



**HAL**  
open science

## Elaboration et validation d'un indice d'état biologique des sols

Sylvie Barray, Karine Laval, Marc Legras, Christian Mougin, Salima Taibi,  
Daniel Tessier

► **To cite this version:**

Sylvie Barray, Karine Laval, Marc Legras, Christian Mougin, Salima Taibi, et al.. Elaboration et validation d'un indice d'état biologique des sols. 3ème Séminaire d'Écotoxicologie de l'INRA, Sep 2006, Dinard, France. hal-01600334

**HAL Id: hal-01600334**

**<https://hal.science/hal-01600334>**

Submitted on 6 Jun 2020

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License



# 3<sup>ème</sup> Séminaire d'Écotoxicologie de l'INRA



Dinard, 17-19 septembre 2006

ALIMENTATION  
AGRICULTURE  
ENVIRONNEMENT

INRA







10:30 – 11:00 Pause

**Session 5 : Stress toxiques et stress environnementaux**

*Animateurs : Jean-Pierre Garrec – Daniel Tessier*

11:00 – 11:20 Application des isotopes stables à l'étude des conséquences des perturbations environnementales en milieu aquatique

*T. Caquet, J.-M. Roussel, J. Haury et M. Roucaute*

11:20 – 11:40 Élaboration et validation d'un indice d'état biologique des sols

*S. Barry, K. Laval, M. Legras, C. Mougin, S. Taibi et D. Tessier*

11:40 – 12:00 Caractérisation de l'écotoxicité des sols d'un site de traitement de bois avant leur phytoremédiation

*M. Mench et C. Bes*

**Session 6 : Bioremédiation et bioprocédés**

*Animateurs : Laurence Denaix – Dominique Patureau*

12:00 – 12:20 Phytotoxicité d'un sol contaminé par des produits de traitement du bois après un amendement pour stabiliser des contaminants

*C. Bes et M. Mench*

12:30 – 14:00 Déjeuner

13:50 – 14:10 Traits fonctionnels d'espèces d'intérêt (*Sporobolus tenacissimus*, *Carex praecox*, *Amorpha fruticosa*, *Agrostis capillaris*), pour phytoremédier des sols contaminés sur un site de traitement du bois

*M. Mench, H. Gasté, J. Taberly, M. Aulen et S. Gawronski*

14:10 – 14:30 Mécanismes physico-chimiques d'action de l'immobilisation *in situ* des éléments traces dans les sols

*V. Sappin-Didier et L. Denaix*

14:30 – 14:50 Utilisation de plantes agronomiques pour la phyto-dépollution des sols contaminés par des explosifs

*M. Vila, S. Pascal-Lorber et F. Laurent*

14:50 – 15:10 Devenir des estrogènes et de l'activité estrogénique dans les systèmes de traitement des eaux usées urbaines

*M. Müller, F. Rabenoelina, N. Delgènes, D. Patureau, P. Balaguer et G. Hernandez-Raquet*

15:10 – 15:30 Impact écotoxicologique des composés organiques présents dans les boues d'épuration valorisées par épandage sur les sols agricoles

*A. Ghanem, J. Einhorn, F. Laurent, F. de Alencastro, Y. Levi, C. Jolival, D. Patureau et C. Mougin*

15:30 – 16:00 Synthèse - Discussion

*Animateurs: Laurence Denaix - Jean-Pierre Garrec - Dominique Patureau - Daniel Tessier*

16:00 – 16:30 Conférence de clôture :  
Les questions et attentes de l'ADEME dans le domaine de la recherche en écotoxicologie des sols

*A. Bispo et C. Grand (ADEME)*

16:30 Clôture du séminaire



**INRA**

## Résumés





**INRA**

## Conférences plénières



Dimanche 17 septembre 2006

## 7<sup>ème</sup> PCRD (2007-2013) : enjeux politiques et structuration

N. Trift

INRA, Direction de l'Action Régionale, de l'Enseignement Supérieur et de l'Europe (DARESE), 147 rue de l'Université, 75338 Paris Cedex 07

### Contexte et enjeux politiques

Depuis 1984, les Programmes Cadres de Recherche et Développement (PCRD) sont les principaux instruments financiers et juridiques de l'UE pour mettre en œuvre la politique de recherche de l'Union Européenne et en particulier pour soutenir la construction de l'espace européen de la recherche (EER). L'EER figure désormais parmi les priorités de l'agenda politique européen (stratégie de Lisbonne : « *Faire de l'Europe l'économie de la connaissance la plus dynamique et la plus compétitive du monde* ») et s'inscrit dans le cadre de la stratégie de Barcelone visant à accroître les investissements dans la recherche à 3 % du PNB total de l'UE d'ici 2010 (objectifs de Barcelone, mars 2002).

Pour faire de l'économie de la connaissance une réalité, le 7<sup>ème</sup> PCRD (2007 - 2013) sera articulé avec le programme-cadre « Compétitivité et innovation », le programme « Formation et éducation » ainsi que les Fonds structurels. Il s'inscrit dans la continuité du 6<sup>ème</sup> PCRD, mais se développe aussi dans de nouvelles directions.

### Structuration du 7<sup>ème</sup> PCRD

Le 7<sup>ème</sup> PCRD sera organisé en quatre programmes spécifiques, correspondant à quatre objectifs importants de politique de la recherche européenne:

➤ le programme "Coopération" stimulera la collaboration entre l'industrie et le monde de la recherche publique et universitaire à travers l'Europe en vue d'obtenir la première place dans des secteurs clés technologiques. Sur cette base, des programmes de travail précisant les objectifs techniques, le niveau d'intégration ou l'implication souhaitée des PME seront élaborés. Les instruments à sa disposition seront : les réseaux d'excellence, les projets collaboratifs et les actions de coordination/support.

Dix thèmes de recherche ont été ciblés :

- santé,
- alimentation, agriculture et biotechnologies,
- technologies de l'information et de la communication,
- nano sciences, nanotechnologies, matériels et nouvelles technologies de procédés de production,
- énergie,
- environnement et changements climatiques,
- transport (dont transport aérien),
- sciences socio-économiques,
- sécurité,
- espace.

➤ le programme "Idées" est le programme innovant du 7<sup>ème</sup> PCRD. Il sera mis en œuvre par le Conseil européen de la recherche qui soutiendra la recherche exploratoire d'équipes individuelles sur la seule base de l'excellence scientifique. Il est donc proche de la recherche fondamentale et transdisciplinaire. La recherche est

menée libre de contrainte et de cadre formel. Le programme concerne toutes les disciplines. Deux types de projets seront financés sous forme de bourses : les bourses pour les jeunes chercheurs (moins de 10 ans après la thèse) et celles pour les chercheurs expérimentés.

➤ le programme "Personnel" (anciennement « Marie Curie » dans le 6<sup>ème</sup> PCRD) apportera un soutien significatif à la mobilité et à l'évolution de carrières des chercheurs, à la fois en Europe et dans les pays tiers.

➤ le programme "Capacités" contribuera au développement des capacités dont l'Europe a besoin pour devenir une société de la connaissance prospère et comprendra pour la première fois un soutien aux établissements de recherche à grande échelle au niveau européen. Il comprendra les 6 actions suivantes : soutenir le développement des infrastructures de recherche, financer les projets de recherche des PME, favoriser les coopérations entre régions européennes, renforcer leur potentiel de recherche, mettre en valeur le rôle de la science dans la société, développer la coopération internationale.

Concernant le fonctionnement et la gestion des programmes, la création d'agences exécutives dédiées à chacun des quatre programmes est en projet.

A ces quatre thèmes spécifiques, s'ajoutent :

- le programme spécifique "Euratom" (recherche sur l'énergie de fusion et la fission nucléaire/radioprotection),
- le programme spécifique pour les activités nucléaires du centre commun de recherche,
- le programme spécifique du Centre commun de recherche pour les activités non nucléaires.

### **Simplification des règles de participation**

La simplification des règles et des procédures administratives et financières constitue un facteur décisif de la réussite du programme - cadre. Une série de mesures ont été proposées sur la base du rapport Marimon réalisé à mi-parcours du 6<sup>ème</sup> PCRD :

- rationaliser les instruments de financement par une nouvelle approche fondée sur un éventail d'instruments financiers simplifié,
- employer un langage plus clair,
- réduire la quantité et la taille des documents,
- réduire le nombre de choses demandées aux participants et instaurer une procédure de soumission légère, réduire les contrôles *a priori*,
- accroître l'autonomie des consortiums,
- rationaliser le processus de sélection,
- rechercher de nouveaux modes de financement et simplifier le système de financement calculé en fonction des coûts.

### **Budget**

La Commission européenne avait initialement proposé un budget de 76 milliards d'euros, ce qui marquait sa volonté de placer la recherche au cœur des grandes priorités européennes puisque le 6<sup>ème</sup> PCRD sur 4 ans disposait d'un budget de 20 milliards. Lors du compromis budgétaire fin 2005, le montant consacré à la politique de recherche a été arrêté à 72 milliards d'euros sur un total du budget européen qui s'élève à 862 milliards.

Suite aux discussions entre le Parlement européen et le Conseil, le budget total a été réduit à 50,2 milliards<sup>1</sup> (dont 66 % pour le programme spécifique coopération).

---

<sup>1</sup> Dont 48,43 Mds€ pour les actions indirectes « coopération, personnel, idées et capacités »

La moyenne annuelle du budget accordé au 7<sup>ème</sup> PCRD est d'environ 6,9 milliards d'euros. Cependant, la Commission propose de doter le 7<sup>ème</sup> PCRD en 2007 d'un budget de 4,8 milliards et d'augmenter graduellement les dépenses annuelles pour atteindre 9,6 milliards d'euros de budget en 2013. Il en résulte que les 1<sup>ers</sup> appels à propositions du 7<sup>ème</sup> PCRD disposeraient d'un budget identique voire plus faible que le dernier appel du 6<sup>ème</sup> PCRD (notamment pour la future priorité thématique 2 « Agriculture, alimentation et biotechnologie » qui concerne directement l'INRA).

	Moyenne PC6	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	TOTAL	Moyenne PC7
<b>PC7: Actions indirectes</b>	<b>4.262</b>	<b>4.857</b>	<b>5.281</b>	<b>5.812</b>	<b>6.615</b>	<b>7.640</b>	<b>8.588</b>	<b>9.638</b>	<b>48.432</b>	<b>6.919</b>
<b>COOPERATION</b>	<b>3.479</b>	<b>3.671</b>	<b>3.744</b>	<b>3.885</b>	<b>4.273</b>	<b>4.818</b>	<b>5.495</b>	<b>6.316</b>	<b>32.202</b>	<b>4.600</b>
Santé	670	720	735	751	791	864	987	1.137	<b>5.984</b>	855
Alim, Agric, Biotech.	200	215	219	224	235	297	346	399	<b>1.936</b>	277
TIC	1.012	1.107	1.108	1.136	1.196	1.317	1.506	1.710	<b>9.080</b>	1.297
Nano	381	409	417	427	450	509	583	671	<b>3.467</b>	495
Energie	237	254	259	264	278	339	389	452	<b>2.236</b>	319
Environnement	205	224	229	233	246	281	318	356	<b>1.886</b>	269
Transport	451	478	488	499	526	616	714	831	<b>4.150</b>	593
Sc. Socio-éco	66	72	73	75	79	90	102	117	<b>607</b>	87
Sécu & espace	66	191	216	276	473	506	551	645	<b>2.858</b>	408
<b>IDEES</b>		<b>300</b>	<b>550</b>	<b>810</b>	<b>1.137</b>	<b>1.335</b>	<b>1.624</b>	<b>1.704</b>	<b>7.460</b>	<b>1.066</b>
<b>PERSONNEL</b>	<b>433</b>	<b>454</b>	<b>466</b>	<b>497</b>	<b>531</b>	<b>747</b>	<b>902</b>	<b>980</b>	<b>4.577</b>	<b>654</b>
<b>CAPACITES</b>	<b>350</b>	<b>432</b>	<b>522</b>	<b>620</b>	<b>674</b>	<b>740</b>	<b>567</b>	<b>639</b>	<b>4.193</b>	<b>599</b>
Infrastructures	179	210	296	383	425	374	160	160	2.008	287
Recherche/PME	118	127	130	132	139	206	231	264	1.228	175
Régions/connaissance		11	11	17	18	20	22	28	126	18
Potentiel /recherche		27	27	28	29	63	67	80	320	46
Sciences/société	36	39	40	41	43	47	53	66	329	47
Coopé internationale	17	18	18	19	20	30	35	43	182	26

## Développements récents et prochaines étapes

Le 7<sup>ème</sup> PCRD doit être adopté à la fois par le Conseil (Conseil Compétitivité) et le Parlement (commission parlementaire « Industrie de la recherche et de l'énergie » (ITRE)) selon une procédure de codécision. La Commission européenne, qui initie cette procédure, leur a transmis ses propositions concernant le 7<sup>ème</sup> PCRD, le 6 avril 2005, les programmes spécifiques, le 23 septembre 2005, et les règles de participation, le 30 décembre 2005.

Cependant, les négociations interinstitutionnelles sur le 7<sup>ème</sup> PCRD entre la Commission, le Conseil et le Parlement européens n'ont réellement démarré qu'en avril 2006 car il a fallu attendre l'accord interinstitutionnel sur les perspectives financières 2007-2013 pour connaître le montant global définitif qui serait attribué au 7<sup>ème</sup> PCRD.

Après l'adoption par le Conseil des perspectives financières de l'UE pour la période 2007-2013 (fin avril 2006) et le vote en plénière sur le budget au Parlement (mi-mai 2006), la Commission a présenté en mai 2006 une nouvelle proposition du 7<sup>ème</sup> PCRD en tenant compte du budget réduit.

Ainsi, la «1<sup>ère</sup> navette» entre la Commission, le Conseil et le Parlement, caractéristique de la procédure de codécision sur le 7<sup>ème</sup> PCRD, a pris fin le 28 juin, mais il reste un second «round» de négociation...

Le Conseil doit adopter rapidement sa Position commune et des trilogues interinstitutionnels doivent prendre place durant l'été 2006 afin que le Parlement se prononce en 2<sup>nde</sup> lecture à la rentrée et que le 7<sup>ème</sup> PCRD soit officiellement adopté à la fin de l'année 2006 (la conférence de lancement du 7<sup>ème</sup> PCRD est prévue pour décembre 2006, à la fin de la Présidence finlandaise)

Les premiers appels à propositions du 7<sup>ème</sup> PCRD devraient avoir lieu en décembre 2006.

Lundi 18 septembre 2006

## Publier dans la revue *Agronomy for Sustainable Development*

 E. Lichtfouse<sup>1</sup>, P. Debaeke<sup>2</sup> et F. Papy<sup>3</sup>
<sup>1</sup>INRA, Département Environnement et Agronomie, BP 86510, 21065 Dijon Cedex

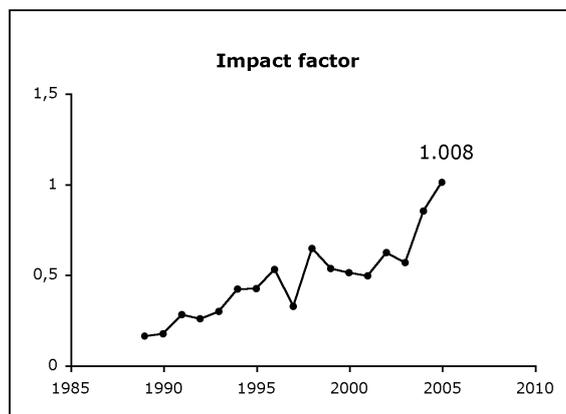
<sup>2</sup>INRA, UMR Agrosystèmes Cultivés et Herbagers, Chemin de Borde-Rouge – Auzeville, BP 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex

<sup>3</sup>INRA, UMR SADAPT Systèmes agraires et développement : activités, produits, territoires, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05

### Présentation de la revue

La revue *Agronomy for Sustainable Development*<sup>2</sup> est une des huit revues de l'INRA sous la tutelle de la Direction de l'Innovation et des Systèmes d'Information (DISI). Elle est adossée aux départements Environnement et Agronomie (EA) et Sciences pour l'Action et le Développement (SAD). Les articles sont évalués par un comité de présélection à la soumission et par 28 éditeurs thématiques pour l'évaluation approfondie. La revue est commercialisée par EDP Sciences. Les thèmes majeurs de la revue sont les suivants, les thèmes concernant l'écotoxicologie étant soulignés.

- *Sustainable agriculture, ecological production. Innovations in farming systems.*
- *Agriculture and preservation of natural resources. Sustainable land use.*
- *Agriculture and global changes. Agroclimatology and modelling.*
- *Biogeochemistry of agrosystems. Pollutants in agrosystems.*
- *Ecological pest control and biopesticides.*
- *Ecological, economical and social impacts of genetic engineering applications.*
- *Environmental impact on soil, water, air and biodiversity.*
- *Risk assessment for food, ecotoxicology. Food quality, food safety, supply chain management, and geographical indication.*
- *Environmental management in agriculture. Decision support systems and companion modelling.*
- *Organic farming. Ecological cropping and farming systems.*
- *Agricultural production of renewable energies.*
- *Genetically modified organisms (GMOs) in cropping systems.*
- *Social and economical issues of agricultural changes.*



Le facteur d'impact 2005, c'est-à-dire de nombre de citation moyen en 2005 des articles publiés en 2003 et 2004, est de 1,008, classant la revue 16<sup>e</sup>/48 dans la

<sup>2</sup> Contact : Josiane Ménassieu, secrétaire éditoriale, agronomy@avignon.inra.fr, www.edpsciences.org/agro.

catégorie *Agronomy* (schéma). En 2005, la revue a publié 63 articles dont 60 articles primaires et 3 articles de synthèse totalisant 524 pages, soit environ 8 pages par article. Le statut actuel des 105 articles soumis en 2005 est : 21 acceptés (20%), 57 rejetés à la soumission (54%), 21 rejetés après évaluation approfondie (20%), 6 en cours d'évaluation. Le délai moyen de publication est de 6,4 mois pour la version en ligne et 7,4 mois pour la version papier. Ce délai se décompose de la manière suivante : 0,3 mois pour la présélection à la soumission ; 4,1 mois pour l'évaluation approfondie des éditeurs thématiques ; et 2 ou 3 mois pour la production par EDP Sciences de la version en ligne et papier, respectivement. Ces délais vont décroître grâce à la mise en ligne immédiate (*on-line first*) des articles sans pagination avec un identifiant numérique (*digital object identifier - DOI*).

### Conseils de rédaction

Le caractère novateur. *Straight to the point.* Le lecteur doit saisir très rapidement le point nouveau de l'article. L'erreur de loin la plus fréquente est l'absence d'explication du caractère novateur des résultats par rapport aux connaissances actuelles, notamment dans le résumé. Sans cette explication, le correcteur n'aura pas de base pour juger le degré d'innovation de l'article. L'aspect novateur doit apparaître dans le titre, si possible. Il doit être décrit de manière très succincte dans le résumé par opposition à ce qui est déjà connu. L'introduction doit "préparer le terrain" de cette innovation en partant d'un cadre assez général sur l'importance du sujet et la justification des travaux, pour aboutir à l'identification d'un manque de connaissance. La section "résultats et discussion" doit être organisée en sous-sections thématiques, chaque sous-section étant centrée autour de la démonstration d'un seul point nouveau en évoquant successivement : la description du résultat avec une illustration, son interprétation, sa signification particulière et générale puis une dernière phrase résumant clairement la "découverte majeure". La conclusion rassemble ces différents points innovants. Enfin, un lecteur ne retenant généralement qu'un seul point nouveau par article, il est vivement conseillé de centrer l'article sur la démonstration de ce point en élaguant les résultats qui ne servent pas directement à conforter ce point. Ceci pour éviter la "dilution de la nouveauté".

La présentation. *Slack presentation equal slack science.* Cet adage anglo-saxon un peu abrupt résume néanmoins bien l'impression que donne un article mal présenté aux éditeurs et correcteurs. Les défauts majeurs de présentation sont les suivants. Trop d'articles ne respectent pas les instructions aux auteurs à la lettre. Ceci donne tout d'abord une impression négative à la soumission. Puis cela provoque des pertes de temps lors des demandes de remise en conformité. De manière paradoxale, la qualité des illustrations diminue, malgré - ou plutôt à cause de - l'apparente facilité à dessiner des graphiques avec un logiciel. On assiste ainsi à une recrudescence de figures incompréhensibles par leur complexité : 8 graphiques par figure, 6 courbes par graphique, graphique en 3 dimensions, graphique inséré dans un autre graphique, etc. Certains articles comportent aussi 8 tableaux, 8 graphiques et seulement 5 pages de texte, car il est plus facile d'élaborer un graphique que de rédiger un paragraphe bien pensé. Le nombre d'illustrations doit être équilibré avec la longueur du texte. L'illustration montrant le point nouveau de l'article doit être préparée avec le plus grand soin. Les légendes des figures sont souvent trop brèves car "une figure doit être comprise sans avoir à lire le texte principal de l'article". Il est donc conseillé d'expliquer au lecteur dans la légende la tendance à observer et sa signification scientifique. Nous assistons également à un usage abusif des abréviations qui rendent difficile la lecture de l'article, diminuant par voie de conséquence l'impact de cet article. Enfin nous recevons encore beaucoup de rapports d'évaluation soulignant la qualité médiocre de la rédaction en anglais, allant

jusqu'au refus d'évaluation par le correcteur qui ne peut juger un article dont certains passages sont incompréhensibles.

La vulgarisation. *Accessible au plus grand nombre.* Trop d'auteurs ne prennent pas le temps d'introduire un minimum de vulgarisation et d'éducation dans leurs articles, diminuant d'autant l'impact de l'article vers un public varié : étudiants, collectivités, professionnels. Le caractère éducatif doit apparaître non seulement dans l'introduction en citant des synthèses bibliographiques pertinentes, mais aussi dans la description de la signification générale des résultats. Il facilitera aussi la lecture de l'article par les correcteurs et les éditeurs.

En guise d'épilogue traduisant bien un des biais des nouvelles technologies, voici un extrait d'un message de soumission d'un article : *Subject: Paper submitted to Agronomie. Kindly find attached file (MS Word) of my paper entitled "Salt-induced injury symptom, changes in nutrient and pigment composition, and yield characteristics of mungbean grown under warm ambient temperature" for publication in Plant Science. I hope the paper meets the laid down criteria of publication.*

Mardi 18 septembre 2006

## Les questions et attentes de l'ADEME dans le domaine de la recherche en écotoxicologie des sols

A. Bispo<sup>1</sup> et C. Grand<sup>2</sup><sup>1</sup>Département Gestion Biologique et Sols, ADEME, 2 square La Fayette, BP 90406, 49004 Angers Cedex 01<sup>2</sup>Département Sites et Sols Pollués, ADEME, 2 square La Fayette, BP 90406, 49004 Angers Cedex 01

### 1. Les domaines et moyens d'intervention de l'Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie (ADEME)

L'ADEME intervient notamment dans les domaines (i) des déchets, (ii) des sites et sols pollués et (iii) de la protection des sols. Ces différents domaines nécessitent de disposer d'éléments scientifiques et techniques sur les impacts environnementaux et notamment écotoxicologiques des différentes solutions de gestion des déchets et des sols. Sur ces sujets, l'ADEME peut intervenir notamment en :

- orientant, animant et cofinçant des programmes de recherche et des thèses,
- élaborant des outils méthodologiques,
- finançant des opérations exemplaires et de démonstration,
- mettant en place des actions d'information et de communication.

L'objectif de l'ADEME n'est pas uniquement de cofinancer des programmes de recherche afin d'acquérir des connaissances nouvelles mais également de développer des méthodes, de réaliser des ouvrages diffusables et d'acquérir un retour d'expériences afin d'accompagner les décisions des organismes publics.

### 2. Exemples de collaborations entre l'ADEME et l'INRA dans le domaine de l'écotoxicologie terrestre

Avant de détailler les questions et les attentes de l'ADEME dans le domaine de l'écotoxicologie terrestre, certaines collaborations entre l'INRA et l'ADEME ont été choisies afin d'illustrer des questions de recherche et des valorisations.

#### 2.1. *Les boues de station d'épuration épandues ont elles un impact sur les champignons mycorrhizogènes ?*

Cette question a donné lieu à 2 thèses cofinancées par l'ADEME et la Région Bourgogne en collaboration avec l'INRA de Dijon. Les travaux de thèse ont montré, d'une part, un impact possible des boues si celles-ci sont employées en dehors du cadre réglementaire (forte dose et/ou contamination excessive) et, d'autre part, l'intérêt d'utiliser les champignons mycorrhizogènes comme indicateurs d'impact. En collaboration avec le CNRS de Nancy, l'INRA de Dijon soutenu par l'ADEME a normalisé deux protocoles utilisant ces organismes à l'échelle nationale (NF XP X31-205-1, -2) et bientôt à l'échelle internationale.

#### 2.2. *Les boues de station d'épuration contiennent-elles des herbicides et si oui, ceux-ci se comportent-ils après épandage des boues de la même manière que lors d'une pulvérisation sur le sol ?*

Cette question a été abordée dans le cadre d'un contrat de recherche en collaboration avec l'INRA de Versailles (programme PNETOX). Le développement des méthodes d'analyse des herbicides a permis de réaliser une campagne de suivi de 4 boues de station d'épuration qui a mis en évidence la présence à des teneurs variables des herbicides recherchés (diuron, glyphosate et AMPA). Le devenir et les

impacts des herbicides dans les boues ont été suivis en mésocosmes : (i) la persistance des herbicides augmente dans les sols s'ils sont apportés dans les boues, par rapport à une pulvérisation directe, (ii) les quantités de composés transférés vers les eaux de lixiviation ou les végétaux sont très faibles et (iii) aucun effet négatif sur les différents organismes testés (micro-organismes du sol, végétaux, insectes, cultures cellulaires) n'a été constaté aux doses épandues en agriculture.

*2.3. Est-il possible, sur un site pollué, de mettre en évidence les transferts de polluants dans les chaînes trophiques terrestres et de mesurer les effets à différents niveaux trophiques ?*

Cette question a donné lieu à un contrat de recherche qui a démarré fin 2005 avec l'Université de Besançon, unité associée INRA, sur une zone de 40 km<sup>2</sup> incluant le site de Metaeurop (Nord-Pas-de-Calais) et ses alentours contaminés par le Pb et le Cd. Il s'agit d'une part d'acquérir des connaissances nouvelles sur les processus impliqués dans la biodisponibilité, les transferts et les effets des contaminants dans les réseaux trophiques terrestres (étude du réseau trophique en place incluant des plantes, les invertébrés du sol, les mammifères et les oiseaux) à l'échelle individuelle et populationnelle. D'autre part, l'objectif est également de renforcer la prise en compte des processus de bioaccumulation et de transfert des contaminants dans les études d'évaluation des risques pour les écosystèmes sur les sites pollués.

*2.4. Est-il possible, pour les sols, de proposer une méthode permettant de démontrer la « non mobilité » et la « non biodisponibilité » des éléments traces ?*

Cette question est issue de la réglementation sur l'épandage des boues de station d'épuration (arrêté du 8 janvier 1998) qui interdit les épandages de boues sur les sols présentant des teneurs élevées en éléments traces, sauf s'il est démontré que ceux-ci ne sont ni mobiles, ni biodisponibles. Un groupe de travail incluant des chercheurs de l'INRA a rédigé un guide technique téléchargeable proposant une démarche et des outils pour répondre à cette question d'une manière simple et opérationnelle.

### **3. Les questions et les attentes de l'ADEME**

En considérant une définition large de l'écotoxicologie (depuis la dispersion des contaminants dans les sols jusqu'aux impacts) les questions et les attentes sont multiples. Elles concernent essentiellement l'absorption et les effets des agents chimiques sur les individus et plus largement les écosystèmes. Il s'agit non seulement d'acquérir les connaissances mais également de les transposer en méthodes et/ou modèles et/ou référentiels destinés à être appliqués ensuite à une plus grande échelle et mieux connaître leurs limites d'utilisation.

#### *3.1. Questions de connaissance*

L'acquisition de connaissances concerne d'une part la biodisponibilité au sens large des contaminants pour les organismes du sol, mais également l'écologie des sols, encore trop méconnue.

##### *3.1.1. Biodisponibilité des contaminants dans les sols*

La biodisponibilité au sens de la norme ISO/DIS 17402 peut être définie comme un processus dynamique en trois étapes :

- Disponibilité du contaminant dans le sol (= disponibilité environnementale), qui intègre notamment la spéciation/partition des contaminants inorganiques/organiques dans les sols, les réactions biotiques/abiotiques de sorption/désorption et/ou de dégradation. Ces recherches doivent permettre de prévoir le comportement des contaminants dans les sols.

- Absorption du contaminant par l'organisme (= biodisponibilité environnementale) qui s'intéresse au passage du contaminant dans l'organisme cible considéré (ex : Quelles sont les voies de contamination ? Sont-elles passives ou actives ? L'organisme influence-t-il l'absorption ?). Ces recherches doivent notamment permettre d'expliquer les variations inter- et intra-spécifiques.
- Accumulation et/ou effet du contaminant dans les organismes cibles (= biodisponibilité toxicologique) qui intègre les modes par lesquels le contaminant est stocké dans l'organisme et/ou agit sur celui-ci (ex : effets biochimiques, physiologiques, comportementaux, inhibition du développement et de la reproduction, létalité).

Dès lors, l'acquisition de connaissances concerne l'ensemble de ces étapes et intègre l'étude des mécanismes et des phénomènes qui ont lieu ainsi que leur modélisation, tant pour comprendre que pour agir à terme afin de limiter les transferts et donc les impacts (ex : les techniques de traitement permettent-elles de réduire l'exposition ?). Si toutes ces questions se posent au niveau individuel (et c'est généralement ce qui est considéré), il va de soi que les conséquences au niveau des populations et des communautés du sol et plus largement des écosystèmes terrestres doivent également être étudiées (ex : dispersion des contaminants dans les chaînes trophiques).

### *3.1.2. Écologie des sols*

Pour être en mesure d'appréhender les conséquences des contaminants sur les écosystèmes du sol, et plus largement terrestres, il convient d'accorder une place plus importante aux recherches en écologie du sol (ex : diversité spécifique et fonctionnelle, relations trophiques dans le sol et dans l'écosystème terrestre) afin de caractériser les équilibres naturels et être en mesure de juger des perturbations liées aux activités humaines (érosion, pratiques agricoles, retombées atmosphériques et activités industrielles). Ces recherches doivent permettre de définir les espèces à protéger et/ou les fonctions-clés de l'écosystème terrestre à protéger.

### *3.2. Attentes en termes de transfert de connaissances et d'opérations de démonstration*

Les transferts de connaissances concernent non seulement l'obtention de méthodes et ou d'outils nécessaires à la gestion des milieux multi-contaminés, mais également la démonstration à l'échelle pilote ou parcelle que ces outils ou méthodes sont utilisables et pertinents.

#### *3.2.1. Définition de méthodes/d'outils et référentiels*

Les connaissances acquises sur les transferts des contaminants et leurs effets individuels et populationnels doivent à terme déboucher sur la proposition de méthodes ou de modèles ou d'outils utilisables en routine, hors du monde de la recherche (ils doivent alors être accompagnés de référentiels pour faciliter l'interprétation des résultats). Ces connaissances nouvelles et le savoir faire des laboratoires doivent également pouvoir être mobilisés dans le cadre d'expertises nationales ou internationales telles que des questions d'actualité ou des projets de normes.

