pesticides » sous la coordination de M. Voltz (INRA, Montpellier) et en collaboration avec l'UMR Hydrosiences (Maison des Sciences de l'Eau, Montpellier).
- Programme CNRS « Devenir des contaminants dans l'environnement et effets sur les écosystèmes: interactions entre dynamiques physico-chimiques et dynamiques biologiques ». sous la coordination de Ph. Hinsinger (INRA, Montpellier) et en collaboration avec le Cemagref de Rennes.

Programme du Centre Français du Riz « Impact de traitements phytosanitaires sur la qualité des eaux issues des rizières » sous la coordination de H. Fenet et en collaboration avec le Laboratoire de Chimie Analytique (Faculté de Pharmacie, Montpellier), le Centre Français du Riz (Arles) et la Tour du Valat.

Une partie des résultats obtenus ont été soumis pour publication dans des revues scientifiques à comité de lecture:

Devez A., Gomez E., Gilbin R., Persin F., Elbaz-Poulichet F., Andrieux P., Casellas C. Assessment of copper bioavailability by a combined approach associating chemical measurement by DPASV and bioassay on alga *Pseudokirchneriella subcapitata* : Application on vineyard runoff waters. *Soumis*

Certains articles sont en préparation :

Devez A., Gomez E., Fenet H., Casellas C. Impact of pesticides (Azimsulfuron, Oxadiazon, Pretilachlor, Fipronil and Alphacypermethrin) on the quality of water discharged from rice fields (Camargue, France).

Devez A., Gomez E., Fenet H., Jager C., Casellas C. Impact of three herbicides on algal growth : binary mixture toxicity.

Ce travail a fait l'objet de communications orales ou par posters à des congrès scientifiques nationaux et internationaux:

Devez A., Gomez E., Casiot C., Ait-Aïssa S., Porcher J.M., Palluel O., Arrigo A.P., Elbaz-Poulichet F., Casellas C. (2004). Assessment of water toxicity in a mining impacted site in the South of France. Poster. *14th Annual Meeting Setac Europe*. 18-22 avril 2004, Prague, République Tchèque.

Devez A., Gomez E., Fenet H., Jager C., Casellas C. (2004). Evaluating toxicity of binary mixtures : Impact of three herbicides on algal growth. Poster. *14th Annual Meeting Setac Europe*. 18-22 avril 2004, Prague, République Tchèque.

Devez A., Gomez E., Casellas C., Persin F. (2003). Spéciation des métaux cuivre et zinc dans les eaux de drainage issues d'un écosystème cultivé soumis à des épandages de lisiers de porcs et toxicité. Présentation orale et *Gruttee Proceedings* C 19 (4p.). 5ième Congrès

International du Gruttee : Micropolluants et Microorganismes dans l'Environnement : Analyse, devenir, élimination et risques sanitaires. 11 et 12 Septembre 2003, Paris, France.

Elbaz-Poulichet F., Seidel J.L., **Devez A.**, Van Exter S., Casellas C., Voltz M., Andrieux P., Moussa R. (2003). Présentation orale. Variabilité temporelle des éléments traces dans un bassin Méditerranéen (la Peyne, France) - Relations avec le débit, le pH et les pratiques agricoles. Conférence Internationale : Hydrology of the Mediterranean and semi-arid regions. 1-4 avril 2003, Montpellier, France. Proceedings parus dans les livres rouges de l'AISH: 278, 410-416.

Devez A., Gomez E., Gilbin R., Persin F., Casellas C. (2003). Le Cuivre : Spéciation et Biodisponibilité dans les eaux de ruissellement de parcelles viticoles. Impact potentiel sur l'écosystème récepteur. Poster à la Journée Régionale Languedoc-Roussillon de l'AGHTM. La Mise en Œuvre des Nouvelles Normes d'Eau Potable. Montpellier, France.

Devez A., Gomez E., Fenet H., Casellas C. (2003). Impact of pesticides on the quality of water issued from rice fields (Camargue, France).
Poster. 13th Annual Meeting SETAC Europe. 27 avril -1 mai 2003, Hambourg, Allemagne.

Devez A., Gilbin R., Gomez E., Casellas C., Andrieux P., Persin F. (2002). Copper speciation, bioavailability and toxicity in runoff waters from contrasted fields and receiving aquatic ecosystems in a multipollution context. Poster. 12th Annual Meeting SETAC Europe. 12-16 mai 2002, Vienne, Autriche.

Devez A., Gilbin R., Gomez E., Casellas C., Andrieux P., Persin F. (2001). Bioavailability of copper, zinc and arsenic in runoff waters from contrasted fields in a mediterranean vineyard catchment. Poster. 11th Annual Meeting SETAC Europe. 6-10 mai 2001, Madrid, Espagne.

Fenet H., Gomez E., Pillon A., Lacoste C., **Devez A.**, Boussioux A.M., Nicolas J.C., Balaguer P., Casellas C. (2001). Estrogenic activity of alkylphenols in water and sediments of French rivers. Communication orale. SETAC Europe 11th Annual Meeting, 6-10 mai 2001, Madrid, Espagne.

Devez A., Gilbin R., Gomez E., Casellas C., Persin F. (2001). Spéciation et Biodisponibilité du Cuivre présent dans les eaux de ruissellement de parcelles viticoles. Poster. 4^{ième} colloque IHSS : Rôle et Comportement des Matières Organiques dans l'Environnement. 21-22 novembre 2001, Limoges, France.

Gilbin R., Pardos M., Andrieux P, Gomez E., **Devez A.**, Casellas C. (2000). Coupling Speciation and Bioassays for copper bioavailability assessment in runoff waters. Poster. Proc. 8th European Conference on Analytical Chemistry, 8th Workshop on progress in analytical methodologies for trace metal speciation, 5 septembre 2000, Lisboa, Portugal.

Gilbin R., Pardos M., Andrieux P, Gomez E., **Devez A.**, Casellas C. (2000). Bioavailability of copper in runoff water of a wine-growing Mediterranean catchment (Southern, France). Présentation orale. Proc. 7th FECS Conference on Chemistry and Environment «Metal Speciation in the Aquatic Environment». 27-30 août 2000, Porto, Portugal. *Environ. Sci. and Pollut Res.*, Special Issue 1, p26.