#### *3.2.2. Opération de démonstrations notamment pour les Évaluations des Risques pour les Écosystèmes sur sites pollués*

L'Évaluation des Risques pour les Écosystèmes reste une approche difficile à conduire en raison notamment des imprécisions sur la démarche et la difficulté de l'évaluation des risques. En effet, il reste à transformer les résultats sur les effets observés en termes d'actions opérationnelles pour réduire ces effets à un niveau jugé acceptable (qui reste à définir). Au sein de la démarche d'Évaluation des

Risques pour les Écosystèmes, plusieurs approches existent pour évaluer les expositions et les effets des substances :

- approche par substance à l'aide de modèles de transferts,
- approche à l'aide de bioessais réalisés sur des échantillons prélevés *in situ*,
- approche écologique en utilisant des inventaires floristiques et faunistiques, des bioindicateurs de terrain...

Ces approches et les outils qui y sont liés doivent faire l'objet d'essais et de comparaisons *in situ* afin de mettre en évidence la faisabilité d'une telle démarche. L'application de ces approches sur des cas concrets n'est pas à dissocier complètement des aspects d'acquisition de connaissances car elles posent souvent des questions complémentaires, telles que les stratégies d'échantillonnage, la transposition des résultats obtenus au laboratoire à ceux mesurés sur le terrain...

#### 4. Conclusions

L'écotoxicologie présente un intérêt certain pour l'ADEME qui doit traiter des matrices complexes, potentiellement multi-contaminées (ex : sols issus de sites pollués, sols agricoles contaminés par des boues ou des retombées atmosphériques, déchets organiques) pour lesquelles une démarche purement analytique s'avère complexe, coûteuse voire impossible et parfois inutilisable car il est encore difficile de prévoir la toxicité de mélanges. L'écotoxicologie, par son caractère intégrateur permet de répondre à ce besoin.

Afin de promouvoir l'acquisition de connaissances, le transfert technologique (vers des outils et/ou référentiels) et le retour d'expériences dans la mise en œuvre de nouveaux outils/méthodes, l'ADEME a mis en place plusieurs programmes de recherche et notamment : le programme STARTT qui vise à comprendre les transferts et les effets des contaminants dans les chaînes trophiques à proximité d'un site pollué (voir § 2.3) et le programme national sur les bioindicateurs de qualité des sols qui vise à mieux comprendre l'écologie du sol et à définir des indicateurs biologiques opérationnels pour la gestion des sols.





# Communications scientifiques



## Session 1

### **Biodisponibilité et dynamique des contaminants dans l'environnement et les chaînes alimentaires**



## Influence d'amendements organiques et minéraux sur la rétention du diuron

V. Chaplain, A. Brault, E. Gosset, D. Tessier et C. Mougin

INRA, Unité PESSAC, Physico-chimie et Écotoxicologie des SoLS d'Agrosystèmes Contaminés, RD 10, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex

### Introduction

Les amendements minéraux répétés ou la valorisation agricole des boues de stations d'épuration modifient considérablement les propriétés physicochimiques des sols. Ces modifications peuvent influencer le devenir de polluants organiques tels que les pesticides. Une expérience de longue durée sur les 42 parcelles de l'INRA de Versailles a démontré en absence de végétation l'impact majeur d'amendements minéraux sur le pH du sol et sur leur texture. Il n'existe pas de données relatives à l'adsorption de molécules pesticides sur ces différentes parcelles. A l'inverse, l'étude du devenir d'un mélange de trois molécules herbicides apporté au sol *via* des boues de station d'épuration a montré l'influence du type de traitement des boues sur la persistance des molécules. Le compostage des boues semble en particulier favoriser la dégradation des polluants. Les tests écotoxicologiques ont révélé des effets bénéfiques des boues à dose agronomique et toxiques à plus forte dose. La contribution respective des boues ou des polluants est difficile à déterminer. De façon générale, les phénomènes de rétention de polluants sur les sols ou les boues déterminent pour une large part le devenir et l'impact écotoxicologique potentiel des molécules organiques. Dans cette étude on s'intéresse donc aux conséquences des amendements minéraux ou organiques sur la rétention d'une molécule organique herbicide modèle.

### Matériel et Méthodes

Le diuron a été retenu comme molécule modèle en raison de sa stabilité et de sa neutralité sur une large gamme de pH. L'adsorption se fait préférentiellement sur les matières organiques du fait de son hydrophobicité. Des échantillons de 6 parcelles ont été retenus afin de couvrir une gamme de pH allant de 5,3 à 9,2 correspondant à différents amendements minéraux acides, neutres ou basiques, apportés chaque année depuis 1929. Les parcelles étant exemptes de végétation la matière organique labile a disparu au cours du temps. Les teneurs en carbone organique total sont toutefois variables et connues. Parallèlement trois échantillons de boues de stations d'épurations urbaines ont été collectés correspondant à des traitements finaux différents : le chaulage, le séchage et le compostage. Les paramètres physico-chimiques de ces boues sont caractérisés par des taux de carbone très élevés, respectivement 396 g/kg, 336 g/kg et 231 g/kg pour le séchage, le compostage et le chaulage, et des pH variables, respectivement 6, 7,7 et 12,5.

Enfin trois sols témoins ont été retenus, un sol n'ayant reçu aucun traitement ni végétation depuis 1929, de pH acide et de COT 0,709 %. Un sol prélevé sur la parcelle des Grands Closeaux à Versailles, de texture limono-argileuse de taux de carbone organique total 1,19 % et de pH 8,13. Un sol prélevé à Dijon de texture argilo-limoneuse, de pH 7,9 et de taux de carbone organique 1,36 % pour lequel nous disposons d'un grand nombre de mesure d'adsorption du diuron dans différentes conditions physicochimiques.

Les isothermes d'adsorption sur les sols et les boues sont classiquement mesurées selon la méthode des restes. Les sols sont séchés à l'air et tamisés à 2 mm, 3 g de phase solide sont mis en contact avec 10 mL de solution aqueuse de diuron, de concentrations variables de 5,

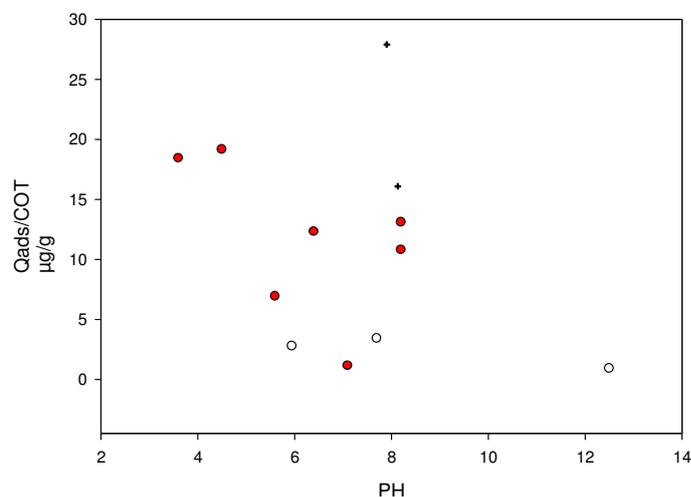
10, 15, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et contenant 20000 dpm/mL. Pour chaque concentration trois répétitions sont réalisées. Après 24 h d'agitation rotative, la phase solide est séparée par centrifugation pendant 20 min à 6000 tr/min. Les surnageants sont ensuite analysés par scintillation liquide selon trois prélèvements de 50  $\mu\text{l}$  dans 15 mL de liquide scintillant. La quantité de diuron fixée par gramme de solide est calculée à partir des mesures de concentrations initiales et à l'équilibre.

## Résultats

Pour les échantillons issus des 42 parcelles, globalement les amendements minéraux augmentent la rétention du diuron par rapport au sol témoin, avec un effet plus prononcé pour les parcelles acides. Les isothermes sont non linéaires et modélisées par l'isotherme de Freundlich. Des corrélations entre le paramètre  $k_f$  et les paramètres clés, pH, CEC des échantillons de sols ont été recherchées sans mettre en évidence de relation directe.

La rétention du diuron sur les trois échantillons de boues montre d'une part la plus forte réactivité liée à la teneur en carbone organique mais aussi l'importance des traitements finaux sur la rétention du diuron. En particulier les quantités de diuron fixées par les boues chaulées sont comparables à celles fixées par le sol témoin malgré les différences importantes de carbone organique. Les boues séchées et compostées ont une très forte réactivité atteignant les 200  $\mu\text{g}/\text{g}$  dans la zone de concentration étudiée.

Afin de tenter de comparer la réactivité de ces différentes matières organiques, nous avons tracé pour une concentration à l'équilibre de diuron égale à 10 ppm les quantités adsorbées rapportées au COT en  $\mu\text{g}/\text{g}$  en fonction du pH des échantillons (Fig. 1). Il ressort de cette comparaison que les réactivités des boues et des matières organiques anciennes des 42 parcelles sont voisines et s'expriment simplement en fonction du pH. L'augmentation du pH augmente la charge des matières organiques, réduit l'hydrophobicité et donc la rétention. La parcelle ayant reçu du  $\text{CaCO}_3$  s'exclut légèrement de cette tendance, probablement du fait de la rétention du diuron sur la calcite. En revanche les deux sols « frais » ont une réactivité très largement supérieure.



**Figure 1.** Réactivité des différents substrats vis-à-vis du diuron (○ : boues de STEP ; + : sols témoins ; ● : 42 parcelles)

## Conclusion

Des travaux antérieurs ont montré la présence de diuron préalablement adsorbé dans les boues mais les teneurs maximales mesurées n'excèdent pas les 50 ppb avant traitement. Ces quantités sont donc négligeables par rapport à celles mesurées au cours de l'adsorption. Il serait intéressant de poursuivre l'étude de l'adsorption du diuron sur des mélanges sols-boues de concentrations variables afin de quantifier l'additivité de réactivités. Il serait également intéressant de tester l'influence d'autres polluants organiques ou de métaux sur la rétention du diuron.

## Intérêts et limites de la DGT (*Diffusive Gradient in Thin films*) comme méthode d'évaluation de la phytodisponibilité des métaux

L. Denaix, J.-Y. Cornu, Y. Soulacroix, A. Schneider et V. Sappin-Didier

INRA, UMR TCEM, Transfert Sol-Plante et Cycle des Éléments Minéraux dans les Écosystèmes Cultivés, 71 avenue E. Bourleaux, BP 81, 33883 Villenave-d'Ornon Cedex

### Introduction

Les plantes cultivées sur des sols contaminés en éléments traces métalliques (ETM) peuvent absorber et accumuler ces éléments dans leurs parties consommées. Selon Decloître [1], les végétaux contribuent de manière majoritaire à l'exposition humaine au Cd et Pb (fumeurs et expositions professionnelles exceptés). Afin d'évaluer le risque pour la santé humaine associé à la contamination des sols en ETM, il est nécessaire de pouvoir prédire la phytodisponibilité des ETM dans les sols, i.e. la fraction d'ETM du sol susceptible d'être absorbée par une plante et d'interagir avec son métabolisme. La phytodisponibilité des ETM est cependant facile à définir mais difficile à mesurer. Beaucoup de méthodes ont été proposées pour évaluer la phytodisponibilité des métaux dans les sols (extractions chimiques, mesures en solution de sol, ...), mais peu sont à la fois simples, robustes et bon marché [2]. Davison & Zhang [3] ont développé une technique nommée gradient de diffusion en gels fins (DGT) pour évaluer la biodisponibilité des ETM dans l'environnement. Cette technique précisément décrite par Zhang *et al.* [4] utilise une résine chélatante séparée de la surface du sol par un gel de diffusion de manière à ce que le prélèvement d'ETM par la DGT soit contrôlé par diffusion. La DGT abaisse localement la concentration d'ETM en solution et fournit une mesure quantitative du flux d'ETM induit. La concentration effective ( $C_E$ ), dont la valeur est calculée sur la base de cette mesure, intègre la participation du pool cinétiquement labile d'ETM de la phase solide. Dans une perspective de prédiction de la phytodisponibilité des ETM dans les sols, plusieurs résultats encourageants ont été rapportés pour Cu [5], Zn [6] et plus récemment pour Cd et Pb [7] : parmi des sols de degrés et origines de contamination contrastés,  $C_E$  était décrit comme le meilleur indicateur de la phytodisponibilité des métaux. Cependant, des mesures similaires de  $C_E$  s'avèrent moins prédictives [8], de sorte que Nolan *et al.* [7] conclurent que les capacités prédictives de la DGT dépendraient de la combinaison des métaux, du degré de contamination des sols et de la plante considérée. La nature du sol et l'origine de contamination pourraient également être des facteurs à considérer. La robustesse de la mesure DGT est donc toute relative. L'utilisation de cet outil dans un contexte d'évaluation des risques liés à la contamination des sols cultivés nécessite de valider ses capacités prédictives au sein de sites agricoles, pour des végétaux consommés. Aussi, cette étude a pour but de tester au sein de plusieurs sites dont la nature de la contamination est diverse, les capacités de la DGT à prédire la phytodisponibilité de Zn, Pb, Cu et Cd pour différents végétaux.

### Matériel et Méthodes

Quatre sites contaminés seront présentés :

- un site contaminé par des épandages de boues de station d'épuration et de compost de déchets ménagers (C)
- un site contaminé par de l'irrigation avec des eaux usées non épurées (P)
- un site contaminé par des retombées atmosphériques issues d'industries de métaux non ferreux (M)

- un site contaminé par des épandages de bouillie bordelaise (B).

Pour chaque site, un ensemble de 6 à 20 sols de surface différents ont été sélectionnés pour l'expérimentation.

Les niveaux de contamination de ces sites sont résumés dans le tableau 1.

**Tableau 1.** Caractéristiques physicochimiques des sols étudiés (minimum-maximum).

Site	Nombre de sols	pH	C (g/kg MS)	Cu (mg/kg MS)	Cd (mg/kg MS)	Pb (mg/kg MS)	Zn (mg/kg MS)
C	20	4,7-6,7	-	-	0,1-2	17-39	15-117
M	9	4,4-7,7	10-16,5	-	0,9-2,9	71-111	103-360
P	9	7,2-8,3	8,1-97,9	-	0,25-5,5	20-560	33-1190
B	6	5,5-8,5	6,1-17,1	100-157	-	-	66-101

Sur le site C, des laitues (*Lactuca sativa* cv Appia), du maïs (*Zea mays* cv INRA 260), des pommes de terre (*Solanum tuberosum* cv BEA) et des carottes (*Daucus carota* cv Touchon) ont été cultivés en plein champ. Un échantillon composite pour chaque parcelle a été collecté et analysé.

Pour les sites P et M, des cultures de laitues (*Lactuca sativa* cv Appia) ont été conduites en chambre climatique dans des pots contenant 2 kg MS de chacun des sols.

Pour le site B, du blé dur (*Triticum durum* cv. Acalou) a été cultivé sous serre dans des pots de 2 kg. L'humidité des sols a été maintenue à environ 80 % de la capacité au champ, par addition quotidienne d'eau déionisée après pesée.

Les parties aériennes et les racines pour les laitues, les feuilles et les grains pour le maïs, les racines de carottes et les tubercules de pomme de terre ont été récoltés, rincés à l'eau déionisée, séchés à 80 °C, pesés et broyés. Les teneurs en métaux ont été déterminées par GF-AAS après minéralisation micro-onde dans HNO<sub>3</sub>.

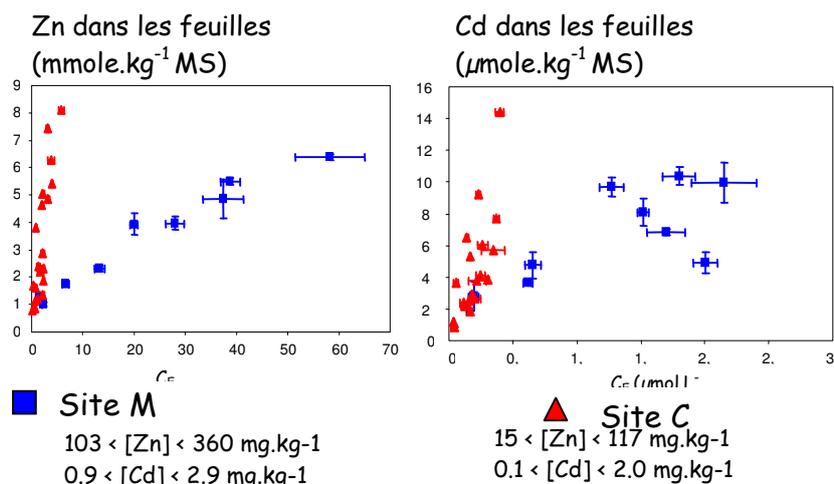
Les dispositifs DGT ont été mis en contact pendant 16 heures à 28 °C sur des sols saturés en eau. Chaque sol a donné lieu à 3 répétitions. La masse de métal M accumulée dans la résine chélatante a été déterminée par SAA après élution dans HNO<sub>3</sub> 1M. Les concentrations effectives en Zn et Cd ont été calculées à partir cette masse M suivant les relations décrites par Harper *et al.* [9]. Le ratio R<sub>diff</sub> a été calculé à l'aide du modèle numérique dynamique DIFS propre au système sol-DGT [9].

## Résultats et Discussion

Pour les sites M et C, la concentration en Zn, et dans une moindre mesure la concentration en Cd, des parties aériennes des laitues augmente significativement avec la concentration effective (C<sub>E</sub>) du sol (Fig. 1). En considérant la concentration effective en Zn, une relation de type linéaire est observée avec les teneurs en Zn des parties aériennes de laitue ( $r^2=0,95$  pour site M et  $r^2=0,71$  pour le site C). Pour le Cd sur ces deux sites, les relations sont plus lâches, surtout lorsque les CE sont élevées. Ceci pourrait s'expliquer par une réaction de la plante à des concentrations élevées bien que des symptômes de phytotoxicité ne soient pas visibles. Des processus physiologiques actifs sembleraient réguler le prélèvement et la translocation de Cd dans la laitue même pour des niveaux modérés de contamination.

Par contre, on constate que les relations diffèrent suivant le site. Cela peut dépendre, soit de la nature du sol, bien que ces deux sols soient sableux, soit du type de contamination (d'origine minérale pour l'un, d'origine organique pour l'autre) soit du mode de culture (culture en conditions contrôlées/culture en plein champ).

Pour le Pb, aucune relation n'a pu être mise en évidence, quel que soit le site considéré.



**Figure 1.** Relation entre la concentration en Zn et Cd dans des feuilles de laitues et la concentration effective mesurée par DGT.

Comme rapporté par Nolan et al. [7] sur le blé et Zhang et al. [6] sur le cresson,  $C_E$  s'avère être le meilleur indicateur de la concentration en Zn et Cd des parties aériennes de laitue, notamment meilleur que la concentration de l'ion libre en solution. Cela confirme que dans certains sols les processus de réapprovisionnement en métaux de la solution sont à considérer pour les mesures de phytodisponibilité. Cela suggère également que dans les sites C et M, le réapprovisionnement en Zn de la solution se fait majoritairement par diffusion et mobilisation de la phase solide.

Sur le site C, d'autres végétaux ont été cultivés. Pour tous les végétaux testés, des relations plus ou moins strictes ont pu être mises en évidence entre la concentration en Cd ou Zn dans les organes considérés et les valeurs de  $C_E$  mesurées. Par contre, elles dépendent de l'espèce et de l'organe considéré.

Pour le site P pour Cd et Zn et pour le site B pour le Cu, aucune relation directe entre ces paramètres n'a pu être mise en évidence. Pour le site B, des symptômes de phytotoxicité sont apparus sur le blé pour certains sols (décolorations et nécroses des extrémités des feuilles). La mesure des surfaces racinaires a également permis de mettre en évidence une diminution de l'élongation racinaire. L'accumulation dans un végétal est le résultat d'une interaction entre une disponibilité de l'élément dans le sol et un prélèvement racinaire. Si la surface racinaire est modifiée, le prélèvement le sera également. Ainsi, pour ces mêmes sols, nous avons calculé un prélèvement potentiel en utilisant la surface racinaire et le flux DGT mesuré. Cette fois, nous obtenons une bonne relation avec le prélèvement effectif mesuré, avec toutefois une surestimation d'un facteur 3.

Pour conclure, cette étude illustre les capacités de la DGT à potentiellement prédire la phytodisponibilité de différents métaux (Cd, Cu, Zn) *via* le paramètre  $C_E$  ou le prélèvement en utilisant le flux mesuré.

#### Références bibliographiques

- [1] Decloître, 1998. *Cah. Nut. Diét.* 33, 167-175.
- [2] McLaughlin et al., 2000. *Commun. Soil. Sci. Plant. Anal.* 31, 1661-1700.
- [3] Davison & Zhang, 1994. *Nature* 367, 546-548.
- [4] Zhang et al., 1998. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 704-710.
- [5] Zhang et al., 2001. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2602-2607.
- [6] Zhang et al., 2004. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3608-3613.
- [7] Nolan et al., 2005. *J. Environ. Qual.* 34, 496-507.
- [8] Koster et al., 2005. *Environ. Pollut.* 133, 103-116.
- [9] Harper et al., 1998. *Geochim. Cosmochim. Acta* 62, 2757-2770.

## Biodisponibilité et dynamique des contaminants métalliques et organiques : des mollusques gastéropodes terrestres aux réseaux trophiques

R. Scheiffler, F. Gimbert, F. Hispard, M. Cœurdassier, P.-M. Badot et A. de Vaufleury

Laboratoire de Biologie Environnementale, EA 3184 UsC INRA, Université de Franche-Comté, Place Leclerc, 25030 Besançon Cedex

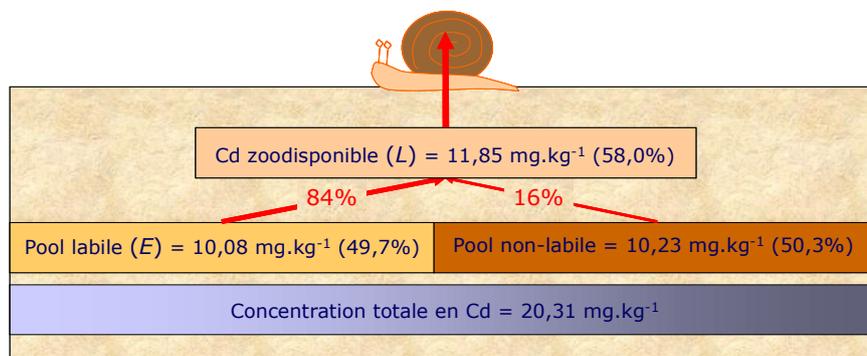
### Introduction

Le Laboratoire de Biologie Environnementale mène depuis 1997 des recherches visant à évaluer la biodisponibilité, le transfert et les effets d'éléments traces métalliques (ETMs : As, Cr, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn) et de contaminants organiques (pesticides, hydrocarbures...) chez des mollusques gastéropodes terrestres, en particulier chez *Helix aspersa aspersa* Müller (Escargot Petit-gris). Les objectifs fondamentaux de ces travaux visent à comprendre les mécanismes impliqués dans les transferts et les effets de ces polluants à différents niveaux d'organisation biologique. Les résultats obtenus ont permis de proposer des outils d'aide à la décision utilisables dans les procédures d'évaluation des risques environnementaux. Ainsi, un biotest basé sur la réduction de croissance d'escargots exposés à des sols ou des déchets pollués a été normalisé au niveau international (ISO 15952). Des microcosmes permettant des expositions *in situ* ont également été mis au point pour des travaux de biosurveillance. L'objectif de ce texte est de présenter quelques-uns des résultats récents les plus significatifs.

### Principaux résultats obtenus

#### *Biodisponibilité et cinétique de transfert sol – plante – escargot des polluants métalliques et organiques*

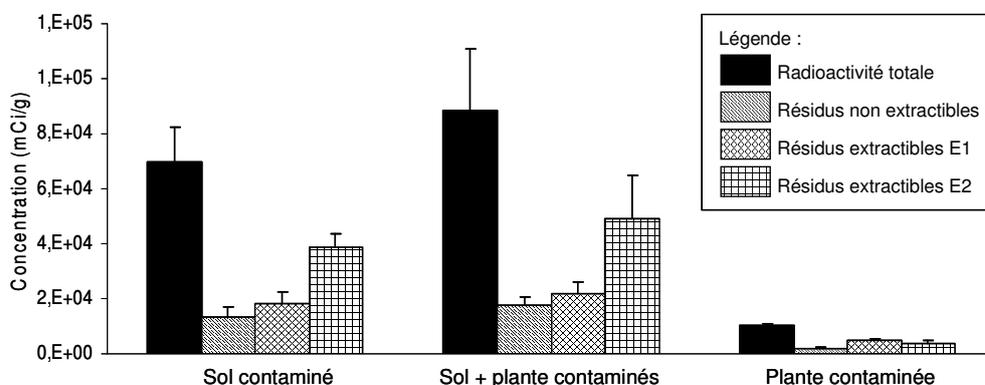
De nombreuses expériences d'exposition d'escargots à des sols contaminés ont permis d'évaluer la biodisponibilité des polluants en mesurant leurs concentrations dans les tissus des animaux exposés durant une période donnée [1,2]. Des expériences plus spécifiques, réalisées en collaboration avec le Laboratoire Sols et Environnement (INRA-ENSAIA Nancy), suggèrent que, contrairement aux hypothèses classiques, le pool non isotopiquement échangeable du Cd dans un sol est partiellement biodisponible pour *H. aspersa aspersa* [3] (Fig. 1).



**Figure 1.** Représentation schématique de la concentration totale en Cd dans un sol et des pools labiles (= isotopiquement échangeables), non labiles et biodisponibles pour *Helix aspersa aspersa*.

La cinétique de transfert des ETMs, caractérisée par les taux d'absorption, pourrait être un indicateur de biodisponibilité complémentaire des concentrations internes [4]. Des travaux récents reposant sur des expositions de long terme (3 mois d'exposition à des sols contaminés et 3 mois consécutifs sur sol sain) et des modélisations mathématiques ont permis d'estimer les taux d'absorption du Cd, du Pb et du Zn sur des sols de natures différentes (sols ISO et sols contaminés par des retombées industrielles prélevés *in situ*) et contaminés à des concentrations croissantes. Pour le Cd, les concentrations à l'équilibre sont obtenues dans les viscères des organismes après 2 semaines d'exposition quels que soient le type de sol et le degré de contamination [5]. Les taux d'absorption varient de 0,060 à 0,544  $\mu\text{g}\cdot\text{j}^{-1}$  et pourront servir d'indicateurs de biodisponibilité en comparaison avec ceux obtenus sur d'autres types de sol et/ou chez d'autres organismes.

Ces travaux ont ensuite été élargis aux transferts sol – plante – escargot grâce à l'utilisation de microcosmes. Une première expérience basée sur ces systèmes simples mais écologiquement représentatifs suggère que la contribution du sol dans le transfert des ETMs vers les escargots est de 2 à 40 % pour le Cd, de plus de 80 % pour le Pb et de 30 à 60 % pour le Zn [6]. Ces données nuancent les hypothèses classiques qui suggéraient que le transfert des ETMs chez les invertébrés terrestres (hors annélides) provenait principalement de la nourriture. Dans le cadre d'une collaboration avec l'*Institute of Soil Ecology* (GSF, Munich), ce type d'étude a été élargi à une substance organique, l'isoproturon (herbicide). En exposant des escargots dans des microcosmes contenant des sols et/ou des plantes contaminés par de l'isoproturon marqué au  $^{14}\text{C}$ , il a été montré que le sol était le vecteur principal de transfert des résidus radioactifs (Fig. 2). La nature de la plupart des résidus a pu être déterminée par radio-HPLC dans les sols et les plantes. Dans les tissus des escargots, les résidus E1 pourraient correspondre à des conjugués de l'isoproturon et les résidus E2 sont des métabolites indéterminés [7]. Ces données sont les premières, à notre connaissance, concernant l'évaluation de la biodisponibilité, du transfert et l'identification des métabolites de pesticides chez des mollusques terrestres.



**Figure 2.** Concentration en résidus radioactifs chez des escargots *H. aspersa aspersa* exposés à des sols et/ou des plantes contaminés par de l'isoproturon marqué au  $^{14}\text{C}$ .

### *Intégration des mollusques gastéropodes terrestres dans un contexte écosystémique*

Les résultats précédents ont permis de caractériser un certain nombre de mécanismes impliqués dans la partie « Biodisponibilité et transfert sol – organismes » de la figure 3. Les travaux actuels ou prévus visent à compléter ces études en abordant, par exemple, l'influence de paramètres biotiques (présence de vers de terre [8]) et de paramètres abiotiques (paramètres physico-chimiques des sols) sur la disponibilité (évaluée par extraction chimique ou technique isotopique) et le transfert des ETMs vers les mollusques. Ces expériences, basées sur des comparaisons de modalités avec ou sans vers de terre, montrent des résultats contradictoires suggérant que l'effet des annélides dépend du type de sol, de la nature du polluant et de l'espèce de vers. D'autres travaux visent à évaluer le rôle

des mollusques en tant que vecteurs de contaminants lors des transferts trophiques dans les écosystèmes (partie « Transfert dans les réseaux trophiques » de la figure 3). Les formes de stockage du Cd dans les tissus (granules, métallothionéines) et leur influence sur le transfert du Cd vers le rat sont étudiées dans le cadre de la thèse de F. Hispard. Ces travaux permettent d'acquérir des informations concernant la biodisponibilité toxicologique des ETMs pour les escargots. Ces informations sont complémentaires de celles obtenues lors des études des effets des ETMs réalisées au LBE [9]. Ces données renseignent également sur la biodisponibilité pour d'éventuels prédateurs, les ETMs sous forme de métallothionéines étant considérés comme plus biodisponibles que les ETMs stockés sous forme de granules dans les tissus [10].

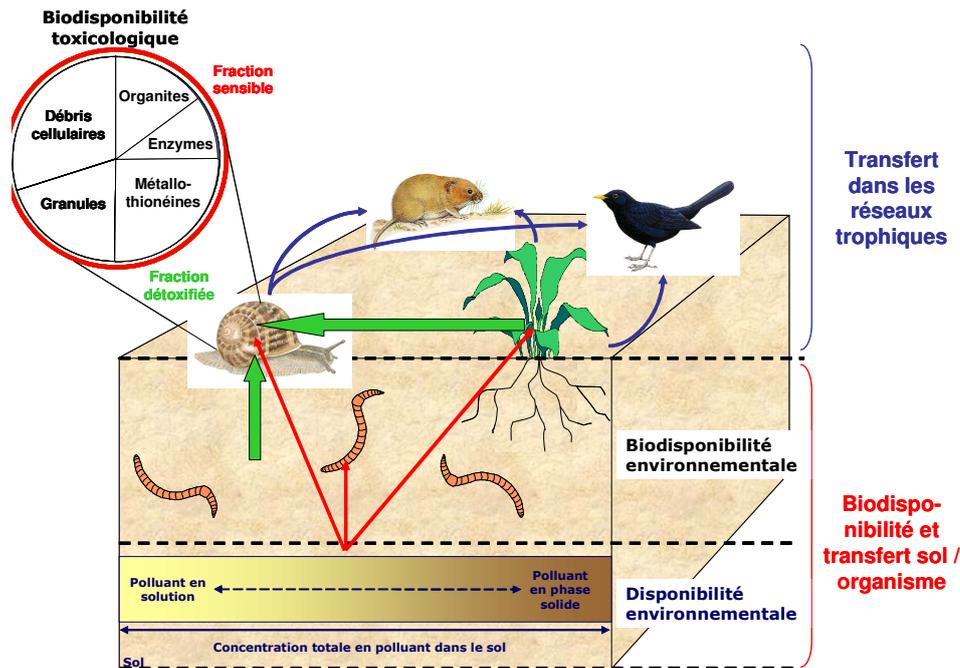


Figure 3. Schéma synthétique des mécanismes étudiés.

En conclusion, les travaux menés depuis une dizaine d'année au LBE ont contribué à la compréhension des mécanismes de transfert des polluants dans des systèmes sol – plante – escargot. Les études en cours s'appuient sur ces résultats pour aborder le rôle des mollusques dans un contexte écosystémique plus large. Cette thématique est actuellement abordée dans le cadre du programme STARTT soutenu par l'ANR et l'ADEME.

#### Références bibliographiques

- [1] Gomot-de Vaufleury & Bispo, 2000. *Environ. Sci. Technol.* 34, 1865-1870.
- [2] Gomot-de Vaufleury & Pihan 2002. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 820-827.
- [3] Scheifler *et al.*, 2003. *Environ. Sci. Technol.* 37, 81-86.
- [4] Van Straalen *et al.*, 2005. *Environ. Pollut.* 136, 409-417.
- [5] Gimbert *et al.*, 2006. *Environ. Int.* Sous presse.
- [6] Scheifler *et al.*, 2006. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 815-822.
- [7] Scheifler, 2002. Thèse de doctorat. pp 196. Université de Franche-Comté, Besançon.
- [8] Coeurdassier *et al.*, 2006. *Appl. Soil Ecol.* Sous presse.
- [9] de Vaufleury *et al.* 2006. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 797-806.
- [10] Wallace & Luoma, 2003. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 257, 125-137.

## Cinétique d'accumulation du cadmium : évaluation *in situ* du transfert sol-plante-escargot

F. Gimbert<sup>1</sup>, A. de Vaufleury<sup>1</sup>, M. Mench<sup>2</sup>, R. Scheifler<sup>1</sup>, M. Coeurdassier<sup>1</sup> et P.-M. Badot<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Biologie Environnementale, EA 3184 UsC INRA, Université de Franche Comté, Place Leclerc, 25030 Besançon Cedex

<sup>2</sup>INRA, UMR BIOGECO, Biodiversité, Gènes et Écosystèmes, 1 avenue des Facultés, 33405 Talence

### Introduction

Selon la définition générale de Spellerberg [1], un indicateur biologique est une espèce reflétant l'état de l'environnement dans lequel elle se développe. Ce concept d'espèce sentinelle est basé sur l'existence d'une relation quantitative ou semi-quantitative entre la concentration en contaminant dans l'environnement et celle détectée dans l'organisme. Si cette relation existe, elle est sous la dépendance de facteurs liés à l'espèce, aux caractéristiques du milieu et de l'élément considéré qui conditionnent sa biodisponibilité, c'est-à-dire de sa fraction réellement transférable dans les organismes [2]. La concentration totale d'un contaminant ne peut être totalement prédictive de sa biodisponibilité. Des études cinétiques ont montré en laboratoire que les taux d'absorption, plutôt que les concentrations internes, étaient de bons estimateurs de la biodisponibilité des métaux pour les isopodes [3] et pour les escargots [4]. Parmi la faune du sol, ces mollusques gastéropodes ont montré leurs capacités de bioindication de la qualité de l'environnement [5]. L'objectif ici est d'étudier *in situ* les cinétiques du transfert sol-plante-escargot du Cd permettant l'évaluation de taux d'absorption à des fins de caractérisation du risque environnemental représenté par les sols contaminés. Il s'agira également d'analyser la sensibilité du modèle biologique retenu à l'influence de facteurs environnementaux comme la concentration d'exposition, le pH du sol et la saison.

### Matériel et Méthodes

**Organismes.** Les escargots sont des Petit-gris (*Helix aspersa aspersa* Müller) juvéniles (1 mois), élevés au laboratoire et pesant  $0,93 \pm 0,11$  g matière fraîche (MF) conformément à la recommandation du test standardisé [6].

**Site expérimental.** L'expérimentation s'est déroulée sur un site expérimental (dispositif AGIR), géré et mis à disposition par l'INRA de Bordeaux-Aquitaine. Le sol (Arenic Udifluent, de texture sablo-argileuse) a été contaminé entre 1988 et 1990 par apport de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  pour atteindre des concentrations théoriques de 0, 20 et 40  $\text{mg Cd.kg}^{-1}$  sol sec. Le pH théorique des sols dans l'horizon de surface des parcelles présente deux modalités, *i.e.* pH 5,5 et 7. La végétation de couverture est de type prairial (*Poa trivialis*, *Trifolium repens*, *Ranunculus repens* et *Holcus lanatus*) avec une fauche annuelle.

**Modalités d'exposition.** Sur chacune des six parcelles, trois microcosmes cylindriques en acier inoxydable (diamètre : 0,25 m, hauteur : 0,50 m, [5]) ont été placés. Dans chaque microcosme, 15 escargots ont été introduits. Après 1, 2, 3, 5 et 8 semaines, deux individus ont été échantillonnés dans chaque microcosme. Deux campagnes d'exposition ont été réalisées : au printemps et en automne 2004.

**Analyses chimiques.** Les sols de chaque parcelle, les échantillons de végétation et les escargots ont été analysés ( $n > 3$ ) par spectrométrie d'absorption atomique (Varian 220Z)

après digestion acide. La justesse des analyses a été vérifiée avec du matériel standard de référence pour chaque type de matrice.

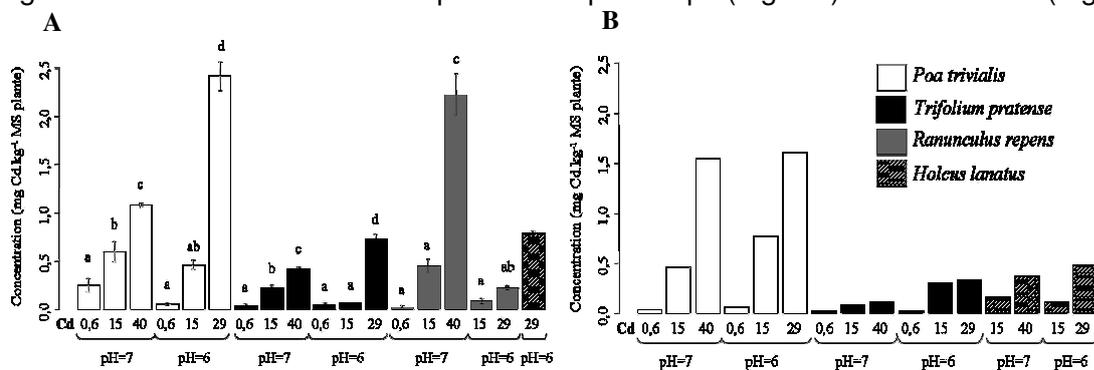
**Modélisation et statistiques.** Les cinétiques d'accumulation du Cd ont été décrites avec le modèle à un compartiment suivant :

$$C_{esc}(t) = C_{esc}(0) + \frac{k_1}{k_2} (1 - e^{-k_2 t})$$

où  $C_{esc}$  est la concentration en Cd dans l'escargot ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ),  $k_1$  est le taux d'absorption ( $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \cdot \text{g}_{\text{esc}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ),  $k_2$  est le taux d'excrétion ( $\text{j}^{-1}$ ) et  $t$  est le temps (j). Les paramètres cinétiques de l'accumulation ( $k_1$  et  $k_2$ ) ainsi que les concentrations internes dans les plantes ont été comparés entre traitements et entre saisons par ANOVA suivie du test de comparaison multiple de Tukey.

## Résultats et discussion

La figure 1 présente les concentrations en Cd dans les parties aériennes des espèces végétales selon les modalités d'exposition au printemps (Fig. 1A) et en automne (Fig. 1B).



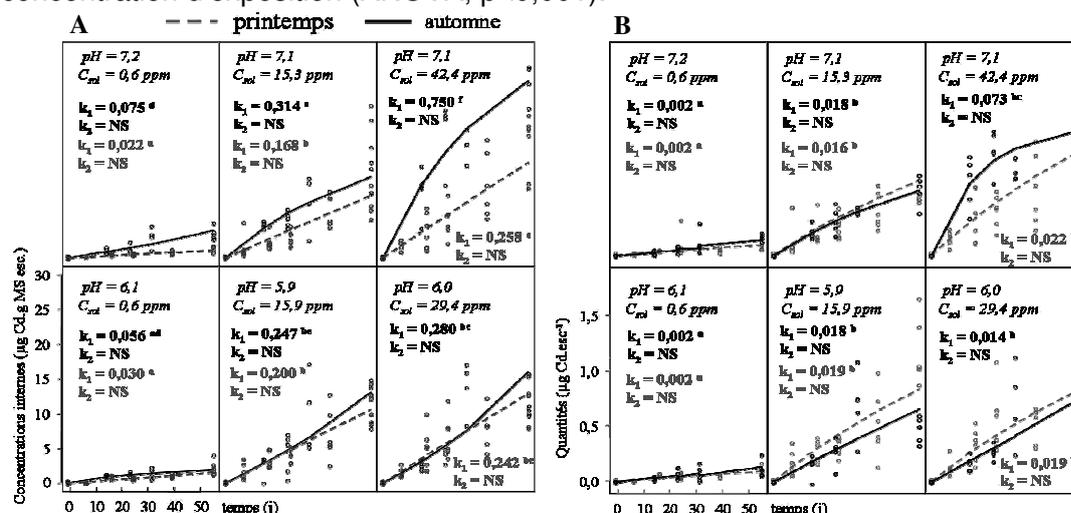
**Figure 1.** Concentrations en Cd dans les espèces végétales prélevées sur les différentes parcelles : A au printemps et B en automne. Pour la même espèce végétale, les valeurs présentant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Les végétaux des parcelles contaminées présentent des concentrations en Cd supérieures à celles des plantes des parcelles témoins (ANOVA,  $p < 0,001$ ), quelle que soit l'espèce considérée. Cette accumulation dans les tissus végétaux aériens reflète la concentration en Cd dans le sol et n'est pas influencée par la saison. L'impact du pH du sol est variable avec, aux fortes concentrations et au printemps, des réponses interspécifiques opposées (Fig. 1A).

Les escargots introduits dans les microcosmes sont contaminés par le sol à la fois directement *via* l'ingestion de particules et la diffusion du Cd par l'épithélium du pied et indirectement *via* la nourriture composée par les espèces végétales peuplant les parcelles. Cette double exposition n'induit pas de mortalité, ni d'inhibition de croissance quelles que soient les conditions environnementales. Pourtant, un transfert non négligeable du Cd du milieu vers les escargots a été quantifié (Fig.2).

L'évolution des concentrations dans les escargots exposés aux différents traitements est présentée dans la figure 2A. Ces cinétiques d'accumulation du Cd reflètent la contamination du milieu. L'accumulation exprimée par le taux d'absorption ( $k_1$ ) est contamination-dépendante quels que soient le pH et la saison (ANOVA,  $p < 0,001$ ). Les concentrations internes dans les escargots (15 à 20  $\text{mg Cd.kg}^{-1}$ ) soulignent la contamination du milieu de façon plus marquée que les parties aériennes des plantes (1 à 2  $\text{mg Cd.kg}^{-1}$ ). Le pH n'a pas, aux valeurs étudiées, d'effet sur l'accumulation du Cd dans les escargots exposés au printemps. En automne, pour la plus forte contamination, le taux d'absorption à pH=7 est supérieur à celui modélisé à pH=6 (0,750 et 0,280  $\mu\text{g}_{\text{Cd}} \cdot \text{g}_{\text{esc}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ , respectivement) (ANOVA,  $p < 0,001$ ). Cependant, les teneurs en Cd dans le sol présentant une différence importante (42,4 contre 29,4  $\text{mg Cd.kg}^{-1}$  sol), l'effet pH ne peut être discriminé. Un effet saison sur le transfert de Cd est mis en évidence, en particulier à pH=7 où les paramètres modélisés

montrent une accumulation plus importante en automne et ce quelle que soit la concentration d'exposition (ANOVA,  $p < 0,001$ ).



**Figure 2.** Cinétiques d'accumulation du Cd dans les tissus mous des escargots exposés sur les différentes parcelles : A en concentrations et B en quantités. Les valeurs présentant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes (ANOVA,  $p < 0,05$ ). NS = non significatif.

La figure 2B présente les données exprimées en quantités, unité plus adaptée aux problématiques de transfert dans les réseaux trophiques. Dans cette configuration, la biodisponibilité du Cd des sols est toujours reflétée par les taux d'absorption ( $k_1$  en  $\mu\text{g Cd}\cdot\text{j}^{-1}$ ) mais de façon moins discriminante entre 15,3 et 42,4  $\text{mg Cd}\cdot\text{kg}^{-1}$  sol. Ce mode d'expression ne met pas non plus en évidence d'effet pH sur le transfert du Cd. Par contre, à la différence de ce qui est observé en considérant les concentrations, l'évolution des quantités accumulées dans les animaux ne montre pas d'influence de la saison. Ce résultat doit être mis en relation avec la croissance des escargots qui, à durée d'exposition équivalente, est moins importante en automne, quels que soient la contamination et le pH du sol (ANOVA,  $p < 0,001$ ). La saison n'influence donc pas le transfert du Cd mais agit indirectement sur les concentrations internes en modifiant la masse des organismes, probablement en liaison avec une photopériode décroissante entre septembre et novembre.

## Conclusion

Cette étude cinétique de bioindication active précise les capacités des escargots, indicateurs biologiques situés à l'interface sol-plante, à mettre en évidence la contamination du milieu. Ces capacités sont généralement exprimées *via* un facteur de bioaccumulation (ratio  $[\text{Cd}]_{\text{esc.}}/[\text{Cd}]_{\text{sol}}$ ) qui apporte une information ponctuelle et ne permet pas d'intégrer l'évolution des concentrations internes en fonction du temps. Les taux d'absorption/élimination ( $k_1$  et  $k_2$ ) qui ont pu être définis répondent à ce besoin et permettent également de distinguer des niveaux de contamination du sol entre 15 et 40  $\text{mg Cd}\cdot\text{kg}^{-1}$  sol. Ce travail montre également que cette bioaccumulation contamination-dépendante est faiblement influencée par la variation d'une unité de pH et indirectement modifiée par la saison. Ces résultats constituent des informations importantes pour une mise en œuvre rationnelle des escargots en biosurveillance de l'environnement.

## Références bibliographiques

- [1] Spellerberg I.F., 1991. Monitoring ecological change. Cambridge University Press, Cambridge, England.
  - [2] Peijnenburg & Jager, 2003. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 63-77.
  - [3] van Straalen *et al.*, 2005. *Environ. Pollut.* 136, 409-417.
  - [4] Gimbert *et al.*, 2006. *Environ. Intern.*, in press.
  - [5] de Vaufléury *et al.*, 2006. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 797-806.
  - [6] ISO 15952, 2006. International Standardisation Organisation. Geneva, Switzerland
- Ce travail a été financièrement soutenu par l'ADEME et le Conseil Régional de Franche-Comté.

## Transfert de la bromadiolone dans les réseaux trophiques : des appâts ... vers les campagnols ... jusqu'aux prédateurs

M. Cœurdassier<sup>1</sup>, M. Sage<sup>1</sup>, R. Defaut<sup>2</sup>, P. Berny<sup>3</sup> et P. Giraudoux<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Biologie Environnementale, EA 3184 UsC INRA, Université de Franche Comté, Place Leclerc, 25030 Besançon Cedex

<sup>2</sup>Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles (FREDEC), 191 rue de Belfort, 25043 Besançon Cedex

<sup>3</sup>INRA, UMR Mycotoxines et Toxicologie Comparée des Xénobiotiques, École Nationale Vétérinaire de Lyon, 1 avenue C. Bourgelat, 69280 Marcy l'Étoile

### Introduction

Les anticoagulants sont largement utilisés pour contrôler les populations de rongeurs à travers le monde [1,2]. La lutte chimique utilisant la bromadiolone a été préconisée afin d'optimiser le contrôle du Campagnol terrestre *Arvicola terrestris* et de limiter l'impact sur les espèces non cibles. Cependant, contrairement aux conclusions d'essais réalisés en conditions contrôlées [3], la consommation de campagnols intoxiqués peut entraîner une mortalité importante de prédateurs en nature [4]. L'estimation de l'exposition secondaire aux anticoagulants doit prendre en compte la quantité de résidus disponibles dans les campagnols [5] qui est liée à la persistance de la molécule dans les appâts utilisés en champs. Les seules données disponibles sur la persistance de la bromadiolone dans les sols ont été obtenues en laboratoire. Concernant l'intoxication des populations de campagnols en nature, une seule étude est disponible, relative aux 10 jours qui suivent un traitement [6]. Les objectifs de ce travail sont (i) d'évaluer la persistance de la bromadiolone dans les appâts « grains de blé » en conditions réelles de traitement et de déterminer les facteurs environnementaux (édaphiques et climatiques) et comportementaux (mise en réserve d'appâts par les campagnols) modulant cette persistance [7] ; (ii) d'évaluer la cinétique d'intoxication d'une population de campagnols dans une parcelle traitée et (iii) de modéliser à partir de ces données, l'évolution temporelle du risque d'empoisonnement secondaire pour le renard.

### Matériels et méthodes

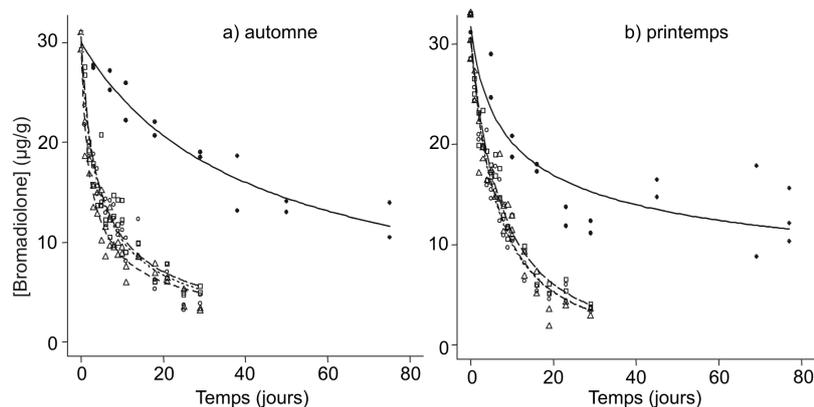
*Persistance dans les appâts* - Le traitement a été réalisé sur des parcelles situées dans la Zone Expérimentale de Lutte Anti-Campagnol (ZELAC - Doubs). Trois sols représentatifs des zones de traitement (brun à pellicule calcaire, brun à pseudogley, brun lessivé) et 2 périodes, automnale et printanière, ont été retenus. L'influence de la modalité de présence des appâts dans les parcelles traitées (i.e. galeries artificielles conformes au traitement ou réserves simulant celles faites par des campagnols) a été étudiée. Des échantillons d'appâts ont été récoltés régulièrement pendant 30 jours suite au traitement dans les galeries artificielles et pendant 80 jours dans les réserves. Les concentrations en bromadiolone dans les appâts ( $\mu\text{g/g}$  MF) ont été mesurées en HPLC.

*Cinétique d'intoxication des populations de campagnols* - Le traitement a été réalisé en automne sur une parcelle de la ZELAC (densité estimée de 150 campagnols/ha). La quantité d'appâts utilisée pour le traitement est de 20 kg/ha. L'échantillonnage des campagnols terrestres, basé sur un piégeage raisonné, a débuté le lendemain du traitement. Il a été effectué tous les jours pendant 10 jours puis espacé progressivement sur une durée totale de 135 jours. Les concentrations en bromadiolone ont été mesurées dans les animaux entiers en HPLC.

**Évaluation du risque pour le renard** – Le simulation élaborée considère un renard adulte de 6 kg consommant, dans la parcelle traitée, 6 campagnols terrestres par jour (tirés au hasard et avec remise au temps post-traitement dans le tableau de données). La quantité de bromadiolone ingérée ( $Q_{ing}$  en  $\mu\text{g}$  par kg de masse corporelle et par jour) est comparée à la plus faible dose létale ( $DL_{mini}$ ) déterminée chez le chien,  $150 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$  [8]. Pour chaque jour, le scénario est répété 1000 fois, le risque correspond à la probabilité que  $Q_{ing} \geq DL_{mini}$ .

## Résultats et discussion

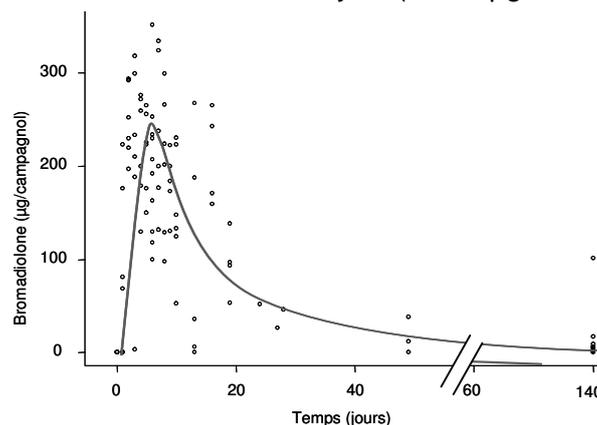
**Persistence dans les appâts** – Dans les galeries artificielles, la demi-vie ( $DT_{50}$ ) de la bromadiolone varie de 3,0 à 6,2 jours, aucune différence significative n'est déterminée quels que soient le type de sol et la saison (Fig. 1).



**Figure 1.** Persistence de la bromadiolone dans les appâts (○..... sol brun à pellicule calcaire ; △----- sol brun à pseudogley ; □--- sol brun lessivé ; ●—— réserves).

La mise en réserve des appâts entraîne une augmentation des  $DT_{50}$ , qui sont de 42,7 et 24,6 jours en automne et au printemps respectivement. Plus que les conditions environnementales, le comportement des campagnols multiplie la persistance de la bromadiolone dans les appâts par un facteur de 5 à 10.

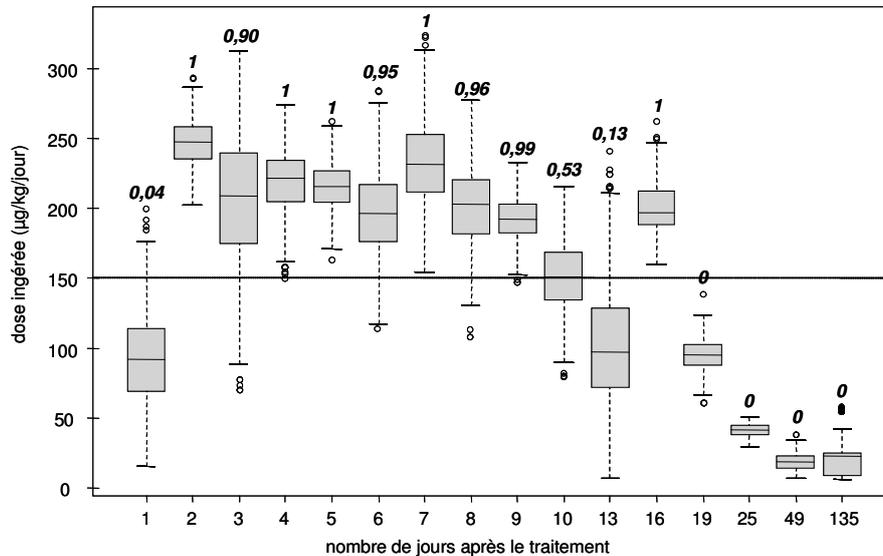
**Cinétique d'intoxication des populations de campagnols** - Les quantités de bromadiolone par individu sont maximales entre le 6<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour ( $194,4 \mu\text{g}$  en moyenne ; Fig. 2).



**Figure 2 :** Variation temporelle de la quantité de bromadiolone (en  $\mu\text{g}$ ) par campagnol terrestre suite à un traitement en nature.

**Évaluation du risque pour le renard** – Les simulations suggèrent que les doses de bromadiolone ingérées par un renard peuvent dépasser  $100 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$  dès le premier jour qui suit le traitement. Entre le 2<sup>ème</sup> et le 16 jour les doses médianes ingérées varient entre 250 et  $100 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$  et le risque calculé sur cette période dépasse 0,90 sauf aux jours 10 et 13 (Fig. 3). Ensuite, les quantités journalières de bromadiolone ingérée diminuent progressivement et conduisent toutes au calcul d'un risque nul (Fig. 3), et 135 jours après un traitement, un

renard reste susceptible d'être exposé à une dose de bromadiolone pouvant atteindre 50 µg/kg/j dans les cas extrêmes.



**Figure 3.** Dose de bromadiolone ingérée par un renard (médiane et quartiles) qui consomme quotidiennement 6 campagnols dans une parcelle traitée. Pour chaque jour, le scénario est répété 1000 fois et la probabilité de dépasser la DL<sub>mini</sub> est reportée en italique.

## Conclusion

Ces résultats apportent des éléments essentiels à la compréhension du transfert de la bromadiolone dans les réseaux trophiques et sur son impact sur des vertébrés non-cibles. La persistance de la molécule dans une parcelle traitée peut être considérablement allongée par la mise en réserve d'appâts par les campagnols. Les résidus dans les campagnols atteignent rapidement des valeurs maximales, le scénario élaboré pour évaluer le risque léthal pour le renard suggère un risque maximum dans les 15 jours qui suivent le traitement. Des travaux actuellement en cours visent à évaluer l'exposition réelle des prédateurs en nature. Ces connaissances serviront à améliorer la qualité environnementale des méthodes de contrôle des populations de campagnols.

## Références bibliographiques

- [1] Eason *et al.*, 2002. *Ecotoxicology* 11, 35-48.
- [2] Shore *et al.*, 1996. *Environ. Pollut.* 91, 279-282.
- [3] Grolleau, 1983. *La Défense des Végétaux* 219, 14-22.
- [4] Berny *et al.*, 1997. *Chemosphere* 35, 1817-1829.
- [5] EPA, 2002. <http://www.epa.gov/pesticides/registration/status.htm>.
- [6] Giraudoux *et al.*, 2006. *Environ. Res.* in press.
- [7] Sage *et al.*, 2006. *Environ. Pollut.* in press.
- [8] Kolf-Clauw *et al.*, 1995. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 171: 127-134

Ces travaux bénéficient du soutien financier de l'INRA, du Conseil Régional de Franche-Comté et des Conseils Généraux du Doubs et du Jura.

## Photodégradation de chlorophénylurées induite par les nitrates et les nitrites et impact écotoxicologique en milieu aquatique

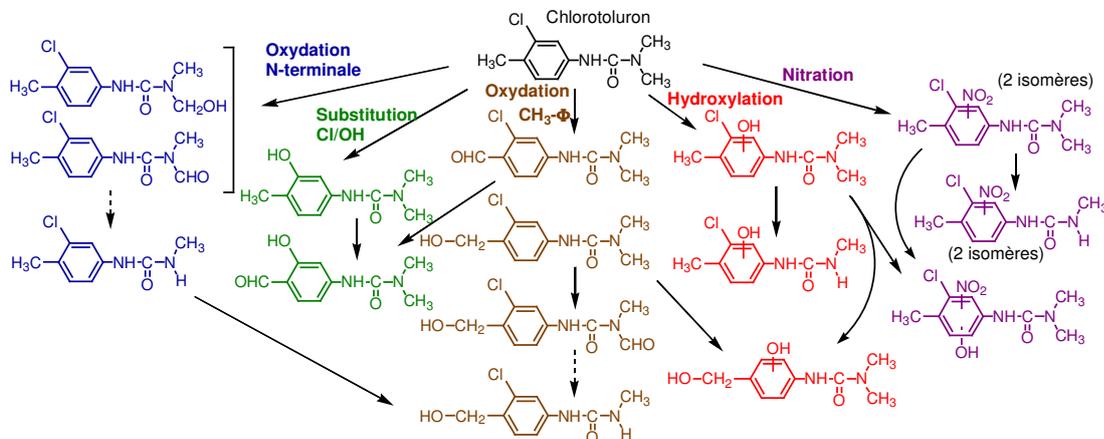
S. Nélieu<sup>1</sup>, M.V. Shankar<sup>1</sup>, F. Bonnemoy<sup>2</sup>, J. Bohatier<sup>2</sup>, L. Lefeuvre<sup>3</sup>, L. Kerhoas<sup>1</sup>, L. Lagadic<sup>3</sup> et J. Einhorn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, Unité Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques, RD 10, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex

<sup>2</sup>UMR Biologie des Protistes, Université Blaise Pascal, Campus des Cézeaux, 63177 Aubière Cedex

<sup>3</sup>INRA, UMR EQHC, Écobiologie et Qualité des Hydrosystèmes Continentaux, 65 rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes Cedex

Les eaux naturelles sont fréquemment polluées par des herbicides de la famille des chlorophénylurées, qui sont largement utilisés depuis plus de 40 ans. Cette contamination est susceptible d'induire des effets écotoxicologiques sur les organismes aquatiques. De plus, certains des produits issus de la dégradation de ces pesticides présentent une toxicité supérieure à celle du parent. Parmi les différents processus de dégradation biotiques et abiotiques pouvant intervenir dans les eaux naturelles de surface, nous nous intéressons plus particulièrement à la photodégradation induite par les nitrates et les nitrites (Fig. 1). Après excitation lumineuse, ces deux anions conduisent non seulement à la formation de radicaux hydroxyles (très oxydants), mais aussi à des espèces nitrées ( $\text{NO}^\circ$ ,  $\text{NO}_2^\circ$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$ ) qui réagissent avec les pesticides. Notre étude a pour objectif de préciser la nature, l'importance et l'impact écotoxicologique de ce processus de photodégradation induite dans des eaux naturelles.

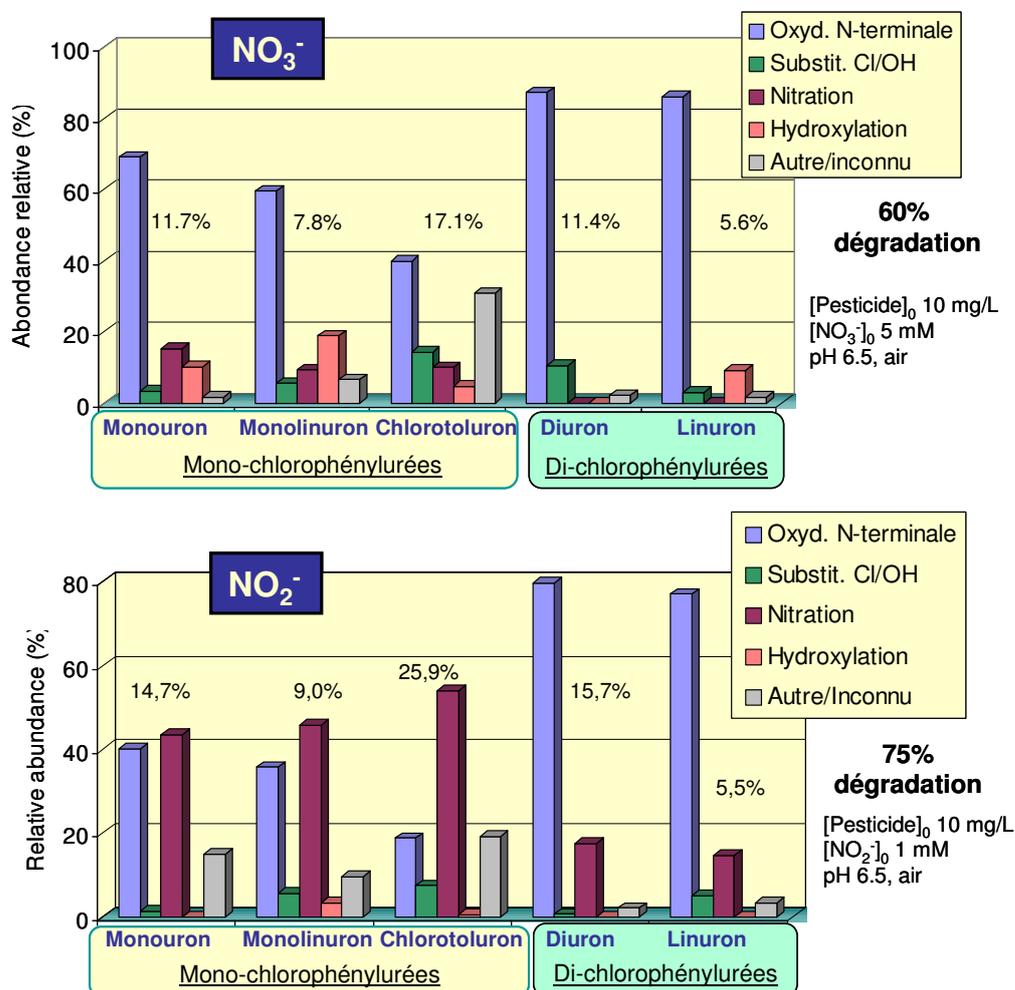


**Figure 1.** Schéma de la photodégradation du chlorotoluron induite par les ions nitrate et nitrite.

La cinétique de photodégradation du diuron induite par les nitrates et les nitrites a été étudiée en laboratoire, en considérant la pseudo-constante cinétique  $k'$  (du 1<sup>er</sup> ordre, déterminée en début de réaction) ou la demi-vie (qui prend aussi en compte la réactivité des produits de phototransformation). Nous avons observé une dégradation significative du diuron à des concentrations en inducteur équivalentes à celles des eaux naturelles :  $k'$   $10,8$  et  $11,8 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  respectivement pour  $[\text{NO}_3^-]$   $0,5 \text{ mM}$  et  $[\text{NO}_2^-]$   $0,01 \text{ mM}$ . Une augmentation de la concentration en nitrates accélère la dégradation, alors que l'effet est plus complexe dans le cas des nitrites du fait de recombinaisons de radicaux pour  $[\text{NO}_2^-]$  supérieure à  $0,1 \text{ mM}$ . Le pH joue également un rôle prépondérant sur la cinétique en cas de photoinduction par les nitrites :  $k'$  est multiplié par un facteur 4 quand on passe de pH 6,4 à pH 4. Ceci s'explique

par la réactivité supérieure de  $\text{HNO}_2$  (en équilibre acido-basique avec  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{pK}_a$  3,37) pour former des radicaux hydroxyles. Ces facteurs environnementaux présentent une influence similaire dans le cas d'autres chlorophénylurées (linuron, monolinuron, monuron, chlorotoluron).

Les identifications réalisées par LC-MS-MS ont permis de proposer des schémas de dégradation, qui présentent pour tous les pesticides testés les quatre voies suivantes : dégradation N-terminale, substitution du chlore par un hydroxyle, hydroxylation ou nitration du cycle aromatique (Fig. 2). Le chlorotoluron présente de plus une 5<sup>ème</sup> voie, l'oxydation du méthyle du cycle aromatique. En présence de  $\text{NO}_3^-$  les di-chlorophénylurées (diuron et linuron) conduisent essentiellement à des produits de dégradation N-terminale (de type N-monométhyle, N-formyle et carbinolamine). En revanche, la variété de photoproduits est supérieure dans le cas des mono-chlorophénylurées, avec en particulier une accumulation notable de composés nitrés. Ces produits nitrés, spécifiques de la photodégradation induite par  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ , constituent des marqueurs du processus en milieu naturel (où la biodégradation peut également intervenir et conduire à la plupart des autres produits).



**Figure 2.** Répartition des photoproduits de chlorophénylurées entre les voies de dégradation, en présence de nitrates (haut) ou de nitrites (bas) (Chaque barre représente la somme des produits d'une voie de dégradation / somme des produits détectés ; % au-dessus des barres représente la somme produits détectés).

Des expériences ont par ailleurs été réalisées en extérieur (lors de journées ensoleillées, à Versailles) sur des solutions de diuron et de chlorotoluron dans des réacteurs pyrex cylindriques (100 mL) et dans des réservoirs ouverts impliquant une pénétration lumineuse

supérieure (20 L, profondeur 25 cm). La photodégradation induite a été mise en évidence aux deux échelles d'étude, à la fois par les effets de paramètres (concentration en inducteur et en pesticide) et par la formation de photoproduits nitrés, qui est même supérieure à celle obtenue en laboratoire dans le cas du chlorotoluron. Les demi-vies sont de l'ordre de quelques jours (par ex. 3 j pour une solution de chlorotoluron 1 mg/L et  $\text{NO}_3^-$  1 mM). Parmi les paramètres explorés, citons notamment la composition en nitrates et nitrites au sein de mélanges de proportions variables. Selon les conditions (concentrations environnementales réalistes en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NO}_2^-$ ), on a pu observer soit i) un effet d'additivité des constantes de vitesse de photodégradation dues à chacune des espèces prise séparément, soit ii) un effet d'inhibition partielle de la réactivité de  $\text{NO}_3^-$ , l'espèce majoritaire. Par ailleurs, la réaction n'est que légèrement ralentie en eau de mésocosme (effet matrice).

L'impact écotoxicologique des produits formés est étudié sur des organismes modèles typiques des milieux aquatiques (bactérie *Vibrio fischeri* par test Microtox<sup>®</sup>, protozoaire cilié *Tetrahymena pyriformis*, gastéropode *Lymnaea stagnalis*). Les mesures effectuées concernent principalement des effets sub-létaux, afin de préciser les relations concentration/toxicité ou structure/toxicité et les effets synergiques ou antagonistes en particulier avec les ions nitrites et nitrates. Les tests effectués sur des "bruts réactionnels" (obtenus à 0, 20 et 70 % de photodégradation de diuron ou de chlorotoluron 1 ou 5 mg/L et en présence de  $\text{NO}_3^-$  1 ou 5 mM) montrent que, dans certaines conditions, l'irradiation accentue la toxicité des solutions (tests Microtox<sup>®</sup>, certaines enzymes de biotransformation de lymnées).

Des études en mésocosmes aquatiques sont en cours afin de permettre i) la caractérisation et le suivi analytique de photoproduits spécifiques formés *in situ* et ii) des mesures biologiques sur les mêmes organismes modèles qui, en mésocosmes, représentent trois niveaux-clés des réseaux trophiques.

## Session 2

### **Altérations physiologiques et comportementales**



## Intérêt des biomarqueurs de génotoxicité en écotoxicologie

A. Devaux<sup>1</sup>, Y. Gania<sup>1</sup>, S. Bony<sup>2</sup>

<sup>1</sup>INRA EFPA, 54280 Champenoux et Laboratoire des Sciences de l'Environnement, ENTPE, Rue Maurice Audin, 69518 Vaulx en Velin

<sup>2</sup>INRA, UMR Mycotoxines et Toxicologie Comparée des Xénobiotiques, École Nationale Vétérinaire de Lyon, 1 avenue C. Bourgelat, 69280 Marcy l'Étoile

L'un des défis auxquels est confrontée l'écotoxicologie est d'élaborer des méthodes performantes permettant non seulement de porter un diagnostic sur la qualité du milieu, mais aussi de prédire les effets à long terme d'une contamination chimique chronique sur les populations, les communautés et les écosystèmes. Le thème abordé ici concerne l'intérêt en écotoxicologie des biomarqueurs de génotoxicité, l'accent étant mis sur les écosystèmes aquatiques, en particulier lotiques.

De manière générale, l'impact de la contamination chimique de l'environnement aquatique se traduit chez les organismes vivants par des effets quantifiables aux différents niveaux de la hiérarchie biologique. C'est l'utilisation simultanée de plusieurs biomarqueurs étudiés chez diverses espèces animales et végétales qui a été choisie jusqu'à présent comme étant l'approche la plus adaptée au diagnostic des effets des polluants sur les organismes, et, associée aux études au niveau des populations et des communautés, à l'évaluation des risques écologiques. **Ce dernier point reste souvent théorique** car il nécessite d'établir des liens entre chaque niveau de complexité pour évaluer la valeur prédictive **éventuelle** des biomarqueurs sur les effets écologiques à long terme d'une pollution et pour décrypter ainsi les mécanismes de réponse des populations et des communautés au stress chimique. Cet aspect est historiquement à l'origine de controverses scientifiques dans le domaine de l'écotoxicologie et a fait l'objet récemment de réflexions pouvant être constructives [1]. Nous n'aborderons pas cette question ici, tout en essayant de rester prudents sur l'interprétation de la réponse des biomarqueurs présentés.

Les biomarqueurs de génotoxicité, du fait du rôle central de l'ADN, support biochimique de l'hérédité et cible potentielle de nombreux xénobiotiques, peuvent être considérés comme des marqueurs précoces d'exposition aux polluants. Ils présentent un intérêt original au sein des différents biomarqueurs, du fait de la pérennisation possible du message toxique suite à l'exposition à des polluants majeurs de l'environnement comme par exemple les pesticides, les hydrocarbures et les métaux lourds. Ainsi Shugart & Theodorakis [2] considèrent qu'une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les interactions des xénobiotiques avec le matériel génétique des organismes pourrait aider à définir les modifications plus complexes au niveau de l'écosystème. C'est dans l'optique de l'étude de biomarqueurs de phénomènes génotoxiques exprimés au niveau de la structure même de l'ADN, que sont effectuées dans nos laboratoires des mesures de cassures de brins d'ADN, de délétions de bases et d'apparition de sites alcalilabiles qui représentent des lésions à forte probabilité d'apparition après exposition des organismes à des polluants majeurs de l'environnement, qu'ils soient mutagènes ou pas.

Notre équipe mène trois approches complémentaires dans ce cadre d'écogénotoxicologie. La première concerne le développement au laboratoire de

biomarqueurs de génotoxicité sur différents organismes aquatiques appartenant à des niveaux trophiques variés (algues unicellulaires, invertébrés, amphibiens et poissons) en prenant en compte l'importance du contexte cellulaire (origine et fonction des cellules lésées) et des phénomènes de réparation. Ces recherches visent d'une part à mieux connaître les mécanismes d'action génotoxique des polluants, notamment en ce qui concerne la nature et l'origine des lésions à l'ADN produites et à étudier d'autre part l'importance des interactions entre polluants au sein de mélanges complexes. Ces travaux ont permis de mettre au point depuis une dizaine d'années l'analyse de biomarqueurs de génotoxicité dans des situations qualitativement et quantitativement contrastées de contamination chez des organismes tels que les algues unicellulaires, les invertébrés, les amphibiens et les poissons [3,5]. Une illustration peut être donnée par l'étude de la génotoxicité du cadmium chez le poisson. Nos recherches ont démontré clairement que la formation suite à l'exposition à ce métal de cassures simple et double brins à l'ADN nucléaire d'hépatocytes de truite était liée à la production d'entités réactives de l'oxygène dont l'action pouvait être modulée par un agent antioxydant [6].

La seconde approche concerne l'évaluation du potentiel génotoxique global de matrices telles que les effluents d'origine agricole, urbaine et industrielle, ainsi que les sédiments pollués ou les percolats obtenus dans des situations environnementales variées (sols pollués, mâchefers d'incinération d'ordures ménagères). A titre d'exemple, ce type d'approche a été mis en œuvre dans le cadre d'une démarche d'analyse du risque écotoxicologique de sédiments de curage provenant de canaux de navigation soumis à différents flux polluants dans l'Est et le Nord de la France. Des travaux menés en microcosmes de laboratoire ont ainsi permis de classer la dangerosité de ces matrices contaminées en fonction de différents biomarqueurs et en particulier de leur potentiel génotoxique mesuré chez des invertébrés comme *Limnaea stagnalis* ou des larves d'amphibiens exposés à ces sédiments [7,8].

La troisième approche complémentaire des deux précédentes vise à mettre en œuvre sur le terrain les biomarqueurs de génotoxicité développés en amont au laboratoire parallèlement à d'autres marqueurs physiologiques (teneurs et activités enzymatiques de protéines impliquées dans la détoxification et le transport des xénobiotiques) dans le but de quantifier l'impact de contaminations diffuses ou géographiquement ciblées sur des populations de poissons. L'apport de connaissances sur les différentes réponses physiologiques pouvant être observées en fonction de la nature et de l'importance des flux contaminants permettent de caractériser la qualité des milieux étudiés et peuvent apporter des informations utilisables par les gestionnaires dans des démarches de remédiation environnementale [9,10].

Cependant, la mise en évidence de relations de cause à effet suite à l'exposition d'organismes tels que les poissons aux polluants chimiques reste un exercice difficile du fait de la complexité des écosystèmes aquatiques lotiques, particulièrement instables dans le temps et l'espace et source de variabilité dans les réponses mesurées. Par ailleurs, ces organismes vivants peuvent s'acclimater et s'adapter aux différents facteurs de stress de leur environnement. Ces processus physiologiques, évalués en particulier *via* les réponses des biomarqueurs de génotoxicité, peuvent avoir dans certains cas une base génétique. Une part significative de la variabilité des réponses des organismes vivants à une exposition chimique toxique, que ce soit à l'échelle des individus, des populations ou au sein des communautés entières, peut être attribuée à leur constitution génétique et se traduit par une variation de leur sensibilité au stress contaminant [11] (effet *bottom-up* de la pollution). La contamination peut alors devenir une force sélective capable de modifier la structure génétique des populations contaminées, ceci pouvant menacer à terme leur survie (effet *top-down* de la pollution). Un certain nombre de travaux ont été menés

récemment dans ce cadre au laboratoire pour essayer de répondre aux questions suivantes : est-il possible de détecter une altération de la diversité génétique de populations de chevaines (poisson cyprinidé d'eau douce, *Leuciscus cephalus*) vivant dans des sites peu ou fortement contaminés ? Existe-t-il des relations entre les réponses de marqueurs de génotoxicité et marqueurs génétiques aux niveaux individuel et populationnel ? Parmi les principaux résultats, l'analyse conjointe de la distribution du polymorphisme de marqueurs microsatellites et enzymatiques entre des populations de chevaines exposées à différents niveaux de contamination amène à retenir cette approche pour la mise en évidence d'effets sélectifs liés au stress chimique. Une confirmation de ces effets sélectifs peut être fournie via l'exploration des relations entre variabilité génétique et certains traits de la fitness, comme nous l'avons montré entre certains allèles ou génotypes enzymatiques et la capacité des individus à maintenir l'intégrité de leur ADN [12,13].

#### Références bibliographiques

- [1] Forbes *et al.*, 2006. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 272-280.
- [2] Shugart & Theodorakis, 1998. *Biotherapy* 11, 119-27.
- [3] Devaux *et al.*, 1997. *Toxicol. in Vitro* 11, 71-79.
- [4] Mouchet *et al.*, 2005a. *Environ. Toxicol.* 20, 74-84.
- [5] Mouchet *et al.*, 2006. *Environ. Toxicol.* 21, 264-277.
- [6] Risso-de Faverney *et al.*, 2001. *Aquat. Toxicol.* 53, 65-76.
- [7] Mouchet *et al.*, 2005b. *J. Toxicol. Environ. Health* 68(A), 811-832.
- [8] Clément *et al.*, 2004. *Ecotoxicology* 12, 323-333.
- [9] Larno *et al.*, 2001. *Ecotoxicology* 10, 145-158.
- [10] Flammarion *et al.*, 2002. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51, 47-56.
- [11] Evenden & Depledge, 1997. *Environ. Health Persp* 105, 849-854.
- [12] Larno *et al.* 2005. *Mol. Ecol. Notes* 5, 752-754.
- [13] Devaux & Larno 2005. Effects of chemical contaminants on genetic diversity, DNA damage and fitness traits in feral fish populations. VI Comet Assay Workshop, Varsovie, 22-24 septembre 2005.

## Les milieux marins tropicaux sous surveillance : utilisation d'un biomarqueur de génotoxicité

S. Lemoine

Laboratoire de Biologie Marine, Équipe DYNECAR, EA 926 Dynamique des Ecosystèmes Caraïbes et Biologie des Espèces Inféodées, Université des Antilles et de la Guyane, Campus de Fouillole, 97157 Pointe-à-Pitre Cedex

De nombreux programmes de surveillance de l'environnement ont montré l'intérêt des biomarqueurs. En effet, beaucoup plus spécifiques de l'impact des composés toxiques sur un organisme, les biomarqueurs peuvent en outre être utilisés comme signaux précoces d'alerte. Ils peuvent apparaître avant que les conséquences ne se traduisent en termes écologiques. C'est le développement de ces méthodes que nous souhaitons réaliser en Guadeloupe.

Actuellement, deux programmes sont développés au sein de l'équipe DYNECAR (EA 926), le premier portant sur la contamination et l'impact par les métaux lourds chez l'huître de palétuvier *Crassostrea rhizophorae* et le deuxième sur les pesticides chez un crustacé d'eau douce *Macrobrachium faustinum* (ouassou). Pour ces deux programmes l'effet biologique est étudié par le biais de l'altération du génome (génotoxicité).

Le but de cette étude était de dresser un bilan des contaminations métalliques dans les deux culs-de-sac de la Guadeloupe. Des dosages de métaux ont été réalisés sur les sédiments ainsi que sur les huîtres de palétuvier provenant de 22 stations localisées sur la bande côtière de mangrove. D'autre part, les effets induits sur le génome (cassures de l'ADN) de ces organismes ont été évalués. Ainsi, il ressort que parmi les 22 stations étudiées, cinq d'entre-elles se caractérisent par de très fortes teneurs métalliques. Trois de ces cinq stations se localisent dans la Réserve Naturelle du Grand Cul-de-Sac Marin. Par ailleurs, au niveau des stations où d'importantes concentrations métalliques ont été enregistrées, l'altération de l'ADN des organismes était également importante. Ces premiers résultats nous ont donc permis de d'évaluer le degré de contamination de certaines zones de mangrove, écosystème dont l'importance est capitale en terme de reproduction des organismes marins [1]. En effet, cet écotone qui fait la transition entre les milieux marin et terrestre, est un lieu de ponte, une véritable nurserie, où grandissent les juvéniles de nombreuses espèces.

En Guadeloupe, les milieux aquatiques notamment la mangrove, sont très sensibles à toute forme de pollution, et une forte concentration des contaminants d'origine humaine peut avoir des effets néfastes sur la croissance des organismes marins, amener à des déséquilibres élémentaires, et ainsi exercer une action nuisible voir toxique sur les écosystèmes, ce qui pourrait à terme, engendrer une diminution des stocks exploités. Il est donc très urgent de compléter nos connaissances sur les niveaux de contamination des écosystèmes marins côtiers de la Guadeloupe.

Le développement des monocultures intensives que sont la culture de la canne et de la banane a impliqué le recours à bon nombre de produits phytosanitaires. La lutte contre le charançon a entraîné l'utilisation d'insecticides organochlorés, la dieldrine et le HCH dans les années 60-70 puis la chlordécone de 1972 à 1993. Les organochlorés et en particulier la chlordécone sont très persistants et se retrouvent

dans le sol même plusieurs dizaines d'années après leur épandage. Le transfert de ces pesticides des parcelles agricoles vers les cours d'eau représente une menace pour le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Une étude sur la contamination des milieux marins côtiers de la Guadeloupe montre également la contamination de certaines espèces marines par la chlordécone [2]. De très fortes concentrations ont été retrouvées au niveau d'espèces d'eau douce [3]. Une étude a donc été développée sur l'impact de ce pesticide sur ces populations. L'espèce choisie est *M. faustinum* prélevée par pêche électrique dans la rivière Grande Anse située au sud de la Basse Terre où sont localisées la majorité des sols contaminés par la chlordécone. L'altération de l'ADN est étudiée par la technique du « test comet » qui a été mis au point pour *M. faustinum*. Des individus ont été prélevés à différentes stations situées en amont, aval ou au niveau des zones de culture de la banane. Des expérimentations au laboratoire d'écotoxicologie avec des concentrations de chlordécone définies sont en cours et permettront de mieux connaître l'impact direct de ce pesticide.

#### Références bibliographiques

- [1] Ramdine G., 2005. Contaminations métalliques dans le Grand et Petit Cul de Sac Marin (Guadeloupe). Mise en place d'une étude de biosurveillance par l'utilisation d'un biomarqueur de génotoxicité chez *Crassostrea rhizophorae*. Rapport de DEA.UAG. 42 pages.
- [2] Bouchon C. et Lemoine S., 2003. Niveau de contamination par les pesticides des chaînes trophiques des milieux marins côtiers de la Guadeloupe et recherche de biomarqueurs de génotoxicité.
- [3] Monti D., 2005. Étude du niveau de contamination des organismes aquatiques d'eau douce par les pesticides, en Guadeloupe. Convention DIREN, 35 pages.

## Induction d'exoenzymes fongiques : biomarqueurs d'exposition aux métaux ?

J. Lebrun, I. Lamy et C. Mougin

INRA, Unité PESSAC, Physico-chimie et Écotoxicologie des SolS d'Agrosystèmes Contaminés, RD 10, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex

### Contexte

Les micro-organismes du sol sont étudiés depuis de nombreuses années pour leur réactivité vis-à-vis des micropolluants dans les sols. Les recherches, notamment à l'INRA, se sont principalement focalisées sur les bactéries, et d'une façon générale les interactions polluants/champignons restent moins bien décrites.

Nous avons montré la capacité des champignons à interagir avec les composés trace organiques (CTO) en étudiant une variété de réponses physiologiques liées à la croissance, la reproduction ou à la capacité de biotransformation de ces organismes. D'autres réponses sont connues par ailleurs : mécanismes d'efflux, modification du métabolisme cellulaire... Mais les champignons sont aussi décrits pour concentrer les éléments trace métalliques (ETM) dans leurs cellules, et dans ce cas relativement peu de données sont disponibles à la fois sur les mécanismes de l'exposition et sur ceux responsables des impacts. On sait d'une part que ce n'est pas la concentration totale mais plutôt la forme sous laquelle se trouve le polluant qui est le plus important vis-à-vis de la toxicité pour un organisme, et d'autre part que les réponses des micro-organismes peuvent être différentes en fonction de la dose de polluant, et de la durée d'exposition de l'organisme à la forme toxique du polluant. Enfin, les réponses de ces organismes peuvent en retour induire des changements environnementaux qui modifient le milieu de façon non encore prévisible. Ainsi, il a été montré dans la littérature que le Cd exogène introduit dans un sol induisait une surexpression d'oxydases exocellulaires fongiques, sans que les conséquences n'en soient évaluées sur le plan fonctionnel. L'exposition des champignons aux métaux peut aussi s'accompagner de changements morphologiques. De plus, sur le terrain, on constate que les sols pollués en métaux sont très riches en champignons, et ce même pour des sols à pH alcalins (>8) alors que les champignons sont classiquement réputés acidophiles. Ceci suggère des mécanismes adaptatifs à élucider.

### Objectifs

Ce projet a pour vocation d'étendre aux éléments trace métalliques, par un couplage de descripteurs physico-chimiques et biologiques, la démarche développée dans le cadre de l'étude du rôle des systèmes enzymatiques fongiques sur la transformation des composés trace organiques et des effets en retour des composés sur ces mêmes systèmes enzymatiques. Il doit permettre d'avancer dans l'acquisition de données de base qui seront utilisées pour discuter l'exposition et l'impact aux pollutions, y compris les pollutions multiples impliquant CTO et ETM.

### Matériels et méthodes

Pour comprendre et décrire l'impact des polluants métalliques sur les champignons du sol, et leur réponse, nous développons une approche basée sur l'étude de la spéciation des métaux, leur évolution dans le temps, et la réponse

fongique à une exposition, par le couplage de descripteurs physico-chimiques et biologiques.

Les études sont réalisées dans un premier temps sur des souches fongiques cultivées en milieu liquide. Les effets des métaux sur la morphologie des champignons sont observés par microscopie électronique à balayage. L'activité des exoenzymes (laccases, peroxydases) est mesurée par spectrophotométrie.

## Résultats

### *Effet des métaux sur la morphologie du basidiomycète Trametes versicolor*

Le Cu et le Cd ont été ajoutés au milieu de culture à la concentration de 1 mM. En présence de Cu, les filaments fongiques sont plus gros et plus réguliers que dans les cultures témoins non traitées. De plus, le champignon synthétise une matrice extracellulaire (acides organiques) en faible quantité.

En présence de Cd, les filaments ont un aspect plus rugueux, et la matrice extracellulaire est plus dense. Cette matrice pourrait être induite par un stress chimique pour chélater des éléments métalliques potentiellement toxiques.

L'effet des métaux (Cu, Zn, Cd, Pb et Hg) sur la production de biomasse par le champignon a été mesuré à différentes concentrations. Seul le mercure a été montré comme toxique à la concentration de 1 mM.

### *Induction des exoenzymes du basidiomycète Trametes versicolor par les métaux*

L'effet des métaux (Cu, Zn, Cd, Pb et Hg) sur la production d'exoenzymes (laccases et peroxydases) a été mesuré sur une période de 17 jours, pour différentes concentrations de métaux (0,01-1 mM) dans un milieu de culture favorable à la croissance du champignon et à la production de laccase classiquement utilisé au laboratoire.

Cu, nécessaire à faible dose pour permettre l'expression de laccase active, stimule l'activité laccase par un facteur 3-4 à la plus forte concentration. Zn et Pb n'ont aucun effet sur la production d'enzymes. A l'inverse Cd et Hg semblent être des inducteurs relativement puissants des laccases fongiques dès la plus faible concentration du métal. Toutefois, pour le Hg, l'effet positif s'estompe au cours du temps, en raison de la toxicité exercée par cet élément sur le champignon.

En présence de Cu, Pb et Hg présentent des effets simulateurs comparables sur les manganèse-péroxydases de *T. versicolor*. Le Pb exerce un effet spécifique sur cette activité enzymatique alors qu'il n'a pas d'effet sur la production de laccase.

### *Effet de la composition du milieu de culture sur la réponse de Trametes versicolor à l'exposition aux métaux*

Différents milieux de culture, avec des compositions variables en oligo-éléments et en particulier des teneurs minimales en acides organiques, ont été testés dans le but de limiter la complexation des métaux.

Dans ces conditions, le Cu s'est montré un inducteur puissant qui entraîne une stimulation de l'activité laccase 6 fois supérieure à celle observée dans le milieu de culture classiquement utilisé au laboratoire, contenant des ligands organiques complexants. L'utilisation d'une électrode spécifique au  $\text{Cu}^{2+}$  montre que le métal est présent en quasi-totalité sous sa forme ionique dans le milieu simplifié alors qu'il est fortement complexé dans le milieu classique.

Dans le milieu simplifié, les activités laccases et manganèse-péroxydases sont stimulées dès les faibles concentrations en Cu de  $10^{-6}\text{M}$ , ce qui pourrait être lié à la présence de formes de Cu plus facilement assimilables par le champignon.

Des essais avec les métaux en mélange fournissent des résultats contrastés difficilement interprétables en première approche.

## Conclusion

Ces premiers résultats montrent un impact positif de certains métaux sur l'activité d'oxydases exocellulaires chez le basidiomycète *Trametes versicolor* dans des cultures en milieu liquide. Il convient maintenant de vérifier que cet accroissement d'activité résulte bien d'un mécanisme d'induction par dosage des ARN codant pour ces enzymes, notamment pour le cuivre.

L'étude de la spéciation du cuivre dans les milieux est en cours pour connaître les formes métalliques à l'origine de l'induction.

## Remerciements

Les résultats présentés ont été acquis dans le cadre d'un projet soutenu par le département Environnement et Agronomie de l'INRA. Les auteurs remercient tous les personnels de l'unité PESSAC qui se sont impliqués dans ces travaux.

## Effets du parathion sur le tube digestif de ver de terre

C. Mazzia, B. Mazet, M. Rault et Y. Capowiez

INRA, UMR Écologie des Invertébrés, Laboratoire de Toxicologie Environnementale, Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9

### Introduction

En tant qu'ingénieur de l'écosystème, le ver de terre occupe un rôle central dans l'écosystème du sol en y influençant de manière importante les phénomènes physiques (propriétés de transfert), chimiques (cycles biogéochimiques) et biologiques (interactions avec les autres composantes de l'écosystème sol, des micro-organismes aux racines). Ce rôle majeur fait que le ver de terre tient une place importante dans les procédures d'évaluation des risques liés à l'utilisation de xénobiotiques. Ainsi en écotoxicologie, il est un marqueur de choix pour évaluer les impacts de ces molécules polluantes sur l'environnement.

Le parathion est un organophosphoré (OP) connu chez le ver de terre pour induire notamment une diminution de l'activité des cholinestérases, mais aussi des modifications de poids, de la reproduction et des caractéristiques anatomiques.

Le tube digestif de ver terre représente avec le tégument une des deux voies possibles de contamination par les xénobiotiques. Il peut être une voie de pénétration de ces molécules mais aussi une cible. Au cours de cette étude, nous avons étudié l'effet d'une solution commerciale contenant du parathion (Oléobladan, Bayer) sur des paramètres biochimiques (dosage des cholinestérases) et physiologiques (enregistrement de l'activité contractile) d'une partie du tube digestif de ver de terre, le jabot/gésier.

### Matériel et méthodes

Les expériences ont été réalisées sur des vers de terre de l'espèce *Apporectodea caliginosa* provenant d'un verger abandonné depuis au moins 5 ans. Après anesthésie dans de l'alcool à 10 %, une ouverture dorsale est réalisée afin de prélever le jabot/gésier.

Pour le dosage des cholinestérases, nous avons utilisé le protocole d'Ellman *et al.* [1]. Pour les manipulations d'enregistrement de l'activité contractile, le complexe est placé dans une boîte de Petri où l'extrémité duodénale est fixée dans le fond et l'autre extrémité (côté œsophage) reliée à un transducteur de force relié à un ordinateur. Pour les expériences d'étude de l'activité contractile, nous avons choisi comme paramètre de caractérisation le calcul d'Aire Sous la Courbe (ASC) qui permet d'évaluer le pouvoir contractile d'une substance en prenant en compte des données comme les variations d'amplitude et/ou de tonus et/ou de durée.

Ces expériences biochimiques et physiologiques ont été réalisées en parallèle et suivant deux modalités.

Dans un premier temps, nous avons prélevé des jabots/gésiers que nous avons immergés dans du liquide physiologique contenant  $10^{-9}$ M,  $10^{-6}$ M,  $0,7 \cdot 10^{-3}$ M (=10X) ou  $10^{-3}$ M de parathion pendant 6 h à 4°C.

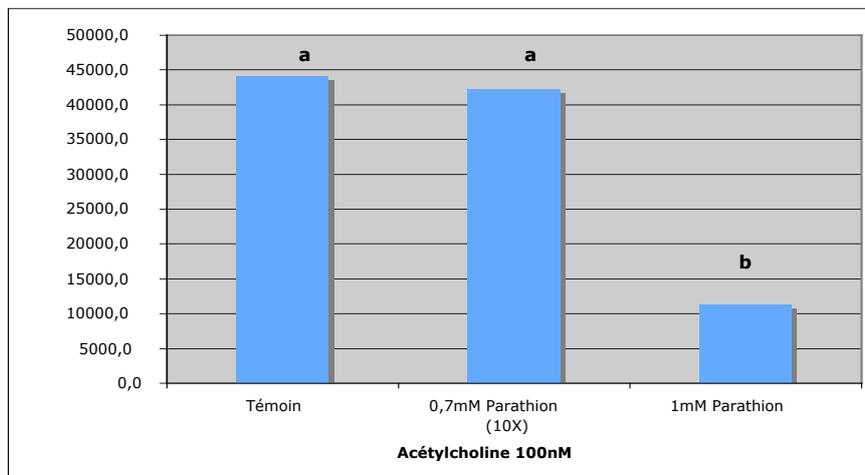
Dans un deuxième temps, nous avons travaillé sur des préparations provenant de vers de terre restés pendant 2 semaines dans un sol pollué avec du parathion à la dose de 6,25 mg/kg de terre sèche ce qui correspond à 10 fois la concentration prédite dans l'environnement (CPE). La solution vaporisée sur la terre correspond à

une solution contenant environ  $0,7 \cdot 10^{-3} \text{M}$  (=10X) de parathion. Ces deux modalités ont été utilisées pour comparer deux modèles d'exposition différents.

Pour toutes les expériences physiologiques, nous avons soumis nos préparations à de l'acétylcholine (ACh) à la concentration de 100 nM et une solution riche en KCl (154 mM au lieu de 4 mM). Cette dernière permet dans des conditions « témoin » d'évaluer la capacité maximale de contraction de la préparation.

## Résultats

L'immersion des préparations dans du parathion pendant 6 h provoque une diminution de l'activité des cholinestérases d'environ 65 % pour les concentrations  $0,7 \cdot 10^{-3}$  et  $10^{-3} \text{M}$  (Tab. 1). Sur le plan physiologique, on observe une diminution significative de l'ASC après application d'ACh et de KCl par rapport au témoin uniquement pour une concentration de  $10^{-3} \text{M}$  (Fig. 1).



**Figure 1.** Valeurs d'ASC après immersion des préparations dans des solutions témoin (n = 15) ou contenant 0,7 mM (n = 8) ou 1 mM (n = 7) de parathion, pendant 6 h à 4°C et suite à la perfusion d'ACh. Les lettres différentes indiquent une différence significative (p < 0,05).

Dans le cas des jabots/gésiers issus de vers de terre restés pendant 2 semaines dans un sol pollué, nous observons une diminution d'environ 70 % de l'activité des cholinestérases (Tab. 1). D'un point de vue physiologique, il n'y a pas de variations significatives de l'activité contractile suite à la perfusion d'acétylcholine ou de KCl par rapport au témoin.

**Tableau 1.** Pourcentage de l'activité des cholinestérases présente dans les jabots/gésiers selon les 2 modalités.

	Expériences d'immersion pendant 6 h à 4°C				Expériences avec un sol pollué (10X) pendant 2 semaines. (n=10)
	$10^{-9} \text{M}$ (n=8)	$10^{-6} \text{M}$ (n=8)	$0,7 \cdot 10^{-3} \text{M}$ (10X) (n=8)	$10^{-3} \text{M}$ (n=8)	
Activité spécifique (% par rapport au témoin)	100%	100%	44,4%	35,5%	29,5%

## Discussion et conclusion

Pour la première fois, des expériences montrent les effets d'un organophosphoré, le parathion, sur des paramètres biochimique et physiologique d'une portion du tube digestif de ver de terre, le jabot/gésier.

Dans les deux modalités réalisées au cours de cette étude, les résultats biochimiques confirment l'effet inhibiteur du parathion sur l'activité des cholinestérases. On note toutefois que cet effet au niveau du jabot/gésier n'apparaît que pour de fortes concentrations de parathion.

Sur le plan physiologique, nous avons observé une atteinte des caractéristiques contractiles de cet ensemble seulement lorsque les préparations sont immergées avec du parathion  $10^{-3}$  M pendant 6 h. Les résultats avec le KCl montrent que le parathion affecte la machinerie contractile et que c'est certainement cet effet qui est la cause de la diminution de la réponse à l'ACh. Il ne semble donc pas y avoir de relations entre la variation biochimique des cholinestérases et la réponse contractile du jabot/gésier à l'ACh. Ceci est vérifié par le fait qu'on observe de fortes baisses de l'activité des cholinestérases sans qu'il y ait de modifications significatives de la réponse contractile à l'ACh.

Ces résultats montrent donc qu'à forte dose, le parathion affecte des caractéristiques biochimiques et physiologiques du jabot/gésier de ver de terre et que selon les modalités d'exposition, on peut observer des différences d'où l'intérêt de posséder plusieurs biomarqueurs.

La réponse contractile du jabot/gésier au KCl pourrait être utilisée pour d'autres xénobiotiques comme un biomarqueur d'exposition. Dans le cas du parathion, il serait aussi intéressant d'observer si, sur cette préparation, des réponses à d'autres neurotransmetteurs comme, la sérotonine, l'octopamine ou le GABA sont affectées. Enfin, ces résultats sur le tube digestif pourraient aussi expliquer en partie les pertes de poids ou les modifications du comportement excavateur observées pour ce xénobiotique dans notre laboratoire.

#### Références bibliographiques

[1] Ellman *et al.*, 1961. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-93.

## Inhibition des cholinestérases : un biomarqueur d'exposition chez le ver de terre, en verger de pommiers

M. Rault, C. Mazzia, O. Mascle et Y. Capowiez

INRA, UMR Écologie des Invertébrés, Laboratoire de Toxicologie Environnementale, Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9

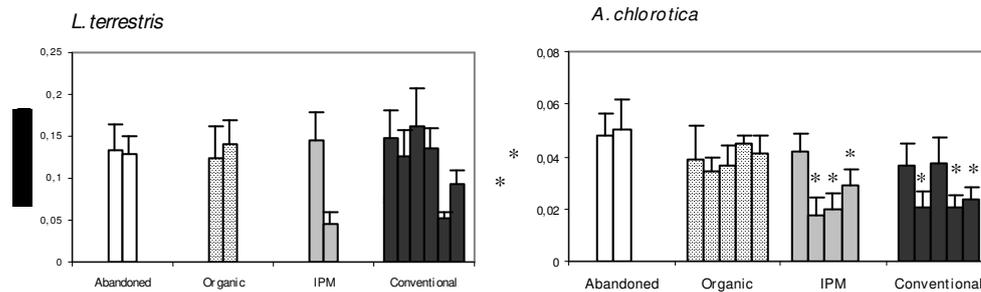
Les cholinestérases (ChEs) constituent une famille d'enzymes très sensibles aux pesticides organophosphorés et carbamates et sont largement utilisées comme biomarqueurs chez de nombreuses espèces. Parmi les cholinestérases on distingue l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme du système nerveux impliquée dans la transmission cholinergique, et les pseudo-cholinestérases, essentiellement la butyrylcholinestérase (BuChE), présente dans les muscles, le plasma et d'autres tissus, dont le rôle est encore mal connu. Il est possible de distinguer la présence de l'une ou l'autre de ces deux formes enzymatiques, au sein d'un même tissu, en utilisant les substrats et inhibiteurs spécifiques de chaque ChE. Ces différentes formes pouvant présenter une sensibilité différente vis à vis des pesticides, il est indispensable de connaître la répartition de ces enzymes. Chez le ver de terre, l'inhibition des ChEs a été étudiée en conditions de laboratoire mais aucun effet n'a encore été mis en évidence dans les conditions de terrain. Afin de valider correctement ce biomarqueur chez le ver de terre, nous avons (i) caractérisé l'enzyme, étudié sa variabilité naturelle et son niveau d'activité chez différentes espèces de ver de terre prélevées au terrain ; (ii) suivi l'inhibition des ChE chez *A. chlorotica* et *L. terrestris* dans un réseau de vergers de pommiers (traités en agriculture conventionnelle, raisonnée, biologique, et vergers abandonnés) et (iii) analysé la dynamique d'inhibition en conditions de laboratoire, d'un organophosphoré modèle, le parathion, chez *A. chlorotica* et *A. caliginosa*.

### Caractérisation des ChE

Les ChE sont caractérisées dans différents tissus et différentes espèces, dont *Allolobophora chlorotica*, *A. caliginosa* et *Lumbricus terrestris*. L'activité des ChE, préférentiellement localisée dans le tissu nerveux, reste stable au sein d'une même espèce. Chez *L. terrestris*, l'activité spécifique des ChE est 3 fois plus élevée que chez *A. caliginosa* et *A. chlorotica*. L'absence d'inhibition des ChE en présence de Iso-OMPA (inhibiteur spécifique de la BuChE), ainsi qu'une hydrolyse préférentielle de l'acétylthiocholine permet de conclure que chez *A. caliginosa* et *L. terrestris* les ChEs sont essentiellement des AChEs alors que chez *A. chlorotica* on observe une proportion équivalente des AChE et BuChE

### Suivi de l'activité ChE chez *A. chlorotica* en vergers de pommiers

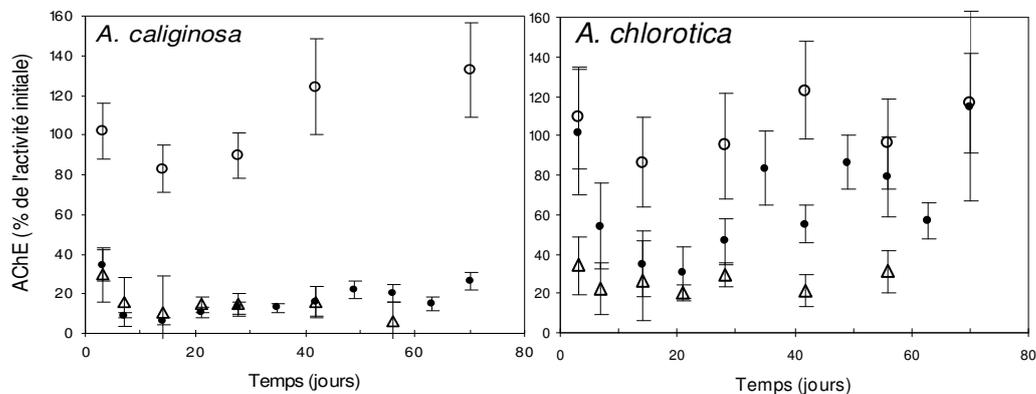
L'activité ChE est suivie chez les vers prélevés au terrain en avril (*L. terrestris* et *A. chlorotica*), en mai, en août et en novembre pour *A. chlorotica*. Aucune inhibition n'est observée en agriculture biologique et témoins (vergers abandonnés). Chez *A. chlorotica*, l'inhibition est observée dans la plupart des vergers traités (conventionnelle et raisonnée), alors que *L. terrestris* présente une inhibition dans seulement 2 vergers conventionnels et 1 verger en agriculture raisonnée (Fig. 1). La différence d'inhibition chez ces deux espèces peut être liée à la présence de formes différentes de ChE, ou à une exposition différente des vers liée à leur comportement.



**Figure 1.** Activité spécifique des ChEs de *A. chlorotica* et *L. terrestris* prélevés en avril dans chaque verger. Les barres de valeurs portant les étoiles sont significativement différentes des valeurs de références mesurées en vergers abandonnés.

### Dynamique d'inhibition par le parathion des ChE chez *A. chlorotica* et *A. caliginosa*

Chez *A. chlorotica*, nous avons observé que l'activité ChE reste inhibée en novembre soit 2 mois après la dernière application de pesticides, dans certains vergers conventionnels. Nous avons alors suivi la dynamique d'inhibition des ChEs en conditions de laboratoire. Les vers sont exposés 14 jours dans des sols pollués de manière homogène, retirés du milieu puis placés dans un sol non pollué. L'activité des ChEs est suivie sur 70 jours. Deux doses de parathion (1 ppm équivalente à la concentration utilisée au terrain, et 10 ppm) sont étudiées. Les résultats sont comparés à un sol témoin. L'expérience est réalisée sur deux espèces de vers de terre, *A. chlorotica* et *A. caliginosa* et aucune mortalité n'est observée au cours de l'expérience.



**Figure 2.** Dynamique d'inhibition des ChE après exposition au parathion. Témoin (○) ; parathion 1ppm (●) ; parathion 10ppm (△).

Quelle que soit l'espèce considérée, la dose 10ppm provoque une perte d'activité d'environ 30 % de l'activité initiale dès le troisième jour d'exposition (Fig. 2). L'activité ChE reste fortement inhibée (de 80 à 90 % de l'activité initiale pour *A. caliginosa* et de 70 à 80 % pour *A. chlorotica*) durant les 70 jours étudiés. Chez *A. caliginosa* aucune différence d'inhibition n'est observée entre les doses 1 ppm et 10 ppm. En revanche, chez *A. chlorotica* l'activité ChE est nettement moins inhibée à la dose 1 ppm. Non seulement après 3 jours d'exposition l'activité reste identique à celle du

témoin, mais de plus l'enzyme récupère progressivement son activité initiale au cours de la période étudiée.

### Conclusions

Le suivi de l'activité des ChEs dans un réseau de vergers, nous permet pour la première fois de valider ce biomarqueur pour estimer les impacts environnementaux liés aux protections phytosanitaires (en particulier l'utilisation des organophosphorés et carbamates). Nous avons montré par ailleurs qu'avec une molécule modèle (le parathion), les inhibitions peuvent durer longtemps ce qui expliquerait une inhibition prolongée des ChEs au-delà des derniers traitements.

La différence d'inhibition au terrain observée entre *L. terrestris* et *A. chlorotica* pourrait s'expliquer à la fois par une différence de comportement entre ces deux espèces de vers mais aussi par une différence de sensibilité des différentes formes de ChE.

Les travaux complémentaires seraient nécessaires pour évaluer plus précisément ces phénomènes, en testant plus particulièrement l'inhibition des BuChEs de *A. chlorotica*.

## Le comportement excavateur des vers de terre comme source de biomarqueurs

Y. Capowiez, O. Mascle, M. Rault et C. Mazzia

INRA, UMR Écologie des Invertébrés, Laboratoire de Toxicologie Environnementale, Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9

De nombreux biomarqueurs sont développés actuellement en écotoxicologie, mais rares sont ceux qui permettent de prédire des effets à une échelle biologique plus importante (population, communautés) ou même directement au niveau de l'écosystème et son fonctionnement. Les biomarqueurs relatifs au comportement sont souvent réputés pouvoir combler ce défaut. Nous avons voulu tester cette hypothèse sur le modèle lombricien. En effet, si les vers sont couramment utilisés en écotoxicologie, leurs rôles multiples au sein du sol, qu'ils soient physiques (création de galeries et enfouissement de la matière organique), chimiques (cycles biogéochimiques) ou biologiques (interaction avec les autres êtres vivants, des micro-organismes aux racines) ne sont jamais pris en compte dans ces études. Cependant observer le comportement des vers n'est pas évident car ces animaux vivent cachés dans un milieu opaque. Nous avons donc dû adapter deux types d'outils spécifiques.

### Matériel et méthodes

Les terrariums 2D sont 2 plaques de verre de format A3, séparés de quelques mm et dans lesquels on peut recréer des horizons de sol à la densité voulue et introduire des vers [1]. Ces terrariums sont ensuite entreposés dans une chambre froide à l'obscurité de telle manière qu'il est possible de venir observer et noter les vers et leurs galeries (en lumière rouge) 3 fois par jour. Après une semaine, les réseaux des vers sont numérisés et analysés.

On peut également, pour obtenir des microcosmes plus réalistes, constituer des colonnes de sol grâce à une presse hydraulique. Les vers sont introduits dans ces colonnes et laissés à l'obscurité un mois. Passé ce délai, les colonnes sont alors analysées par tomographie aux rayons X afin d'obtenir des images (coupes transversales) où l'on peut distinguer la macroporosité d'origine lombricienne. Par des algorithmes spécifiques, il est alors possible de reconstruire les réseaux de galeries en 3D et d'obtenir leurs caractéristiques tridimensionnelles (longueur, diamètre moyen, tortuosité,...) en utilisant les outils dérivant de la morphologie mathématique.

Nous avons utilisé ces 2 techniques pour étudier les effets potentiels de l'imidaclopride (insecticide de la famille des néonicotinoïdes). Les sols ont été pollués de manière homogène afin de mieux contrôler l'exposition des vers. La concentration environnementale prédite (ou CEP) pour cette molécule est de 0,5 mg/kg de terre en sèche (ou ppm). De premières expériences au laboratoire nous ont permis de déterminer que la DL50 de l'imidaclopride concernant 2 espèces de vers représentatives (*Aporrectodea icterica* et *A. nocturna*) était de 3,74 et 2,81 ppm respectivement. Aucune mortalité n'est cependant observée à 1 ppm. Nous avons donc choisi de tester les doses sublétales 0,1 et 0,5 ppm d'imidaclopride sur le comportement des vers. L'imidaclopride étant peu soluble dans l'eau, nous avons dû ajouter du DMSO (à 0,25 %). Les résultats seront comparés à un sol témoin

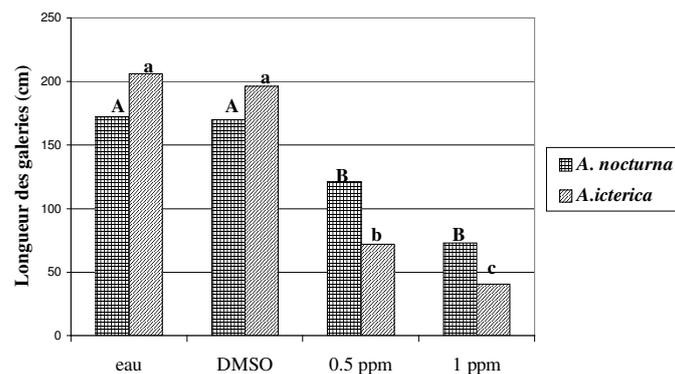
contenant cette concentration en DMSO. Pour chaque dose testée, nous avons réalisé 10 terrariums 2D et seulement 3 colonnes de sol (pour chaque espèce).

### Résultats - Discussion

En terrariums 2D, nous observons des modifications du comportement excavateur des 2 espèces étudiées pour les 2 doses étudiées. Ces modifications concernent l'intensité du creusement (longueur des galeries moindre en présence d'imidaclopride; Fig. 1) mais également certains paramètres de forme des réseaux (par exemple, en présence d'imidaclopride, les réseaux réalisés sont significativement moins profonds et comportent moins de branchement).

Deux conclusions peuvent donc être tirées de cette expérience :

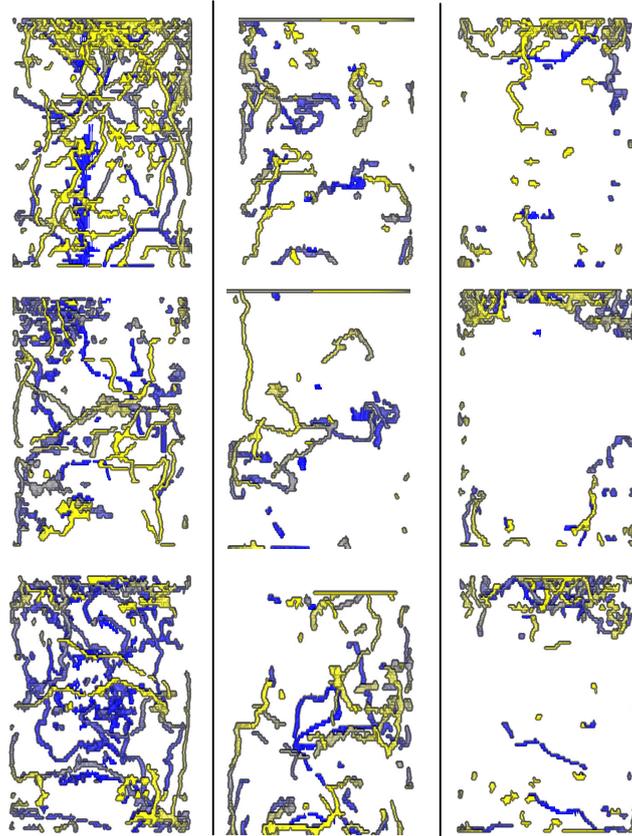
- (i) le comportement des vers de terre de catégories écologiques différentes (un endogé et un anécique) peut être grandement modifié par des insecticides comme l'imidaclopride et ce, à des doses réalistes (inférieures à la CEP). Seul bémol, cependant, le mode de contamination est peu réaliste (pollution homogène du sol) ;
- (ii) si cette technique rustique et peu onéreuse (terrariums 2D) permet de mettre ces effets en évidence, il est cependant difficile d'en estimer les conséquences en terme de fonctionnement du sol puisque les réseaux de galeries sont réalisés en conditions peu réalistes (effets de bords et limitation à 2 dimensions).



**Figure 1.** Longueurs (en cm) des galeries creusées par les vers des 2 espèces en terrariums 2D en sol sain (water et DMSO) et en sol pollué (0,5 et 0,1 ppm d'imidaclopride). Des barres portant des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 % (les tests sont réalisés séparément pour les 2 espèces).

En colonnes de sol, après reconstruction 3D des réseaux de galeries (Fig. 2), les modifications touchent cette fois encore l'intensité de creusement (avec une sensibilité accrue pour *A. icterica* puisque la différence est significative aux 2 doses testées contrairement au cas d'*A. nocturna*) et certains paramètres de forme (le taux de branchement ainsi que la sinuosité mais uniquement pour *A. icterica*).

Pour tenter d'estimer si les modifications observées pouvaient avoir des répercussions sur le fonctionnement du sol, nous avons réalisé des expériences de diffusion gazeuse au sein des colonnes de sol. Pour cela, après avoir défauné les colonnes au chloroforme, nous injectons du butane en quantité connue à leur sommet et nous mesurons au cours du temps les concentrations en butane au fond de celles-ci grâce à un CPG. Paradoxalement, nous n'avons observé de différences significatives en matière de diffusion gazeuse qu'au sein des colonnes où résidaient des vers de l'espèce *A. nocturna* et à la plus forte concentration en imidaclopride (0,5 ppm). L'absence de différence pour l'espèce endogée (*A. icterica*) serait expliquée par le fait que les réseaux constitués par ces vers sont par nature peu continus (ces vers rebouchant leurs galeries par leurs déjections) et seraient donc moins efficaces pour le transfert de gaz au sein du sol.



**Figure 2.** Reconstructions 3D des réseaux de galeries pour *A. icterica* pour le sol témoin (1<sup>ère</sup> colonne), le sol pollué à 0,1 (2<sup>ème</sup> colonne) et à 0,5 ppm d'imidaclopride (3<sup>ème</sup> colonne). Les couleurs sont utilisées pour le rendu 3D (jaune au premier plan et bleu en arrière plan).

Différentes conclusions peuvent être tirées de cette seconde expérience :

- (i) nous confirmons en conditions plus réalistes l'effet possible de certains pesticides sur le comportement excavateur des vers (même si, cette fois encore, la pollution homogène du sol n'est pas réaliste) pour des concentrations que l'on peut observer dans l'environnement ;
- (ii) nous avons démontré, en conditions expérimentales, que ces effets pouvaient modifier certaines propriétés du sol (transfert gazeux).
- (iii) les réductions (en pourcentage) concernant la longueur des réseaux de galeries suite à la présence d'imidaclopride sont très similaires en 2D et en 3D.

La pertinence de ces observations reste à démontrer en conditions naturelles.

Une dernière remarque s'impose. Il est évident que les expériences utilisant les colonnes de sol et la tomographie sont lourdes et coûteuses et ne peuvent donc pas être généralisées ni proposées en routine (contrairement aux expériences en terrariums 2D). La solution vers laquelle nous nous sommes tournés consiste à développer, à partir de nos connaissances sur le comportement excavateur des vers, un modèle simulant ce comportement pour une communauté de vers dans un cube virtuel de 1 m<sup>3</sup>. Il nous est alors possible de simuler l'effet de la présence de pesticides sur ce comportement à l'échelle de la communauté. Un couplage avec un modèle d'écoulement (ou de diffusion gazeuse) serait une voie possible d'étude pour estimer les impacts de ces pesticides sur le fonctionnement du sol.

#### Références bibliographiques

- [1] Evans, 1947. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 11, 643-650.

## Une nouvelle méthode d'élevage larvaire *in vitro* pour tester les effets des pesticides sur le couvain d'abeille

P. Aupinel, D. Fortini, B. Michaud, J.-N. Tasei et J.-F. Odoux

INRA, Unité expérimentale d'Entomologie, Le Magneraud, BP 52, 17700 Surgères

### Introduction

Les directives européennes recommandent d'évaluer la toxicité des régulateurs de croissance sur couvain d'abeille. La méthode officielle utilisée [1] consiste à alimenter durant 24 h une ruche par un récipient contenant un litre de sirop contaminé par le produit à tester, puis à observer les effets du traitement sur le développement du couvain. L'influence des effets variables de l'environnement rend cette méthode peu reproductible. Le produit à tester peut ne pas être stocké au lieu d'être immédiatement consommé par les larves. L'apport de nectar par les butineuses peut diminuer sensiblement l'exposition au produit. Enfin, cette méthode ne permet pas de contrôler les quantités de produit ingérées par les larves. Pour ces raisons, l'élaboration de nouvelles méthodes, de préférence en laboratoire, s'est avérée nécessaire. Depuis une cinquantaine d'années, de nombreuses tentatives ont été réalisées [2-4]. Malheureusement, ces techniques se sont avérées peu fiables compte tenu des forts taux de mortalité observés sur les lots témoins non traités.

Les objectifs de ce travail sont de présenter :

- une nouvelle méthode standardisée d'élevage larvaire *in vitro*,
- l'illustration de ce test au travers de deux exemples d'insecticides : le diméthoate (famille des organophosphorés), le diflubenzuron (régulateur de croissance, inhibiteur de la chitine).

### Matériel et méthodes

La figure 1 illustre les principales opérations réalisées au cours d'un test larvaire *in vitro* [5,6].

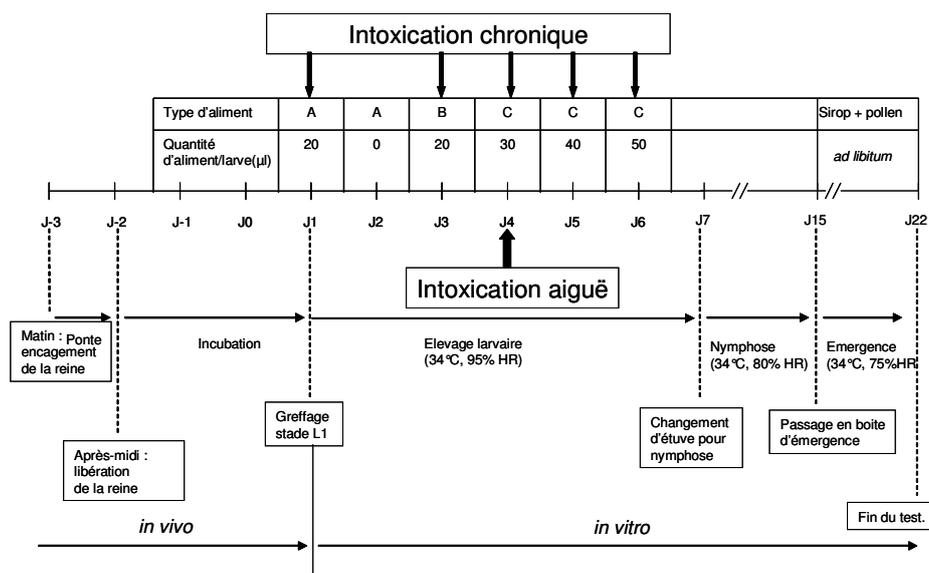


Figure 1. Schéma résumant les principales étapes du test *in vitro*.

Afin de disposer de jeunes larves homogènes, la reine est isolée sur un cadre vierge durant environ 30 heures. Au terme de cette étape, les jeunes larves sont transférées du cadre dans des cellules individuelles en plastique (greffage) ayant préalablement reçu 20 µL d'aliment. Elles sont ensuite placées en étuve durant 7 jours à 34 °C, et 96 % d'humidité relative. Les larves sont nourries une fois par jour suivant le protocole décrit dans la figure 1.

La composition des aliments varie selon l'âge des larves (Fig. 1, Tab. 1). Cette variation est caractérisée par une augmentation du taux de matière sèche due à une plus forte teneur en sucres et en extrait de levure. A J7, les prénymphe sont placées dans une boîte d'élevage destinée à recueillir les adultes émergents, à 37 °C et 75 % d'humidité relative. Cette technique parfaitement standardisée permet d'obtenir en routine des taux de mortalité témoin inférieurs à 10 %.

**Tableau 1.** Composition des différentes catégories d'aliments

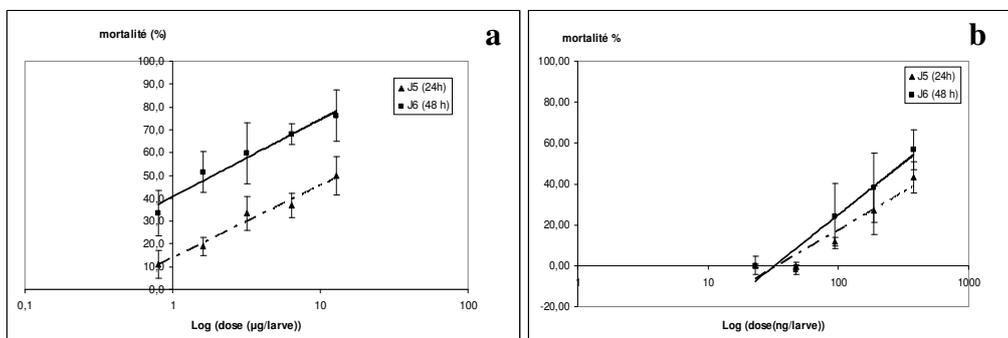
Aliment	A	B	C
Gelée royale %	50	50	50
Extrait de levure %	1	1,5	2
D-glucose %	6	7,5	9
D-fructose %	6	7,5	9
Matière sèche %	29,55	33,05	36,55

L'intoxication se fait par voie orale, le produit à tester étant mélangé à l'aliment. En intoxication aiguë, la totalité de la dose du produit est distribuée à J4. En intoxication chronique, les larves reçoivent chaque jour (excepté J2) un aliment contenant le produit à une concentration constante. Chaque dose ou concentration est testée sur trois échantillons de 48 larves, constitués à partir de trois ruches différentes. Un test comporte 5 doses ou concentrations du produit à tester, ainsi qu'un témoin sain. L'illustration de la méthode porte sur les deux modes d'exposition : aiguë (diméthoate, diflubenzuron) ou chronique (diméthoate).

## Résultats

### Intoxication aiguë

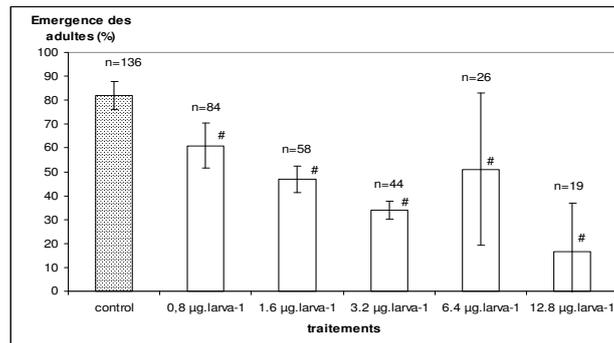
Pour les deux molécules, on observe une très nette relation dose-effet (Fig. 2). La linéarité de cette relation permet, dans une gamme appropriée de doses testées, de calculer les DL50 à partir des équations des droites de régression donnant les mortalités corrigées en fonction des valeurs logarithmiques des doses. Dans ce cas précis, on peut évaluer les DL50 à 48 h pour le diméthoate (1,9 µg/larve), et le diflubenzuron (310 ng/larve).



**Figure 2.** Mortalités larvaires ( $\bar{x} \pm S_d$ ) corrigées par la formule d'Abbott à J5 (24h) et J6 (48h) en fonction des doses de diméthoate (a) et de diflubenzuron (b) ingérées à J4.

En prolongeant l'observation au-delà du stade larvaire, cette méthode peut révéler des effets différés, par exemple sur le taux d'émergence des adultes (Fig. 3). Dans cet exemple, on observe un effet significatif de la plus faible dose de diméthoate

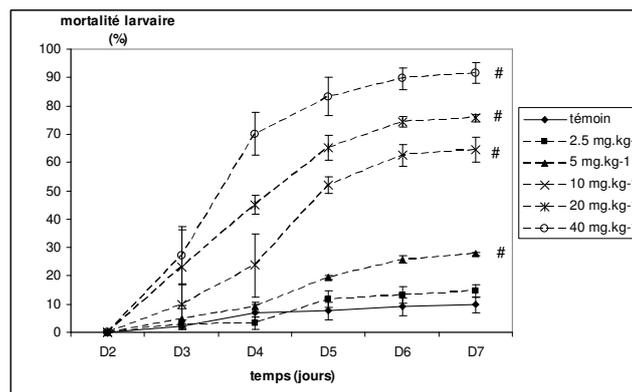
testée sur la mortalité nymphale (environ 40 %), alors que cette même dose produit seulement 10 % de mortalité larvaire 48h après ingestion.



**Figure 3.** Taux d'émergence des adultes en fonction de la dose de diméthoate ingérée par les larves à J4 (moyenne  $\pm$  S<sub>d</sub>).

### Intoxication chronique

Comme précédemment, on note une relation entre la dose de diméthoate ingérée par les larves en intoxication chronique, et la mortalité larvaire (Fig. 4). La mortalité moyenne des témoins est de 9 % après 7 jours d'élevage, et ne diffère pas significativement de la mortalité observée pour une concentration de 2,5 mg/kg d'aliment (2500 ppb). Cette valeur détermine une NOAEC (*Non Observed Adverse Effect Concentration*) pour la mortalité larvaire à 7 jours.



**Figure 4.** Évolution de la mortalité larvaire en fonction de différentes doses de diméthoate en intoxication chronique (moyenne  $\pm$  S<sub>d</sub>). # : écart significatif par rapport au témoin, test Khi2.

### Conclusion

Cette nouvelle technique offre de multiples avantages. En premier lieu, elle s'affranchit de toute influence aléatoire liée à l'environnement et de ce fait s'avère facilement reproductible. La standardisation et la relative simplification des manipulations la rend relativement accessible et donc intégrable dans les procédures d'évaluation du risque. Enfin, seule cette méthode permet avec une grande précision le contrôle des quantités d'aliment et donc de matière active ingérée par les larves. Nous avons récemment amélioré les conditions de nymphose, ce qui se traduit par l'obtention d'adultes en nombre important (pertes inférieures à 10 %). Des vérifications portant sur certaines caractéristiques anatomiques (présence de corbeilles) ainsi que certaines fonctionnalités physiologiques (fonctionnement des glandes cirières, développement des glandes hypo pharyngiennes) et comportementales (regroupement autour d'un diffuseur de phéromone royale) propres aux ouvrières nous permettent d'affirmer que les individus produits relèvent tous de cette caste. Cette nouvelle étape ouvre des perspectives intéressantes

concernant l'évaluation des effets différés après une exposition larvaire. Cette méthode permettait déjà d'apprécier ces effets sur l'aptitude à la métamorphose. Nous avons maintenant la possibilité de tester la survie des adultes produits, mais également il devient possible d'évaluer des effets sublétaux, notamment au travers de tests sur le comportement.

**Références bibliographiques**

- [1] Oomen *et al.*, 1992. *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin* 22, 613-616.
- [2] Malone *et al.*, 2002. *Apidologie* 33, 447-458.
- [3] Vandenberg & Shimanuki, 1987. *J. Apicult. Res.* 26, 90-97.
- [4] Weaver, 1955. *Science* 121, 509-510.
- [5] Aupinel *et al.*, 2005. *Bull. Insectol.* 58, 107-111.
- [6] Aupinel *et al.*, 2006. *Pest mgmt Sci.* (sous presse).

## Effets sublétaux du fipronil sur l'orientation de l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) dans un labyrinthe complexe

A. Decourtye<sup>1</sup>, S. Lefort<sup>1</sup>, J. Devillers<sup>2</sup>, M. Gauthier<sup>3</sup>, M. Tisseur<sup>1</sup> et P. Aupinel<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ACTA, 1 avenue C. Bourgelat, 69280 Marcy l'Étoile

<sup>2</sup> CTIS, 3 chemin de la gravière, 69140 Rillieux La Pape

<sup>3</sup> Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse

<sup>4</sup> INRA, Unité expérimentale d'Entomologie, Le Magneraud, BP 52, 17700 Surgères

### Introduction

La mortalité est le principal paramètre considéré lors de l'évaluation de la toxicité d'un produit phytopharmaceutique chez l'abeille domestique [1]. Pourtant, les effets biologiques de pesticides ne se limitent pas à l'augmentation de la mortalité dans la population. Les interrogations survenues après la mise sur le marché d'insecticides illustrent la nécessité de prendre en considération les effets sublétaux, et tout particulièrement des effets comportementaux dont l'identification requiert des méthodologies spécifiques et complémentaires. Par exemple, le test d'extension du proboscis a été récemment développé pour mettre en évidence les effets sublétaux des pesticides sur l'apprentissage de l'abeille [2]. Réalisé en laboratoire, cet essai ne permet pourtant pas de révéler l'ensemble des effets sublétaux susceptibles d'affecter les différentes composantes du comportement de butinage, telles que les systèmes d'orientation. Dans ce contexte, nous avons étudié les effets du fipronil sur les capacités des butineuses à s'orienter dans un labyrinthe en suivant un repère visuel préalablement appris.

### Matériels et méthodes

#### *Dispositif expérimental*

Le dispositif conçu à partir du labyrinthe de Zhang *et al.* [3] était constitué d'un assemblage de 20 cubes dont chaque face verticale a été percée en son milieu d'un trou de 4 cm de diamètre dans lequel les butineuses en vol passent pour évoluer dans le labyrinthe. La butineuse pénétrant dans le labyrinthe doit parcourir en vol un trajet prédéterminé par l'expérimentateur, en passant de cube en cube, par les trous marqués d'une tache verte (environ 4 × 4 cm, placé sous le trou). Cette tache verte constitue un indice visuel qui indique à l'abeille le trajet à suivre. A la fin du parcours, l'abeille arrive dans la boîte d'alimentation. Pour cela, la butineuse doit voler à travers les cubes qui sont de deux types : (1) « les cubes de non décision », où seuls deux trous sont accessibles, celui par lequel la butineuse arrive et celui marqué par la tache verte indiquant le trajet correct ; (2) « les cubes de décision », où la butineuse arrivant par un trou a le choix entre un trou marqué (trajet correct) et un trou non marqué qui aboutit à une voie sans issue (trajet incorrect).

Un parcours comprend 6 « cubes de non décision » et 3 « cubes de décision ». Un parcours d'entraînement et 5 parcours de tests différents ont été effectués. Quelque soit le parcours utilisé (entraînement, test, ligne de base), une marque verte a toujours été présente à l'entrée du labyrinthe.

### *Matériel biologique*

Une colonie d'abeilles a été placée dans la cage. La colonie était constituée d'une reine fécondée, âgée d'un an, et d'environ 10000 ouvrières. Un site d'alimentation comprenant un nourrisseur à solution sucrée (sucre cristallisé/eau à 50 % m/m), un nourrisseur à pollen (multi-floral) a été placé à 1,5 m en face de la colonie. A proximité immédiate du nourrisseur à sirop a été placée une marque verte afin que les butineuses se familiarisent avec ce signal visuel et l'associent avec la présence de la nourriture. L'expérimentation a été réalisée à deux reprises, de manière successive, avec deux colonies homogènes, issues du même élevage.

### *Traitement*

Le traitement a consisté à contaminer la solution sucrée (eau/sucre cristallisé 50 % m/m) avec du fipronil à la concentration de  $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de fipronil<sup>3</sup> (98 % de pureté). L'expérimentation a duré pendant 3 semaines. Seul le nourrisseur placé à l'extérieur du labyrinthe a reçu le sirop contaminé. A chaque semaine correspond une période d'alimentation différente : (1) tout d'abord, une alimentation avec une solution sucrée non contaminée (période avant traitement), (2) puis une alimentation contaminée, soit 1,2 litre de solution sucrée contenant  $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de fipronil, administré durant 2 jours (période pendant traitement), (3) et enfin, de nouveau une alimentation non contaminée (période après traitement).

### *Démarche expérimentale*

Phase d'entraînement et de marquage : Dans un parcours passant par 9 cubes dont 3 cubes de décision, l'entraînement des butineuses a consisté à familiariser les butineuses au labyrinthe. Pour cela, le nourrisseur à sirop (sucre cristallisé/eau à 50 % m/m, non contaminé), délivrant la récompense alimentaire, a été reculé progressivement dans le labyrinthe en débutant dans le cube d'entrée et en finissant dans la boîte d'alimentation. Ensuite, une centaine de butineuses capturées dans la boîte d'alimentation ont été marquées individuellement à l'aide de pastilles colorées et numérotées. Immédiatement après leur marquage, les butineuses ont été relâchées dans la cage.

Phase de tests : Les 5 parcours de test ont été différents les uns des autres mais ont toujours comporté 9 cubes dont 3 de décision. Le lendemain du jour de marquage des individus, nous avons débuté les tests. Dès qu'une butineuse a pénétré dans le labyrinthe, son parcours a été observé et chronométré. L'entrée du labyrinthe a été fermée pour éviter la présence simultanée de plusieurs abeilles. Les tests ont été réalisés durant 3 à 4 h par jour et cela durant 3 à 4 jours successifs. Avant chaque changement de parcours, le labyrinthe a été nettoyé à l'éthanol afin d'éviter la présence d'éventuelles traces olfactives.

Les deux phases détaillées précédemment ont été réalisées avant, pendant, et après le traitement. La répétition de la phase d'entraînement et de marquage a permis, pour une même colonie, de renouveler totalement les butineuses observées. Ainsi, les performances enregistrées lors des 3 périodes (avant, pendant et après traitement) ont été obtenues avec des butineuses différentes.

### *Analyse des données*

Chaque butineuse testée a été considérée une seule fois dans l'exploitation des données, ses parcours suivants étant alors censurés. Pour chaque butineuse volant dans le labyrinthe, nous avons classé ses performances selon 4 classes :

- Classe 1 : la butineuse atteint le nourrisseur en moins de 5 min, de manière directe, sans faire de retour en arrière, ni même d'erreur,
- Classe 2 : la butineuse atteint le nourrisseur en moins de 5 min mais en faisant un ou plusieurs retours en arrière,
- Classe 3 : la butineuse atteint le nourrisseur en moins de 5 min mais en faisant une ou plusieurs erreurs de parcours (mauvais choix dans un cube de décision),

<sup>3</sup> Concentration quantifiée par analyses chimiques HPLC-MS (GIRPA, Angers).

- Classe 4 : la butineuse n'atteint pas le nourrisseur durant les 5 min imparties. Pour les butineuses des classes 1 à 3, nous avons chronométré le temps nécessaire à celle-ci pour atteindre la boîte d'alimentation. Les nombres de butineuses inscrits dans chaque classe de performances ont été comparés par un test non paramétrique de Mann-Whitney à 1 ddl ( $P < 0,025$ ) selon : la répétition, le parcours utilisé et la période (avant, pendant et après traitement). Le même test statistique a été utilisé pour comparer les temps de parcours des butineuses selon la période. Lorsque des comparaisons deux à deux ont été réalisées, le seuil de signification a été corrigé par la méthode de Dunn-Sidak<sup>4</sup> (Sokal et Rohlf, 1995), soit  $P < 0,0063$ .

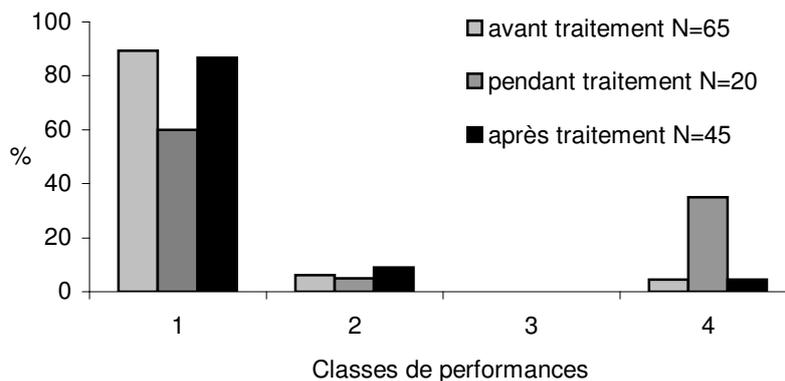
## Résultats

Le taux de butineuses pénétrant dans le labyrinthe, et donc répondant à la marque verte placée à l'entrée, a été largement réduit chez les individus traités (16 % pendant le traitement *versus* 34 et 41 % avant et après traitement, respectivement).

Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les performances obtenues lors des deux expérimentations ( $P > 0,025$ ). De même, le type de parcours utilisé pour le test n'a pas d'influence sur les performances ( $P > 0,025$ ).

Les proportions de butineuses réparties selon les classes de performances d'orientation ont été d'un niveau très élevé et équivalentes avant et après le traitement ( $P = 0,33$ ). En dehors de la période de traitement, près de 90 % des butineuses ont parcouru le labyrinthe de manière directe, sans faire de retour en arrière, ni même d'erreur (Fig. 1). Lors de la période de traitement avec le fipronil à  $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , le taux de butineuses traitées parcourant sans fautes le labyrinthe a chuté à 60 %. Parallèlement, le taux de butineuses n'atteignant pas le nourrisseur dans les 5 minutes imparties fût élevé (35 % contre 4 % avant et après le traitement). Les performances d'orientation lors de l'administration du fipronil ont été significativement différentes de celles mesurées avant ( $P = 0,0008$ ) et après ( $P = 0,004$ ).

Le fipronil a augmenté significativement le temps de vol dans le labyrinthe ( $P < 0,0125$ ). Chez les butineuses réussissant à parcourir la totalité du parcours, le temps moyen de parcours a été respectivement de 59 et 40 s avant et après le traitement, alors qu'il a été de 96 s lors du traitement.



**Figure 1.** Butineuses classées selon leur performance.

## Discussion

Nous avons utilisé pour la première fois un dispositif de labyrinthe complexe afin de rechercher les effets sublétaux d'un pesticide chez l'abeille. Le principe a consisté à enregistrer les performances de butineuses traitées ou non qui doivent s'orienter dans le labyrinthe en fonction d'un repère visuel préalablement appris. Les performances d'orientation des abeilles non traitées ont été très élevées et

<sup>4</sup>  $\alpha' = 1 - (1 - \alpha)^{1/k}$ , où k est le nombre de comparaisons.

répétables. Nous avons observé des effets sublétaux du fipronil des butineuses à une concentration très faible, déterminée par analyses chimiques à  $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . Lors du traitement, un grand nombre d'abeilles ne parviennent pas à s'orienter dans le labyrinthe et celles réussissant à réaliser le parcours le font beaucoup plus lentement que les abeilles non traitées. Puisque dans le dispositif utilisé, les performances d'orientation d'une butineuse reposent au préalable sur l'association entre un signal visuel et la récompense alimentaire, nous pouvons supposer que le fipronil affecte les capacités d'apprentissage visuel. Mais le produit semble également induire des effets négatifs sur la locomotion en vol de la butineuse.

#### Références bibliographiques

- [1] Devillers, 2002. Acute toxicity of pesticides to honey bees. *In: Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals* (Devillers J., Pham-Delègue M.H. eds). Taylor and Francis, London, 56-66.
- [2] Decourtye *et al.*, 2005. Toxicité et risques liés à l'emploi de pesticides chez les pollinisateurs : cas de l'abeille domestique. *In: Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement au XXI<sup>e</sup> siècle* (C. Regnault-Roger ed.), Tec et Doc Lavoisier, Paris, 283-299.
- [3] Zhang *et al.*, 1996. *Neurobiol. Learn. Mem.* 66, 267-282.

## Effets d'un herbicide sur la relation prédateur-proie entre le têtard de grenouille rousse (*Rana temporaria*) et la larve de salamandre tachetée (*Salamandra salamandra*)

A.-L. Mandrillon et P. Saglio

INRA, UMR EQHC, Écobiologie et Qualité des Hydrosystèmes Continentaux, 65 rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes Cedex

### Introduction

Dans la nature, les larves d'amphibiens sont soumises à une multitude de stress environnementaux. Ceux-ci peuvent être d'origine biotiques (compétiteurs, prédateurs, organismes pathogènes, etc.) ou abiotiques (polluants, rayonnement ultraviolet, pH, etc.). Dans la majorité des cas, ces différents facteurs de risque n'opèrent pas indépendamment, mais interagissent pour induire des effets combinés sur les organismes et les écosystèmes. En dépit de cette réalité, les études en écologie et écotoxicologie aquatiques ont été principalement centrées sur les effets de stress uniques. Afin de mieux comprendre la réponse des organismes et des communautés aux agressions environnementales, il est donc nécessaire de développer une approche multifactorielle permettant de rendre compte des effets conjugués de stress multiples.

Les organismes aquatiques peuvent être soumis à deux types de risques majeurs : l'un, naturel, lié à la présence de prédateurs, et l'autre, anthropique, lié à la contamination du milieu par des polluants. Des études récentes relatives aux interactions potentielles entre les effets de ces deux types de stress chez les amphibiens ont montré que les polluants pouvaient augmenter la vulnérabilité à la prédation [1,2], altérer les comportements anti-prédateurs [3] ou réduire l'aptitude prédatrice [4,5]. A l'inverse, la présence d'un risque de prédation peut augmenter la toxicité du polluant pour les proies [6-9].

L'objectif de cette étude est d'examiner les effets d'un herbicide sur la relation prédateur-proie entre des têtards de grenouille rousse (*Rana temporaria*) et des larves de salamandre tachetée (*Salamandra salamandra*). Les larves d'amphibiens constituent un modèle idéal pour conduire ce type d'expériences car elles présentent une importante plasticité phénotypique en réponse au risque de prédation, et peuvent être très vulnérables à la menace des pesticides. Dans cette étude, nous avons choisi d'étudier l'amtrole, un herbicide non sélectif, pouvant contaminer les milieux aquatiques par voie directe, lorsqu'il est utilisé pour traiter les adventices aquatiques, ou indirecte, *via* un écoulement depuis les terrains agricoles traités.

### Matériels et méthodes

*Protocole expérimental* - Des œufs de grenouille rousse et des larves de salamandre tachetée ont été collectés dans des mares temporaires à proximité de Rennes. Quinze jours après l'éclosion, des groupes de quinze têtards (stade de Gosner 25 ; [10]) ont été exposés pendant trois jours à cinq concentrations sublétales en amtrole (0, 0,01, 0,1, 1 et 10 mg L<sup>-1</sup>) en l'absence ou en présence d'une larve de salamandre. Les deux concentrations en herbicide les plus basses peuvent être détectées dans les eaux superficielles se trouvant à proximité de terrains agricoles traités. La concentration de 1 mg L<sup>-1</sup> peut être atteinte lorsque l'amtrole est utilisé contre les adventices aquatiques. Enfin, la concentration de 10 mg L<sup>-1</sup> est supérieure aux

niveaux environnementaux pouvant être observés [11], mais demeure toutefois très inférieure à la valeur de  $CL_{50,96h}$  documentée chez une larve d'amphibien anoure (3 g L<sup>-1</sup> chez *Ade lotus brebis* ; [12]).

*Variables mesurées* - Le comportement des têtards a été suivi quotidiennement à 10 et 16 h. Les observations, conduites au cours de sessions de trois minutes, consistaient à dénombrer les têtards visibles (hors d'une litière de feuilles mortes) et actifs toutes les 30 secondes. Après trois jours d'exposition, l'efficacité de prédation des larves de salamandre a été évaluée en dénombrant les têtards survivants dans chaque aquarium.

## Résultats

*Pourcentages de têtards visibles* – En l'absence de larve de salamandre, les têtards exposés à 0,01, 0,1 et 1 mg L<sup>-1</sup> d'amtrole sont significativement moins visibles que les têtards témoins. Ces différences n'apparaissent plus en présence du prédateur. De plus, pour chacune des concentrations en herbicide, les pourcentages de têtards visibles sont similaires, que le prédateur soit présent ou absent.

*Pourcentages de têtards actifs* – En l'absence de larve de salamandre, des réductions d'activité sont observées au cours des trois jours d'expérience chez les individus exposés à 0,01 mg L<sup>-1</sup> d'amtrole, et lors du deuxième jour chez ceux exposés à 0,01, 0,1 et 1 mg L<sup>-1</sup>. En présence du prédateur, ces différences n'apparaissent plus, avec pour seule exception une augmentation d'activité le premier jour chez les individus exposés à 10 mg L<sup>-1</sup>. Les têtards témoins sont les seuls à présenter une réduction d'activité en réponse à la larve de salamandre. En effet, les individus exposés aux quatre concentrations en amtrole présentent des niveaux d'activité similaire que le prédateur soit présent ou absent.

*Pourcentages de têtards survivants* – En l'absence de larve de salamandre, les taux de survie ne diffèrent pas entre les différents groupes de têtards : tous les individus survivent quelle que soit la concentration en amtrole à laquelle ils ont été exposés. La présence du prédateur conduit à une réduction significative du taux de survie chez tous les lots de têtards. Les têtards exposés à 0,01 et 0,1 mg L<sup>-1</sup> d'amtrole présentent des taux de survie en présence du prédateur similaires à ceux des témoins. En revanche, les individus exposés à 1 et 10 mg L<sup>-1</sup> présentent des taux de survie significativement plus élevés que les individus témoins. De plus, il est à noter que l'augmentation de survie en présence de l'amtrole est concentration-dépendante.

## Discussion

Les résultats de cette étude montrent qu'une contamination du milieu aquatique par des concentrations sublétales en amtrole peut affecter la relation prédateur-proie entre les têtards de grenouille rousse et les larves de salamandre tachetée, en altérant les comportements anti-prédateurs des têtards et en réduisant l'efficacité de prédation des salamandres.

En l'absence du prédateur, les têtards exposés à l'herbicide (0,01, 0,1 et 1 mg L<sup>-1</sup>) sont moins visibles, et utilisent davantage la zone refuge constituée par la litière de feuilles mortes, que les têtards témoins. Des diminutions d'activité sont également notées tout au long de l'expérience chez les individus exposés à 0,01 mg L<sup>-1</sup>, et le deuxième jour de l'expérience chez ceux exposés à 0,1 et 1 mg L<sup>-1</sup>. Dans la nature, de tels effets de l'herbicide pourraient s'avérer néfastes pour les têtards. En effet, en l'absence de risque de prédation, les têtards devraient maximiser leur activité d'exploration trophique du milieu, en passant moins de temps en zone refuge, et en étant davantage actifs. En se comportant de la manière opposée, les individus exposés à l'amtrole risquent de ne pas acquérir les ressources énergétiques nécessaires pour atteindre une taille-refuge vis-à-vis des

prédateurs à ouverture de bouche réduite (ex. larve de salamandre) ou pour se métamorphoser avant l'assèchement de l'habitat temporaire. En présence du prédateur, la fréquentation du refuge est la même entre les individus contrôles et ceux exposés à l'amtrole. De plus, le premier jour de l'expérience, les têtards exposés à 10 mg L<sup>-1</sup> d'amtrole sont significativement plus actifs que les témoins. Un tel effet de l'amtrole peut être très désavantageux pour les têtards dans la mesure où il augmente leur probabilité d'être détectés ou de rencontrer le prédateur.

Les têtards témoins répondent à la présence de la salamandre par une réduction d'activité, un mécanisme anti-prédateur connu, mais n'altèrent pas leur fréquentation du refuge. Les larves de salamandre chassent dans la litière de feuilles mortes en utilisant deux stratégies. L'une consiste à attendre qu'un têtard passe à proximité pour l'attaquer brusquement. L'autre met en jeu la détection d'un têtard et l'approche progressive de celui-ci. Dans les deux cas, une stratégie anti-prédatrice consistant à se réfugier dans la litière de feuilles mortes ne constitue pas *a priori* un moyen de défense efficace puisqu'il s'agit du terrain de chasse privilégié du prédateur. Contrairement aux têtards témoins, les individus exposés à l'amtrole ne mettent en jeu aucun mécanisme comportemental en réponse à la larve de salamandre. Un tel effet de l'amtrole, altérant les comportements anti-prédateurs des têtards, peut augmenter leur vulnérabilité à la prédation.

Toutefois, en dépit de leurs défenses altérées, les têtards exposés à l'amtrole ne souffrent pas plus de la prédation par les larves de salamandre que les têtards non exposés. Au contraire, les individus exposés aux deux concentrations en herbicide les plus élevées (1 et 10 mg L<sup>-1</sup>) bénéficient même d'une survie accrue par rapport aux témoins. Il semblerait donc que l'amtrole, à ces concentrations, nuise à l'efficacité de prédation des larves de salamandre, et libère les têtards du risque que représente la présence de ce prédateur.

#### Références bibliographiques

- [1] Verrell, 2000. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 85-92.
- [2] Broomhall, 2002. *Aquat. Toxicol.* 61, 243-250.
- [3] Bridges, 1999. *J. Herpetology* 33, 303-306.
- [4] Boone & Semlitsch 2003. *Oecologia* 137, 610-616
- [5] Mills & Semlitsch 2004. *Ecol. Appl.* 14, 1041-1054
- [6] Relyea & Mills, 2001. *PNAS* 98, 2491-2496.
- [7] Relyea, 2003. *Ecol. Appl.* 13, 1515-1521.
- [8] Relyea, 2004. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1080-1084.
- [9] Relyea, 2005. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 351-357.
- [10] Gosner, 1960. *Herpetologica* 16, 183-190.
- [11] World Health Organisation 1994. Amitrole Health and Safety Guide. International Program on Chemical Safety. Health and Safety Guide 85.
- [12] Johnson, 1976. *Zool. J. Linn. Soc.* 59, 79-83.

## Session 3

### **Effets sur les populations : approches dynamiques et génétiques**



## Évaluation expérimentale *in situ* des effets de produits de démoustication sur les populations de daphnies dans les zones humides littorales atlantiques et méditerranéennes

C. Duchet<sup>1,2</sup>, E. Franquet<sup>3</sup>, C. Lagneau<sup>1</sup> et L. Lagadic<sup>2</sup>

<sup>1</sup>EID Méditerranée, 165 avenue Paul Rimbaud, 34184 Montpellier Cedex 4

<sup>2</sup>INRA, UMR EQHC, Écologie et Qualité des Hydrosystèmes Continentaux, 65 rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes Cedex

<sup>3</sup>Institut Méditerranéen d'Écologie et de Paléoécologie, Université Aix-Marseille III, Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille Cedex 20

### Introduction

Les zones humides, patrimoine naturel remarquable en raison de leur richesse biologique et des importantes fonctions naturelles qu'elles remplissent (régulation du régime des eaux, auto-épuration des cours d'eau, réservoirs biologiques, etc.), font l'objet de traitements anticulicidiens. Mais l'utilisation d'insecticides dans les écosystèmes aquatiques naturels peut avoir des répercussions sur la biodiversité des peuplements d'invertébrés même si le souci du moindre impact écologique incite à utiliser en priorité les insecticides plus sélectifs et moins rémanents. Il apparaît dès lors indispensable d'évaluer le risque écotoxicologique lié à leur utilisation. Or les tests d'écotoxicité réalisés en laboratoire ne peuvent suffire à eux seuls à cette évaluation tant les conditions du milieu où ils sont appliqués peuvent influencer leur biodisponibilité et leur toxicité. L'évaluation du risque pour les écosystèmes nécessite donc de mettre en œuvre des approches *in situ*, dans les milieux faisant l'objet de campagnes de démoustication.

Dans ce contexte, un projet de recherche, soutenu dans le cadre du PNETOX, s'inscrit précisément dans le cadre du développement d'une approche intégrée de l'évaluation du risque écotoxicologique de produits de démoustication en France métropolitaine, approche basée sur la combinaison de méthodes d'analyse des effets dans des conditions de complexité biologique croissante, allant jusqu'aux écosystèmes naturels (changement d'échelle d'observation des effets entre niveaux d'organisation biologique : individu – population – communauté).

L'étude présentée ici concerne les expérimentations à l'échelle de la population *in situ* menées dans des milieux différents (en zones humides atlantiques et en zones humides méditerranéennes) à différentes saisons (hiver et été) afin de confronter la méthodologie employée pour évaluer les effets de deux larvicides à mode d'action différent, le *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* (*Bti*) et le diflubenzuron.

### Matériels et méthodes

Deux larvicides ont été retenus pour cette étude : le *Bti*, un insecticide d'origine biologique qui agit par ingestion, et le diflubenzuron, un insecticide de synthèse de la famille des inhibiteurs de croissance, qui agit par contact et ingestion. Le modèle biologique étudié, des cladocères du genre *Daphnia*, a été choisi en fonction du mode d'action des larvicides et pour leur sensibilité soupçonnée vis-à-vis de ces produits.

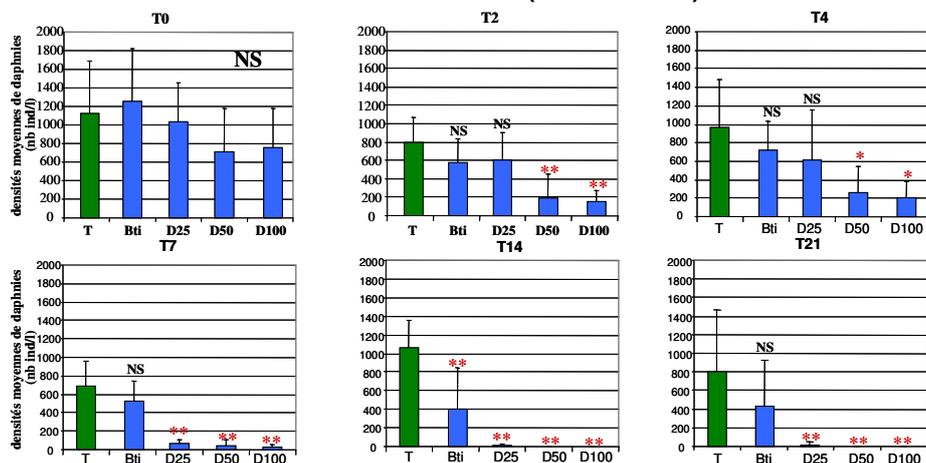
Le même protocole expérimental est appliqué en zones humides littorales méditerranéennes et atlantiques. Trente microcosmes en plexiglas (50 x 50 x 50 cm) sont placés dans un marais à submersion temporaire puis sont traités avec

du Dimilin® WP 25 (diflubenzuron) à 25, 50 et 100 g/ha ou avec du Vectobac® 12 AS (*Bti*) à 0,8 l/ha. Chaque concentration et le témoin (microcosmes non traités) sont répliqués 6 fois. Les daphnies sont collectées lors de 6 campagnes de prélèvements (avant traitement et 2, 4, 7, 14 et 21 jours après le traitement). Les températures de l'air et de l'eau, la hauteur d'eau, le pH, la conductivité, la salinité, l'oxygène dissous, la concentration en chlorophylle *a*, la teneur en matières en suspension et la concentration de diflubenzuron sont mesurés dans les microcosmes lors des prélèvements des organismes. Les effets des larvicides sur les populations de *Daphnia* sp. sont évalués grâce à l'analyse de l'abondance et de la structure de taille.

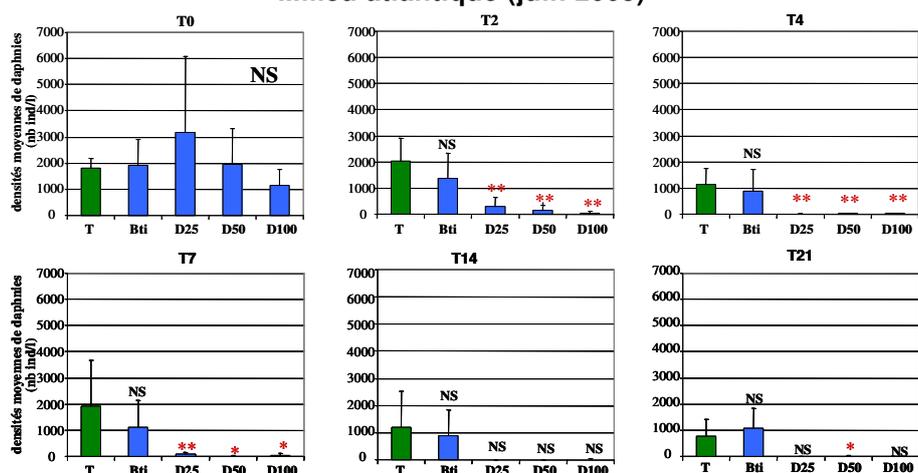
## Résultats – Discussion

Globalement, les tests statistiques ont montré une bonne homogénéité entre les plots pour les facteurs du milieu mesurés. Les paramètres environnementaux suivis ne présentent pas de différences significatives entre les plots avant et après traitement. Cependant, durant les deux expérimentations, la hauteur d'eau diminue et la concentration en chlorophylle *a* augmente dans tous les plots.

### Milieu méditerranéen (février 2004)



### Milieu atlantique (juin 2005)



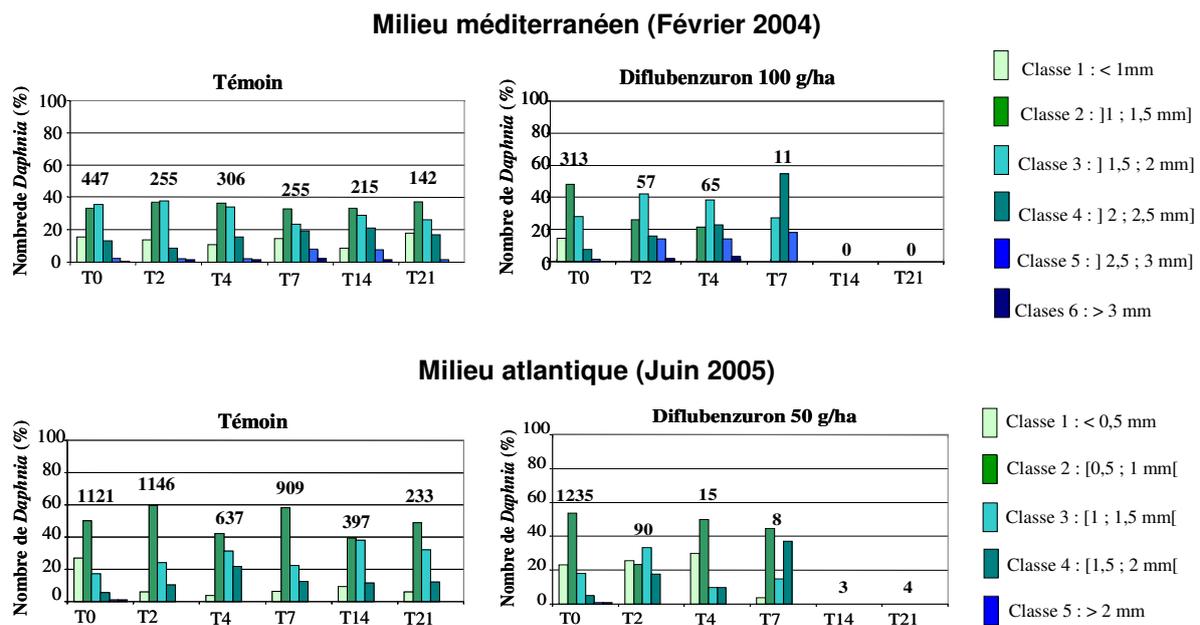
**Figure 1.** Évolution des densités moyennes de daphnies en milieu méditerranéen et en milieu atlantique. T = témoin ; Bti = traité au Bti (0,8 l/ha) ; D25, D50 et D100 = traité au diflubenzuron (25, 50 et 100 g/ha). NS = non significatif ( $p > 0,05$ ) ; \* : significatif ( $p < 0,05$ ) ; \*\* : hautement significatif ( $p < 0,01$ ).

Une analyse de la variance suivie d'un test de Newman-Keuls ont été utilisés pour mettre en évidence les éventuelles différences de densité de daphnies entre les différents traitements (Fig. 1).

Dans les deux cas, les microcosmes traités au *Bti* ne présentent pas de différences avec les microcosmes témoins sauf 15 jours après le traitement en février 2004, cette différence pouvant s'expliquer par l'importante variabilité observée dans la série traitée au *Bti*. En février, les microcosmes traités au diflubenzuron à 25 g/ha ne présentent pas de différences significatives avec le témoin une semaine après le traitement, alors que les microcosmes traités au diflubenzuron à 50 et 100 g/ha présentent des différences significatives avec le témoin 2 jours après le traitement. En revanche, en juin, les microcosmes traités au diflubenzuron à 25, 50 et 100 g/ha présentent des différences significatives avec la série témoin à partir de 2 jours après le traitement.

La mesure de la taille de chaque individu a permis d'observer l'évolution de la structure de taille des daphnies en fonction du traitement et au cours du temps. Cette étude a mis en évidence des structures identiques entre les microcosmes témoins et les microcosmes traités au *Bti* que ce soit en hiver en milieu méditerranéen ou en été en milieu atlantique.

L'étude menée en hiver a permis de voir que les jeunes daphnies étaient plus sensibles au diflubenzuron et disparaissaient les premières. En revanche, l'étude menée l'été a montré des effets du diflubenzuron sur toutes les classes de tailles (Fig. 2).



**Figure 2.** Évolution de la structure de taille de *Daphnia* sp. en milieu méditerranéen (février 2004) et atlantique (juin 2005).

## Conclusions

Les deux expérimentations menées dans des milieux différents et à des saisons différentes ont permis de montrer des différences de toxicité entre le *Bti* et le diflubenzuron. Elles ont également mis en évidence des différences d'action du diflubenzuron selon la température du milieu. Enfin, l'étude en hiver a permis de déceler des différences de sensibilité selon l'âge des organismes. Il serait donc intéressant de mener une nouvelle fois cette expérimentation sur les mêmes sites mais à des saisons différentes afin de confirmer ces observations.

## Évaluation des effets des polluants chimiques sur la dynamique de population d'un poisson, la gambusie (*Gambusia holbrooki*), en écosystème expérimental : Élaboration d'un modèle basé sur les individus pour aider à la prise de décision

R. Beaudouin<sup>1</sup>, V. Ginot<sup>2</sup> et G. Monod<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA SCRIBE, Station Commune de Recherche en Ichtyophysiologie, Biodiversité et Environnement, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex

<sup>2</sup>INRA, Unité de Biométrie, Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9

### Introduction

Chez le poisson, l'évaluation expérimentale du danger des polluants chimiques a reposé jusqu'à présent principalement sur des études au niveau des performances individuelles. Or, l'extrapolation des effets sur les individus aux effets sur la population n'est pas simple. Il serait donc souhaitable de pouvoir expérimenter au niveau de la population. Mais, le nombre d'espèces de poissons pouvant être étudiées au niveau populationnel en condition expérimentale est très limité, en raison de la relative petite taille des écosystèmes expérimentaux (microcosmes) pouvant être mis en œuvre. La gambusie (*Gambusia holbrooki*) est un bon candidat pour ce type d'étude. Cependant, les expériences préliminaires menées dans notre laboratoire [1,2] ont montré qu'il existait une grande variabilité entre les populations témoins d'une même expérience. Or, les expériences en microcosme ne permettent la mise en œuvre que d'un nombre limité de réplicats. Ceci peut constituer une limite importante à l'interprétation des résultats du fait de la faible puissance, au sens statistique, des comparaisons entre un petit nombre fortement bruité de populations témoins et de populations exposées. Il est donc déterminant d'améliorer la puissance statistique des expériences.

Une piste possible pour répondre à cet enjeu pourrait être de compléter les données témoins réelles en simulant à l'aide d'un modèle probabiliste, l'ensemble des populations attendues en conditions témoins. Ceci devrait permettre de déterminer la probabilité que les populations exposées au polluant appartiennent à la distribution des populations témoins avec un faible risque de faux négatif.

L'objectif de cette étude a été de mettre au point un modèle probabiliste de la dynamique de population de la gambusie et de l'utiliser dans des études de cas pour évaluer la pertinence de la démarche. Une modélisation de type individu centré a été choisie car nous voulons simuler de façon réaliste la distribution de taille des individus des populations.

### Matériels et Méthodes

Le modèle individu centré a été réalisé à l'aide de la plateforme de modélisation Mobydyc [3] mise au point à l'Unité de Biométrie (INRA, Avignon). Le modèle décrit la croissance, la survie et la reproduction des poissons en distinguant trois types d'agents : juvéniles, mâles et femelles. Les principales variables environnementales qui agissent sur le cycle vital de la gambusie et le cycle reproducteur, température de l'eau et photopériode, sont les mêmes pour les simulations réalisées par le modèle que pour les expériences réelles. Les sorties descriptives des populations fournies

par le modèle sont identiques à celles disponibles sur les populations réelles : effectif des différentes classes d'individus, sex-ratio et distribution de taille des individus d'une population.

Par conséquent, nous devons comparer deux types de sorties entre les populations réelles et simulées : des sorties scalaires (effectifs et sex-ratio ; Fig. 1) et des sorties de type distribution (distribution de taille des individus d'une population). Pour ces deux types de sorties, nous avons développé des méthodes statistiques pour évaluer si les réalisations d'une variable des populations réelles sont des événements probables de la distribution de cette variable simulée par le modèle. Pour les sorties de type scalaire nous avons développé un test de vraisemblance des valeurs observées par rapport à celles simulées. Pour les sorties de type distribution, un test basé sur la somme des écarts au carré calculée entre les classes de taille des populations simulées et celles des populations observées a été développé. La puissance statistique des deux tests a été explorée par simulation.

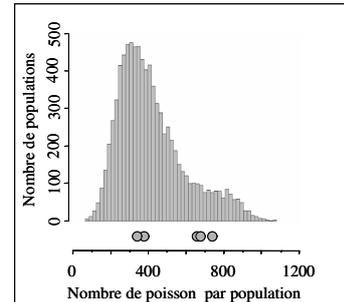


Figure 1 : Distribution simulée (histogramme) et points observés (point) du nombre de poisson par population pour une expérience réalisée en 2001

Pour paramétrer le modèle, des expériences visant à caractériser les traits d'histoire de vie de la gambusie à Rennes ont été nécessaires. En conditions de laboratoire, les expériences ont été réalisées sur la plateforme expérimentale de SCRIBE (INRA, Rennes) qui dispose de bassins de différentes tailles intégrés dans des circuits d'eau recyclée avec contrôle de la photopériode et de la température. Les expériences menées en conditions naturelles ont été réalisées sur la plateforme de microcosmes de l'Unité Expérimentale d'Ecologie et d'Ecotoxicologie Aquatique (INRA, Rennes).

## Résultats - Discussions

La première étape de notre travail a consisté à définir le modèle conceptuel du cycle de vie de la gambusie. Cette étape nous a permis de déterminer les traits d'histoire de vie de la gambusie que nous devons renseigner pour programmer le modèle. Ceux-ci concernent la croissance, la reproduction et la survie.

Concernant la croissance des individus, le modèle de von Bertalanffy est celui qui s'ajuste généralement le mieux aux données observées. Ce modèle comporte deux paramètres : la croissance initiale des individus (pente) et la taille maximale (asymptote horizontale). Nos résultats montrent que, les femelles et les mâles ont une croissance similaire pendant les 5 premiers jours. Le paramètre de pente du modèle de von Bertalanffy (croissance initiale) est donc le même pour les deux sexes. Les expériences réalisées ont montré que trois facteurs influencent la croissance initiale : la température, la taille à la naissance et la densité. Par ailleurs, nos résultats montrent que la taille maximale est différente entre les mâles (moyenne = 32 mm) et les femelles (moyenne = 54 mm). Concernant la reproduction, des expériences ont été menées pour caractériser la maturité sexuelle, l'effectif des portées et la taille à la naissance. Lors de la première parturition la taille est influencée par la densité en individus de la population. Pour la maturité sexuelle l'intervalle inter-parturition correspond à un nombre constant de degré-jour. Il existe une relation croissante de type puissance entre la taille de la mère et le nombre d'alevins produits dans une portée (Fig. 2). La taille moyenne à la naissance des alevins est une fonction décroissante de l'effectif de la portée. La sex-ratio est équilibrée à la naissance. Chez

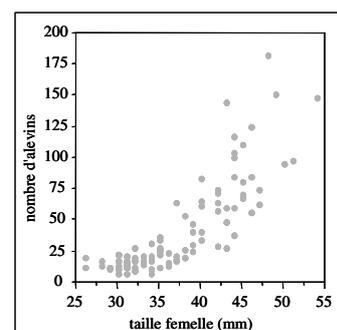


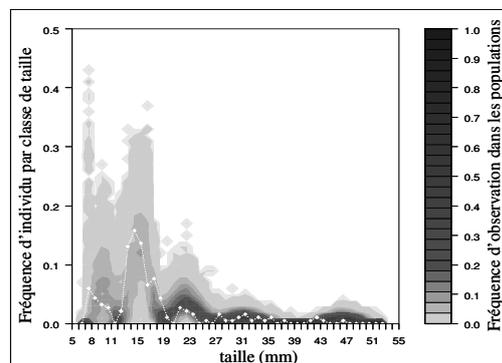
Figure 2: Relation taille de la femelle et nombre d'alevins

le mâle, il apparaît deux sous-groupes présentant des tailles différentes lors de la maturité sexuelle. Lors de leurs 10 premiers jours de vie, hors prédation, la survie des alevins est proche de 100 %. A partir du suivi de la survie de groupes de poissons en microcosmes (présence de prédateurs) nous proposons une fonction croissante possédant une asymptote horizontale (à taille maximale la mortalité est nulle) reliant la taille des poissons à la probabilité de survie journalière.

A partir de ces informations, le modèle a été programmé sur la plateforme MobidyC et le paramétrage du modèle a été réalisé en trois étapes : analyse de sensibilité, calibration et validation. Une analyse de sensibilité de notre modèle a été réalisée selon la méthode décrite par Ginot *et al.* [4]. Cette méthode combine une analyse locale et globale, incluant trois étapes : l'exploration paramètre par paramètre (un paramètre à un temps donné), l'analyse de sensibilité locale et l'analyse de sensibilité globale via une ANOVA. Ceci a permis d'explorer le comportement du modèle et d'identifier les paramètres importants pour réaliser le calage. En s'appuyant sur les résultats de l'analyse de sensibilité, le modèle a été calé par ajustement manuel des valeurs des paramètres afin que les écarts entre sorties observées et simulées soient satisfaisants par rapport aux objectifs assignés à notre modèle. Un point important de ce travail a été la validation du modèle. Comme le modèle est probabiliste, sa validation nécessite que l'espérance et la variance de ses sorties soient en accord avec celles des sorties observées chez les populations réelles. La qualité du test statistique dépend fortement du bon ajustement de la variance du modèle. En effet, la variance des sorties du modèle doit être à la fois supérieure ou égale à celle observée pour assurer la robustesse du test (c'est-à-dire de ne pas conclure faussement qu'un polluant a un effet quand ce n'est pas le cas) et suffisamment basse pour permettre que le test soit puissant (c'est-à-dire que l'on ne conclue pas faussement qu'un polluant n'a pas d'effet quand c'est le cas). Pour

s'assurer de cela, nous avons contrôlé que le modèle, sans modification des valeurs de ses paramètres, simule correctement les données de plusieurs expériences avec des scénarios thermiques différents (27 populations obtenues en conditions témoins lors de 4 années différentes ont servi à la validation) (Fig. 3). De plus, nous avons contrôlé que la variance des sorties du modèle est plus élevée que la limite supérieure de l'intervalle de confiance des données réelles (intervalle de confiance obtenu par bootstrap des données réelles).

L'aide à la décision apportée par le modèle à tout d'abord été évaluée sur deux cas de



**Figure 3:** Distribution de la distribution de taille des individus de 1000 populations simulées (Surface grise) et distribution de taille d'une population observée (point et ligne blanche).

Exemple de lecture : Pour la population observée, les individus de la classe 15-16 mm représentent 14 % de tous ses individus. 10% (niveau de gris) des 1000 populations présentent 14 % d'individus entre 15-16 mm.

populations réelles atypiques délibérément générées. Dans une première expérience, les poissons de la première cohorte ont été supprimés des populations lors de leur naissance. Dans une seconde expérience, des populations ont été initiées avec un nombre différent de géniteurs initiaux de ceux des populations simulées (3, 12, 24 au lieu de 6 femelles initiales). Par ailleurs, nous avons essayé de mettre en évidence les conséquences populationnelles de l'exposition à l'éthynilœstradiol d'individus de gambusies lors de leur puberté (futurs géniteurs initiaux des populations).

## Conclusion

En conclusion, lors des expériences pour évaluer les effets de polluants sur des populations de poissons en microcosme, la puissance statistique des comparaisons entre populations témoins et exposées est problématique car très faible. La modélisation probabiliste des populations témoins pourrait être une approche

intéressante pour augmenter la puissance statistique de ce type d'expérience. Notre modèle est actuellement opérationnel et son apport comme outil d'aide à la décision est en cours d'évaluation. De plus, comme un modèle individu centré simule chaque individu, cela permet de comprendre comment les propriétés individuelles déterminent le niveau de la population. Donc, dans le futur nous pourrions envisager d'utiliser ce modèle pour prédire les effets d'un polluant au niveau de la population en se basant sur les effets individuels.

**Références bibliographiques**

- [1] Drèze *et al.*, 1998. *Bull. Fr. Pêche Piscicult.* 350-351, 465-477.
- [2] Drèze, 2001. Thèse de doctorat de l'Université de Metz. 145 p.
- [3] <http://www.avignon.inra.fr/mobidyc>.
- [4] Ginot *et al.*, 2006. *Ecol. Model.* 193, 479-491.

## Plasticité phénologique et restauration des populations d'invertébrés aquatiques

T. Caquet et M. Roucaute

INRA, UMR EQHC, Écobiologie et Qualité des Hydrosystèmes Continentaux, 65 rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes Cedex

### Introduction

La phénologie des invertébrés aquatiques peut présenter une certaine plasticité pour différents traits : durée des différentes phases du cycle vital, voltinisme (nombre de générations par an), degré de synchronisation du développement, etc. Cette plasticité se manifeste en réponse à divers facteurs abiotiques (température, photopériode, niveau d'oxygénation, permanence de l'habitat, fréquence et caractère prévisible des perturbations, etc.) ou biotiques (disponibilité de la nourriture, densité de population, compétition intra- et inter-spécifique, etc.). L'influence de cette plasticité sur la dynamique de populations d'invertébrés aquatiques exposées à des substances toxiques et leur restauration a été jusqu'à présent très peu étudiée. Or, pour une espèce donnée, la phénologie peut conditionner fortement la probabilité de recolonisation d'un milieu perturbé, en fonction, par exemple, de la présence (ou de l'absence) de formes de dispersion ou d'œufs au moment où le niveau de contamination du milieu redevient compatible avec sa survie.

*Cloeon dipterum* L. est un insecte éphéméroptère de la famille des Baetidae qui est un hôte fréquent des milieux lenticules. Cette espèce ovovivipare et cosmopolite est connue pour présenter une plasticité phénologique importante puisque elle peut être univoltine (1 gén./an), bivoltine (2 gén./an), multivoltine (3 gén./an ou plus) ou unimultivoltine (partiellement univoltine et partiellement bivoltine) [1]. Cette plasticité est confirmée par l'analyse des patrons d'émergence de cette espèce lors d'études en mésocosmes réalisées en France. Dans le cas de populations univoltines, des adultes sont présents pendant une période brève (mai-juin) tandis que pour les populations bivoltines, des adultes sont présents du printemps à l'automne.

L'objectif de ce travail était d'analyser la phénologie de cette espèce dans des écosystèmes expérimentaux (mésocosmes) et d'évaluer les conséquences possibles de sa plasticité sur la restauration de ses populations suite à la contamination par un insecticide. Les conséquences sur la restauration et la structuration des communautés sont abordées en conclusion.

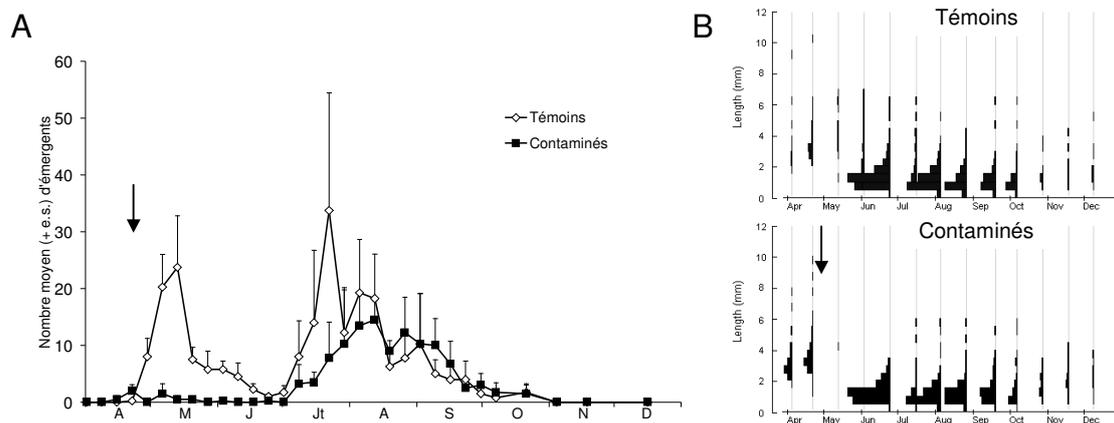
### Matériel et Méthodes

L'étude a été réalisée dans les mésocosmes circulaires de 9 m<sup>3</sup> de la plateforme expérimentale de l'U3E de Rennes dans le cadre d'un programme financé par le programme Interface Expertise-Recherche SSM INRA-DGAL. Les mésocosmes ont été remplis avec de l'eau du réseau et un mélange de sédiments naturels et artificiels (sable et argile) y a été introduit. Pendant la phase de maturation d'un an qui a suivi, des organismes provenant d'élevages (lymnées) et de milieux naturels (phyto- et zooplancton, macrophytes) ont été introduits. Le développement spontané de macrophytes et la colonisation par de nombreux insectes a contribué à accroître le réalisme écologique des mésocosmes. Le jour du traitement, la moitié des mésocosmes a été contaminée avec de la deltaméthrine (concentration nominale : 2 µg/L), les autres systèmes étant conservés comme témoins. Les prélèvements de

macro-invertébrés ont été réalisés selon un plan d'échantillonnage stratifié, à l'aide de pièges à émergence pour les formes ailées et de substrats artificiels pour les formes larvaires. Les organismes ont été triés, identifiés et dénombrés au laboratoire. La taille du corps (hors cerques) des larves et des subimagos de *C. dipterum* a été mesurée à l'aide d'une loupe binoculaire équipée d'un oculaire micrométrique.

## Résultats - Discussion

La deltaméthrine a provoqué une mortalité très importante des larves de *C. dipterum* dans les mésocosmes traités et aucune émergence d'adultes n'a été observée au printemps (Fig. 1A). En revanche, l'émergence d'une seconde cohorte a été observée à la fois dans les mésocosmes témoins et dans les mésocosmes traités en été (Fig. 1A). L'analyse de la distribution des fréquences de taille des larves dans les échantillons de faune benthique (Fig. 1B) a confirmé que ces individus provenaient d'œufs déposés au printemps par les adultes ayant émergé à cette période et non pas de larves qui auraient survécu au traitement. La restauration de ce type d'organisme dans un milieu contaminé par un insecticide s'effectue donc à partir de sources externes et elle n'est possible que si des individus fertiles sont présents au moment où les conditions environnementales redeviennent favorables (disparition du toxique).

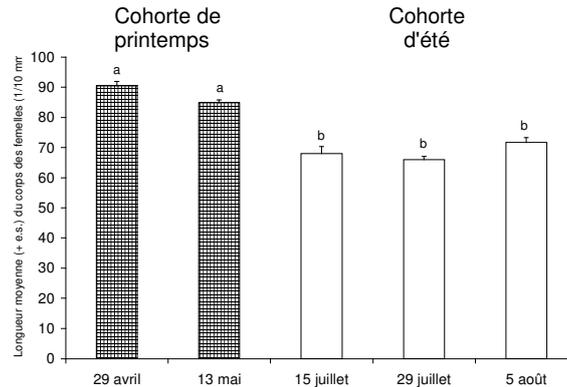


**Figure 1.** A. Abondance moyenne des subimagos de *C. dipterum* dans les pièges à émergence disposés dans les mésocosmes témoins et contaminés par la deltaméthrine. B. Distribution des fréquences de taille des larves de *C. dipterum* dans les échantillons de benthos provenant des mésocosmes témoins et contaminés par la deltaméthrine. La flèche indique la date du traitement.

L'importance de la phénologie dans la dynamique de restauration des populations d'insectes en mésocosmes a déjà été soulignée [2] mais de nombreuses questions demeurent, notamment en ce qui concerne d'éventuelles différences de potentiel reproducteur (et donc d'efficacité de recolonisation) entre les individus des différentes cohortes. En effet, chez de nombreux invertébrés, dont les Baetidae, la fécondité des femelles est fortement dépendante de la taille des individus. La comparaison de la taille des subimagos émergents capturés au printemps et en été dans les mésocosmes de Rennes a montré que les femelles de la seconde cohorte étaient significativement plus petites (et donc sans doute moins fécondes ; Fig 2). Si une contamination se produit en été, la recolonisation suite à la reproduction d'adultes appartenant à la seconde cohorte et provenant de milieux non perturbés est possible mais le nombre d'œufs produits par individu sera plus faible, ce qui peut avoir des conséquences sur la dynamique de la recolonisation et son succès éventuel.

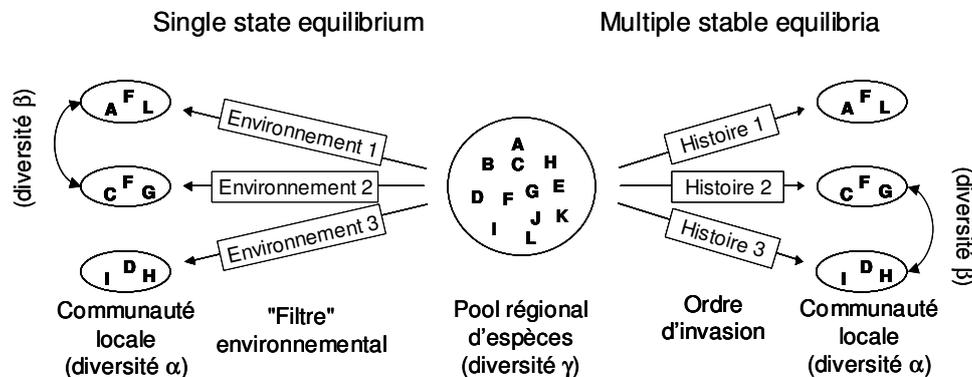
Le fait que toutes les espèces et toutes les populations ne présentent pas la même phénologie pourrait aussi avoir des conséquences importantes sur la dynamique de

restauration des communautés perturbées et sur la biodiversité des communautés restaurées, notamment dans les cas où la séquence de colonisation constitue un élément déterminant dans l'assemblage des communautés.



**Figure 2.** Tailles moyennes des subimagos de *C. dipterum* échantillonnées à différentes dates dans les mésocosmes de Rennes. L'effet de la date est significatif (ANOVA,  $p < 0,001$ ).

La variabilité et l'évolution naturelles d'une communauté sont en effet dues à la combinaison des effets de différents paramètres environnementaux et des caractéristiques biologiques des espèces qui la composent (elles-mêmes déterminées par la plasticité phénotypique et la variabilité génétique de ces espèces). Certaines caractéristiques régionales (diversité taxonomique, connectivité des habitats) et locales (productivité, fréquence et intensité des perturbations) de l'environnement affecteraient la sensibilité de l'assemblage des communautés aux conditions environnementales et à la séquence de colonisation (Fig. 3). La plasticité phénologique pourrait jouer un rôle, non encore évalué, dans l'état final atteint par les communautés, en conditionnant la séquence de recolonisation de milieux perturbés.



**Figure 3.** Représentation schématique des mécanismes d'assemblage des communautés selon qu'il existe un seul (*Single stable equilibrium*) ou plusieurs états d'équilibre stable (*Multiple stable equilibria*). Lorsqu'il existe un seul état d'équilibre stable, la diversité locale ( $\alpha$ ) est le produit de la diversité régionale ( $\gamma$ ) et de la sélection par les facteurs environnementaux ("filtres environnementaux"). Les différences de diversité entre sites ( $\beta$ ) découlent de l'existence de différents filtres environnementaux. Lorsqu'il existe plusieurs états d'équilibre stable, des communautés différentes peuvent s'établir alors que les conditions environnementales sont identiques, selon l'ordre de colonisation des espèces. Les différences de diversité entre sites sont alors la conséquence de différentes séquences de colonisation. La plasticité phénologique pourrait avoir une influence à ce niveau (modifié d'après [3]).

#### Références bibliographiques

- [1] Clifford, 1982. *Quaest. Entomol.* 18, 15-90.
- [2] van den Brink *et al.*, 1996. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1143-1153.
- [3] Chase, 2003. *Oecologia* 136, 489-498.

## Xénobiotiques et processus stochastiques dans les populations exposées : approche expérimentale chez *Lymnaea stagnalis*

M.-A. Coutellec

INRA, UMR EQHC, Écobiologie et Qualité des Hydrosystèmes Continentaux, 65 rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes Cedex

### Introduction

L'estimation des effets des contaminants à l'échelle des populations présente un intérêt majeur pour l'évaluation du risque écotoxicologique, car ce niveau d'organisation biologique est essentiel dans de nombreux processus écologiques et évolutifs. En conséquence, la caractérisation des effets requiert des outils spécifiquement dédiés à cette échelle, et qui font appel à la théorie en dynamique et génétique des populations. Par sa nature prédictive, le paramètre  $r$ , taux d'accroissement d'une population, est directement applicable à l'évaluation du risque, en particulier du risque de déclin ou d'extinction. Parallèlement, l'effectif efficace, ou paramètre  $N_e$  en génétique des populations, peut renseigner sur les risques évolutifs encourus par la population, en particulier ceux liés à la dérive génétique. Ces paramètres et les modèles qui les sous-tendent représentent donc une mine d'outils potentiels pour l'écotoxicologie des populations. Dans ce contexte, on peut choisir de les appliquer directement dans un test d'effet, en comparant par exemple les taux d'accroissement de populations saines et contaminées, et en attribuant les différences observées au contaminant testé. Si la comparaison porte sur des populations naturelles, on se confronte au problème des facteurs confondants non contrôlés, qui peuvent être très divers (dont l'histoire évolutive propre des populations étudiées, la stabilité environnementale, les processus d'immigration / émigration).

Une approche alternative et qui peut être préliminaire à l'étude en milieu naturel, consiste à tester la valeur prédictive de ces indices dans un contexte expérimental, plus facile à manipuler du point de vue écotoxicologique. Cette seconde démarche a été appliquée dans le cadre de l'étude présentée, qui porte sur un mollusque d'eau douce, *Lymnaea stagnalis*. L'objectif est de calibrer les effets de réductions démographiques expérimentales contrôlées sur les paramètres de dynamique et génétique des populations.

### Matériels et méthodes

*L. stagnalis* est un gastéropode pulmoné d'eau douce, présent dans les étangs et les lacs de l'hémisphère Nord. 16 populations expérimentales ont été créées en juillet 2002 à partir de lignées issues de populations d'étangs (Le Rheu) et implantées en mésocosmes extérieurs. Ces systèmes ont été mis en place 4 mois plus tôt, avec apport de sédiment, macrophytes, phyto- et zooplancton, suivi d'une colonisation naturelle par divers organismes (Unité Expérimentale d'Écologie et d'Écotoxicologie Aquatique, INRA Rennes). Les lignées ont fait l'objet d'un élevage préalable en isolement individuel au laboratoire, jusqu'à maturité sexuelle. En termes d'effectifs initiaux, 4 types de populations ont été créés (Tab. 1).

**Tableau 1.** Caractéristiques démogénétiques des 16 populations expérimentales de *L. stagnalis*.

Populations	$N_0$ Nombre de fondateurs	Nombre de lignées	$N_{e0}$ Effectif efficace initial <sup>a</sup>
B1 à B4	80	80	80
B5 à B8	80	20	52.67
A1 à A4	8	8	8
A5 à A8	8	2	4.67

<sup>a</sup>sous l'hypothèse de fratries de pleins-frères et d'absence de consanguinité initiale. Calcul de  $N_{e0}$  :  $1/(2 \cdot \text{proba de croisement frère-frère} \cdot \text{coefficient de parenté})$ .

Ces populations ont fait l'objet d'une étude :

- *démographique* : évolution des structures de taille individuelle, mesure de traits d'histoire de vie sur individus isolés au laboratoire ou encagés *in situ*. Ces données ont servi à construire un modèle de dynamique de population. La réduction de fitness et l'augmentation du risque d'extinction attendues quand  $N_{e0}$  diminue sont testées.
- *génétique* : évolution spatio-temporelle des fréquences alléliques et génotypiques à des loci microsatellites, estimation de  $N_e$ , sur la base de 2 ou 3 générations successives. La baisse de variabilité, l'augmentation de la différenciation génétique et la réduction de  $N_e$  quand  $N_{e0}$  diminue sont testées.
- *de biologie évolutive* : évaluation de l'accumulation du fardeau délétère de mutations par dérive génétique. L'effet d'hétérosis est testé par comparaison des croisements intra- et inter-population. On s'attend à un effet d'autant plus important que  $N_{e0}$  est petit.

Les attendus relatifs à ces études reposent sur les effets de fondation imposés, et sur la réduction théorique de variabilité génétique neutre et sous sélection qui en résulte.

## Résultats

### *Démographie, dynamique des populations*

Les caractéristiques démographiques sont hétérogènes sur l'ensemble des populations, mais leur variation n'est pas corrélée à l'effectif efficace initial  $N_{e0}$ .

Les modèles de Leslie construits sur la base des fécondités et probabilités de survie pour 7 classes d'âge (durée = 50 jours) conduisent à des taux d'accroissement très similaires entre types de populations ( $N_0 = 80$  individus :  $\lambda = 1,596$ , SD = 0,119 ;  $N_0 = 8$  individus :  $\lambda = 1,588$ , SD = 0,101) (Kruskal-Wallis test KW = 0, df = 1, P = 1). De tels taux prédisent dans tous les cas une explosion démographique rapide, et incompatible avec la réalité observée dans les mésocosmes. Cet écart est probablement lié à une surestimation de la survie à certains stades pré-adultes (survie mesurée au laboratoire, en conditions « douces ») et à l'absence de prise en compte de la densité-dépendance dans les modèles utilisés. L'analyse montre une sensibilité accrue de  $\lambda$  à la survie juvénile dans toutes les populations.

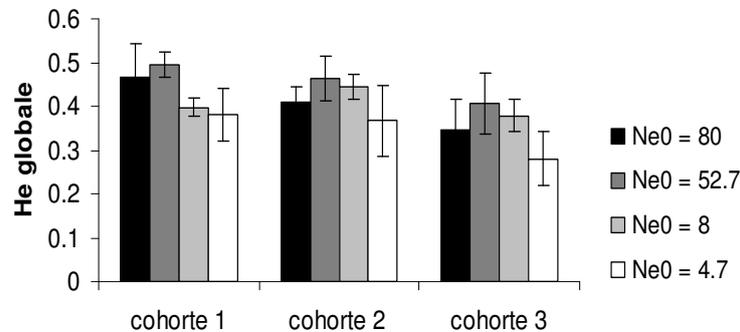
Les trajectoires démographiques simulées sur 10 ans et 1000 populations, tenant compte de la variabilité inter-individuelle de fertilité et de survie précoce (logiciel RAMAS [1]) conduisent à des probabilités d'extinction similaires entre les populations initialement grandes ( $N_0 = 80$  individus, p = 0,181, SD = 0,119) et petites ( $N_0 = 8$  individus : p = 0,153, SD = 0,054) (KW = 0,276, df = 1, P = 0,599). En revanche, les effectifs minimaux attendus au cours des 10 ans de simulation, sont eux logiquement corrélés avec les effectifs initiaux ( $N_0 = 80$  individus :  $N_{\min} = 416,3$  à 1372 individus ;  $N_0 = 8$  individus :  $N_{\min} = 27,2$  à 110,8 individus) (KW = 11,294, df = 1, P < 0,001).

### *Génétique des populations, effectifs efficaces*

L'échantillonnage génotypique aux loci étudiés dans les 3 cohortes successives identifiées sur la période de suivi montre une évolution de la diversité génétique globale sans rapport net avec  $N_{e0}$  (Fig. 1). La tendance des populations de plus petit

$N_{e0}$  (A5 à A8) à montrer une diversité plus faible n'est pas significative. Globalement, la diversité décroît légèrement au fil des générations.

Les estimations de  $N_e$  basées sur la variance temporelle des fréquences alléliques (méthode de Wang & Whitlock [2]) ne montrent pas de relation claire avec  $N_{e0}$ .



**Figure 1.** Evolution de la diversité génétique (3 à 5 loci, *étude non achevée*) dans les cohortes successives étudiées (adultes) en fonction des types de populations. Barres = SE.

La différenciation génétique des populations s'avère significative et les indices les plus élevés (indice  $\theta$  ; [3]) sont obtenus pour le sous-groupe des populations de plus petit  $N_{e0}$  (A5 à A8). Ce résultat est en conformité avec les attendus théoriques de l'effet différenciateur de la dérive génétique (inversement proportionnel à  $N_e$ ).

#### *Fardeau délétère de dérive génétique*

Sous l'hypothèse d'accumulation de mutations faiblement délétères par effet de dérive et sous dominance partielle, on s'attend à observer dans les petites populations une fitness de croisement intra-population inférieure à la fitness de croisement inter-population. Cet effet d'hétérosis est significatif pour le taux d'éclosion des pontes des populations de plus petit  $N_{e0}$  (A5 à A8) alors qu'il ne l'est pas pour les autres types de population.

#### **Discussion**

Les résultats de cette étude ont conduit à la validation de plusieurs hypothèses importantes relatives à la réduction de taille des populations : accumulation du fardeau délétère de dérive génétique, baisse de variabilité génétique et augmentation de la différenciation génétique des populations. Cependant, pour plusieurs indices, on observe une absence de relation entre valeurs mesurées et valeurs attendues d'après la théorie. Cet écart peut être réduit par l'amélioration des techniques (choix de marqueurs microsatellites plus variables que ceux utilisés, d'un modèle biologique plus variable, introduction de densité-dépendance dans les modèles de croissance de population, etc.). Il demeure que l'application directe de ces outils au test d'effet des contaminants sur les populations s'expose à un risque non négligeable d'interprétation biaisée, incluant potentiellement une sous-estimation des effets réels.

#### **Références bibliographiques**

- [1] Akçakaya. 2005. *RAMAS GIS : Linking Spatial Data with Population Viability Analysis (version 5.0)*. Applied Biomathematics, Setauket, New York.
- [2] Wang & Whitlock, 2003. *Genetics* 163, 429-446.
- [3] Weir & Cockerham, 1984. *Evolution* 38, 1358-1370.

## Session 4

### **Altérations de la dynamique des communautés**



## **Sur la piste des $\beta$ -ketoadipates à la recherche de marqueurs fonctionnels de la qualité microbiologique des sols : la 3,4-protocatechuate dioxygénase et la catechol 1,2-dioxygénase, deux gènes candidats ?**

N. El Azhari, N. Rouard et F. Martin-Laurent

INRA, UMR Microbiologie et Géochimie des Sols, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex

Le cycle du carbone dans le sol repose en grande partie sur la biodégradation microbienne de composés phénoliques plus ou moins complexes. Les microorganismes dégradent ces composés principalement selon la voie des  $\beta$ -ketoadipates qui est constituée de deux routes majeures : (i) celle empruntant la voie du protocatechuate et (ii) celle empruntant la voie du catechol reposant sur deux enzymes clefs, la 3,4-protocatechuate dioxygénase et la 1,2-catechol dioxygénase, respectivement. La voie des  $\beta$ -ketoadipates présente le double intérêt d'être dispersée au sein de la microflore du sol et de permettre la dégradation de composés phénoliques naturels de type lignine, mais aussi de composés phénoliques xénobiotiques tel que l'herbicide 2,4-D. Cette voie catabolique subit de nombreuses actions anthropiques dont les pratiques culturales (travail du sol, amendement organique et traitement phytosanitaire). Elle pourrait constituer un marqueur fonctionnel pertinent de la qualité microbiologique du sol, ciblant plus particulièrement des communautés microbiennes impliquées dans le cycle du carbone. Dans ce contexte, nous développons des marqueurs moléculaires et biochimiques permettant de déterminer la densité, la structure, la diversité et l'activité de populations bactériennes du sol possédant la 3,4-protocatechuate dioxygénase et la 1,2-catechol dioxygénase.

Dans le sol la voie des  $\beta$ -ketoadipates est la voie majeure du catabolisme des composés aromatiques naturels [1]. Cette voie joue un rôle important dans la dégradation d'une large gamme de composés phénoliques. Elle est présente dans de nombreuses bactéries éloignées phylogénétiquement. La voie des  $\beta$ -ketoadipates implique la mono- ou di-hydroxylation de composés aromatiques polycycliques ou homocycliques conduisant à la formation d'intermédiaires métaboliques clefs, le catéchol et le protocatechuate [2]. Ces intermédiaires sont par la suite clivés entre deux résidus hydroxyl adjacents par la catéchol 1,2-dioxygénase (1,2-CD) et la protocatechuate 3,4-dioxygénase (3,4-PCD), respectivement. Ces deux enzymes appartiennent à la super-famille des protéines de type dioxygénase C, essentielles pour (i) l'utilisation des composés aromatiques comme source de carbone et d'énergie et (ii) la transformation d'une grande variété de composés aromatiques stables tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et d'autres micropolluants organiques contaminant l'environnement (pesticides) [3]. Par conséquent, il existe un grand intérêt à étudier les communautés bactériennes possédant les gènes codant pour les enzymes clivant les intermédiaires métaboliques de la voie des  $\beta$ -ketoadipates parce qu'elles pourraient constituer des bioindicateurs pertinents de qualité microbiologique du sol.

Jusqu'à présent la plupart des études ont été menées sur des souches modèles ou sur des souches microbiennes cultivables isolées d'échantillons environnementaux et décrivant principalement les mécanismes responsables de l'activité de ces

enzymes [1]. Seules quelques études rapportent la caractérisation moléculaire du gène *pca* codant la protocatechuate 3,4-dioxygénase [4,5]. Dernièrement, deux études concernant la caractérisation de séquences de *pcaH* isolées directement à partir d'échantillons environnementaux ont été rapportées [6,7].

Par conséquent, malgré l'important intérêt des communautés microbiennes *pca* et *cat*, due notamment à leur rôle clef dans le cycle du carbone et dans la biodégradation de composés aromatiques xénobiotiques, l'écologie de cette communauté microbienne fonctionnelle reste peu décrite au sein de l'environnement tellurique. Nous rapportons dans notre communication le développement d'outils moléculaires, basés sur l'extraction directe des acides nucléiques du sol [8] et l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne, permettant de déterminer la densité, la structure et la diversité de la communauté *pca* dans le sol [9], qui pourraient être utilisés comme indicateurs de la qualité biologique des sols.

#### Références bibliographiques

- [1] Harwood & Parales, 1996. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 553-590.
- [2] Chaudhry & Chapalamadugu, 1991. *Microbiol. Rev.* 55, 59-79.
- [3] D'Argenio *et al.*, 1999. *J. Bacteriol.* 181, 6478-6487.
- [4] Frazee *et al.*, 1993. *J. Bacteriol.* 175, 6194-6202.
- [5] Garcia *et al.* 2005. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 97-109.
- [6] Buchan *et al.*, 2001. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5801-5809.
- [7] Ni Chadhain *et al.*, 2006. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4078-4087.
- [8] Martin-Laurent *et al.*, 2001. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2354-2359.
- [9] El Azhari *et al.*, 2006. *J. Microbiol. Meth.* En révision.

Les travaux de thèse de Najoi El Azhari sont financés par un contrat de recherche ADEME/Région Bourgogne.

## Comparaison entre descripteurs biologiques et chimiques pour décrire l'impact du cuivre dans un sol

J. Sebastia<sup>1</sup>, D. Lejon<sup>2</sup>, I. Lamy<sup>1</sup> et L. Ranjard<sup>2</sup>

<sup>1</sup>INRA, Unité PESSAC, Physico-chimie et Écotoxicologie des Sols d'Agrosystèmes Contaminés, RD 10, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex

<sup>2</sup>INRA, UMR Microbiologie et Géochimie des Sols, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex

### Introduction

Le cuivre est un métal toujours utilisé en agriculture en tant que pesticide. Certains horizons de surface de sols, notamment de sols viticoles, présentent des teneurs importantes en cuivre suite à l'utilisation de bouillie bordelaise. La toxicité des éléments traces métalliques comme le cuivre vis-à-vis des organismes vivants du sol a été largement démontrée, et peut se traduire par des effets délétères sur la biocénose du sol. Dans ce cadre, le rôle clé des micro-organismes dans la gestion des flux de matière ainsi que la spécificité et la sensibilité de leur réponse aux stress métalliques en font des indicateurs écotoxicologiques pertinents. Toutefois les effets des métaux et la réponse des micro-organismes sont encore mal compris et donc mal prédits. En effet, l'impact d'un élément trace comme le cuivre va dépendre de façon décisive de sa spéciation. Or les éléments traces métalliques peuvent engager des interactions biotiques et abiotiques avec les différentes composantes du sol, minérale, organique inerte ou organique vivante, qui vont influencer la forme physico-chimique sous laquelle ils se trouvent, et donc leur toxicité. L'affinité du cuivre pour la matière organique, et en particulier la matière organique en solution, est un des paramètres à prendre en compte dans l'évolution de la spéciation du cuivre. Or on ne sait pas prévoir dans quel sens, immobilisation ou transfert, les équilibres vont être modifiés lors d'ajouts de cuivre dans les sols, car les interactions entre les matières organiques, la microflore du sol et les métaux ont été peu étudiées conjointement.

Dans ce travail, nous avons voulu superposer des approches analytiques (teneurs totales en carbone organique et cuivre, spéciation en solution, pH) à des mesures d'écodynamique (évolution de la spéciation du cuivre et du carbone en solution) et d'écotoxicologie (impact sur les communautés de bactéries), pour mettre en place des méthodes permettant de prédire le devenir de cette source de pollution diffuse dans le temps qu'est le cuivre, et de développer des outils qui qualifient son impact sur la biocénose.

### Matériels et méthodes

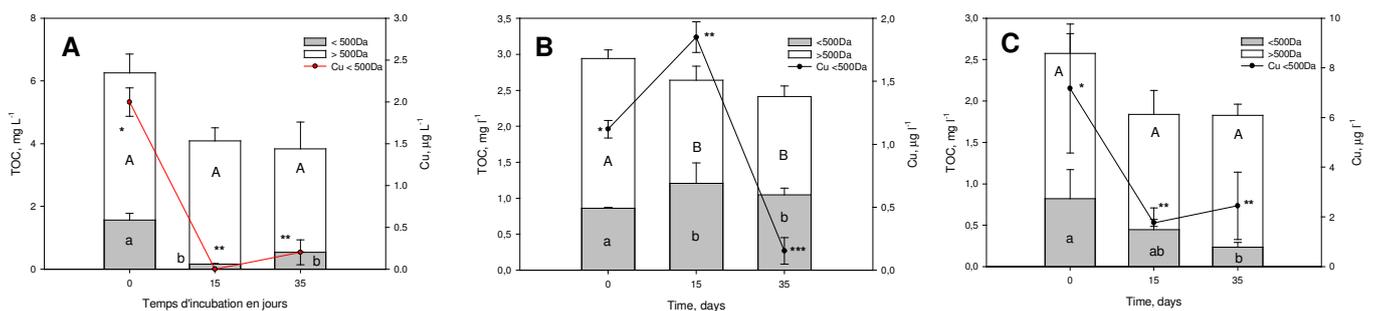
Notre échantillonnage s'appuie sur un site expérimental en vignoble (Mâcon) dont le sol est limono argileux (pH 6,7) et faiblement contaminé en cuivre (60 ppm). Ce site est organisé en différentes parcelles qui ont reçu des apports répétés de matières organiques, et nous avons utilisé pour cette étude la parcelle témoin sans amendement organique. Les échantillons de sols ont été prélevés à 0-5cm de profondeur, mis à incuber pendant 0, 15 et 35 jours en présence ou en absence de cuivre (microcosmes dopés ou témoins). Après chaque temps d'incubation, la solution du sol a été extraite (rapport sol:eau de 1:2) et un aliquote a été utilisé pour effectuer un fractionnement des matières organiques dissoutes par ultrafiltration afin de les séparer en deux fractions : les petites molécules les plus labiles (< 500 Da) et

les molécules plus grosses (>500 Da). Le cuivre a également été dosé dans chacune de ces fractions. Sur l'autre partie d'aliquote de solution extraite, les éléments traces (Cu total) et majeurs ( $C_{org}$ , Fe, Ca, Mg, K, Na) ont été dosés afin d'effectuer une modélisation théorique de la spéciation du cuivre en solution (modèle ECOSAT). En parallèle, la densité de la communauté bactérienne totale cultivable hétérotrophe (CH) ainsi que la communauté bactérienne résistante au cuivre (CuR) ont été appréhendées par un dénombrement des colonies formant unité (cfu) sur milieu synthétique YG supplémenté ou non avec du cuivre ( $CuCl_2$ , 2mM). Les données acquises en présence de cuivre ont été comparées avec des blancs  $H_2O$ , des blancs HCl pour mimer l'acidification due à l'ajout de cuivre, et des blancs HCl/ $CaCl_2$  pour mimer l'ajout d'un divalent et mieux en comprendre l'effet sur la spéciation du cuivre en relation avec le carbone organique dissous.

## Résultats et discussion

### Descripteurs chimiques de l'impact du cuivre

A  $t = 0$ , et par rapport aux témoins  $H_2O$ , les ajouts de cuivre ont entraîné une diminution du pH et de la teneur en carbone organique en solution. Mais ces diminutions sont aussi observées pour le témoin HCl/ $CaCl_2$ , mettant en avant l'importance des différences de pH et de force ionique dans la solubilisation de la matière organique des sols. Dans la solution extraite à  $t = 0$ , on trouve aussi moins de cuivre en solution pour les témoins HCl/ $CaCl_2$  que pour les témoins  $H_2O$ . Par contre, au cours de l'incubation, les trois types de microcosmes témoins et cuivre montrent les mêmes tendances de diminution avec le temps du carbone et du cuivre dans les solutions extraites, avec cependant des différences d'amplitude suivant les microcosmes. En terme de spéciation, lorsqu'on compare l'évolution des petites (< 500 Da) et des grosses molécules organiques (> 500 Da) en solution (Fig. 1), on voit que la diminution du carbone organique total en solution est attribuable à la diminution significative au cours de l'incubation des petites molécules (< 500 Da) pour le témoin  $H_2O$ , mais à celle des grosses molécules pour le témoin HCl/ $CaCl_2$ . Par contre, l'impact du cuivre se différencie de l'effet de l'acidification et de la présence d'un divalent par une dynamique du carbone différente des deux témoins (Fig. 1). Ces résultats montrent que c'est à 15 jours qu'un effet du cuivre est significativement observable, tandis qu'à 35 jours les effets sont moindres.



**Figure 1.** Fractionnement du COT (histogrammes) et du cuivre en solution (courbes superposées) pour les microcosmes témoin  $H_2O$  (A), pour les témoins  $CaCl_2$  (B) et pour les microcosmes en présence de cuivre (C).

Les calculs de spéciation théorique indiquent que pour le témoin  $H_2O$ , très peu de cuivre en solution est sous forme libre, plus de 98 % du cuivre étant sous forme liée à la matière organique en solution pour des pH variant de 7,5 à 7,0 pendant l'incubation. Pour les microcosmes HCl/ $CaCl_2$ , 90 % du cuivre total est sous forme organique, 8 % sous forme libre, le reste étant attribué à des complexes inorganiques pour des pH de l'ordre de 6,5 variant peu au cours de l'incubation. Pour les microcosmes en présence de cuivre, 55 % du cuivre total en solution est sous

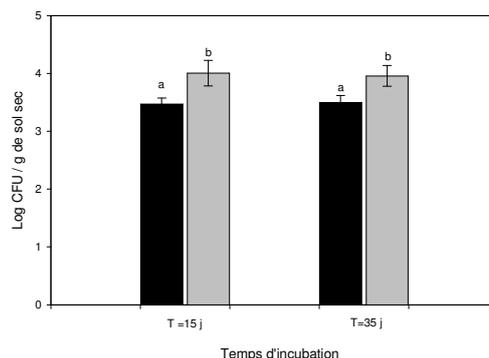
forme libre, et ce pourcentage diminue avec le temps pendant l'incubation à 35 % à 15 jours en faveur d'espèces organiques, pour ré-augmenter à 46 % du cuivre total en solution à 35 jours, avec un pH évoluant parallèlement de 6,4 à 6,8 puis 6,5.

### *Descripteurs biologiques de l'impact du cuivre*

Les ajouts de cuivre ont induit une diminution du nombre de bactéries cultivables totales à t=15j ainsi qu'un enrichissement en bactéries résistantes au cuivre (Fig. 2) par rapport aux contrôles H<sub>2</sub>O. Cependant la différence entre le témoin H<sub>2</sub>O et les microcosmes contaminés au cuivre ne se voit plus à 35 jours pour les bactéries cultivables totales, suggérant une atténuation de l'impact du cuivre. Ainsi, l'enrichissement en bactéries résistantes au cuivre observé à 15 jours entre le témoin et les microcosmes contaminés reste le même au bout de 35 jours.

Dans la littérature, un tel résultat d'impact sur les populations microbiennes du cuivre est attribué à la présence d'ions libres en solution. Ici, les calculs théoriques basés sur la composition des solutions montrent que pour les microcosmes Cu, il y a plus de cuivre libre en solution que pour les témoins, cette forme du cuivre étant réputée la plus biodisponible.

Cependant, les données de spéciation des microcosmes H<sub>2</sub>O ne peuvent être comparées directement aux spéciations dans les microcosmes cuivre, car les conditions physico-chimiques de pH, force ionique et nature d'ions ne sont pas identiques. Par contre, en comparant avec les spéciations des microcosmes HCl/CaCl<sub>2</sub> on montre bien un impact différencié du cuivre à 15 jours qui peut être relié à l'impact observé sur les populations bactériennes du sol.



**Figure 2.** Dénombrement des populations bactériennes résistantes au cuivre pour les microcosmes témoin H<sub>2</sub>O (en noir) et pour les microcosmes en présence de cuivre (en gris).

### **Conclusions**

Dans nos conditions expérimentales, les résultats montrent qu'il existe bien un lien entre des descripteurs chimiques et biologiques. Ce lien est complexe, car les descripteurs chimiques intègrent les processus biotiques et abiotiques tandis que les descripteurs biologiques sont le résultat d'une biodisponibilité de l'élément métallique introduit. Ainsi il convient, pour pouvoir comparer ces données, de suivre la spéciation des ions et la dynamique des éléments dans des milieux de mêmes conditions physico-chimiques.

Cette étude a été financée en partie par l'INRA et la Région Ile de France (Thèse de J. Sebastia), la région Bourgogne et le BIVB (thèse de D. Lejon) et par le programme national ACI/FNS ECODYN.

## Impact d'un herbicide sur la diversité microbienne aquatique. Une approche expérimentale.

A. Bouchez<sup>1</sup>, A. Villeneuve<sup>1</sup>, C. Leboulanger<sup>2</sup>, J.-F. Humbert<sup>1</sup> et B. Montuelle<sup>3</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR CARTELE, Centre Alpin de Recherche sur les Réseaux Trophiques des Écosystèmes Limniques, 75 avenue de Corzent, BP 511, 74203 Thonon-les-Bains Cedex

<sup>2</sup>IRD, Unité CYROCO, Cyanobactéries des milieux aquatiques tropicaux peu profonds: Rôles et Contrôles, 911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5

<sup>3</sup>Cemagref, Laboratoire Écologie Microbienne des Hydrosystèmes Anthropisés, 3 bis quai Chauveau, 69336 Lyon Cedex

### Introduction

Les communautés périphytiques (principalement algues et bactéries) jouent un rôle important dans le fonctionnement des écosystèmes lotiques en participant aux grands cycles biogéochimiques. Dans les rivières des bassins versants viticoles, ces communautés sont exposées à des concentrations variables de nutriments minéraux et de matière organique, en lien avec les itinéraires techniques suivis dans les parcelles viticoles, et plus particulièrement l'application de produits chimiques. Leur structure et leur dynamique peuvent être affectées par les caractéristiques physico-chimiques et biologiques du milieu et notamment par la présence de pesticides. L'impact relatif des différents facteurs naturels et anthropiques est difficile à estimer *in situ*, du fait des potentielles interactions entre facteurs. Des systèmes expérimentaux (microcosmes, mésocosmes) peuvent permettre de s'affranchir de tels facteurs de confusion et ainsi mieux caractériser les relations entre pression chimique et périphyton.

Des études préliminaires menées dans le Beaujolais, sur la rivière Morcille avec un bassin versant dédié à 80 % à la viticulture, ont permis de constater la présence d'un gradient amont-aval de pesticides. Ce gradient ne s'accompagne pas de modifications notables des nutriments et de la matière organique, mais de changements de la diversité algale et bactérienne. Cependant, le long du cours d'eau, de fortes hétérogénéités au niveau du régime hydrologique et des conditions d'éclairage tant au niveau spatial que temporel empêchent de caractériser le lien entre gradient en pesticides et modifications de diversité microbienne.

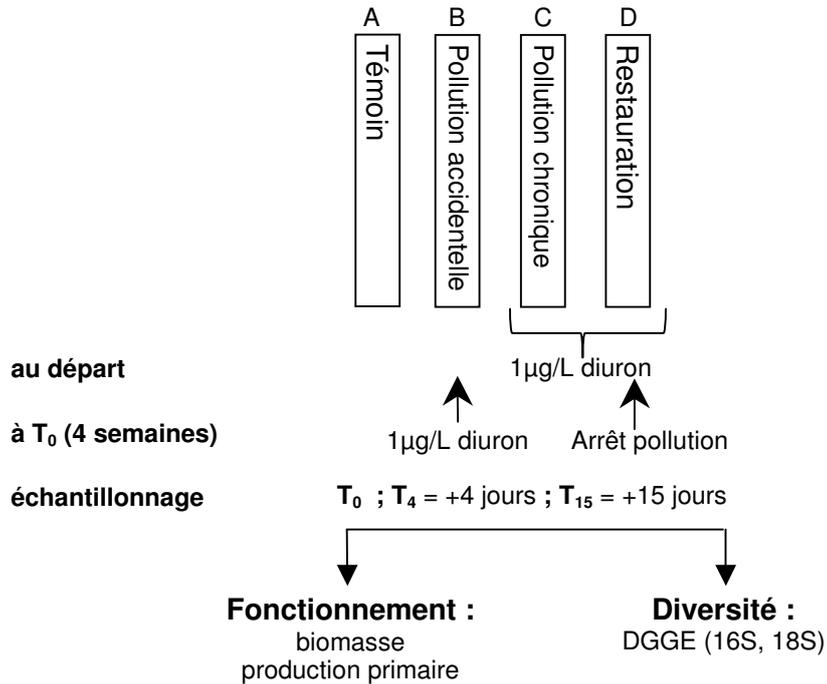
Nous avons donc testé en microcosmes lotiques l'effet de faibles concentrations d'herbicide sur la croissance et la diversité des communautés périphytiques, dans des conditions d'éclairement et d'hydrodynamique contrôlées.

### Matériel et méthodes

Des rivières artificielles (90 cm de long sur 35 cm de large) en laboratoire sous éclairage jour/nuit contrôlé, alimentées par l'eau de l'amont de la Morcille renouvelée chaque semaine (15 L d'eau pour chaque rivière), ont permis l'implantation de communautés périphytiques sur des lames de verre dépolies. Différents modes d'exposition à une faible dose (environnementale) d'un herbicide de la viticulture (diuron) ont été mis en œuvre (Fig. 1) afin d'étudier la résistance et la résilience des communautés.

Des échantillons ont été prélevés dès la maturité des biofilms (4 semaines) pour suivre la réaction des communautés aux différents traitements. La diversité a été évaluée par une méthode d'empreinte génétique (PCR-DGGE) pour la communauté

eucaryote (gène codant pour l'ARN 18s) et pour la communauté procaryote (gène codant pour l'ARN 16s). Des paramètres en lien avec le fonctionnement des communautés ont également été mesurés (biomasse, production primaire).



**Figure 1.** Plan expérimental : rivière A : Témoin (sans pesticide) ; rivière B : pollution accidentelle après 4 semaines ; rivière C : pollution permanente ; rivière D : pollution stoppée après 4 semaines.

## Résultats

En premier lieu, on observe un fort lien entre la maturation du biofilm et la composition des communautés. Les populations bactériennes ne semblent pas impactées par les faibles doses de diuron. La pollution accidentelle mimée dans le canal B à 4 semaines de maturité conduit à un changement notable de la composition de la communauté eucaryote et une décroissance de biomasse dès 4 jours d'exposition. Cette tendance est confirmée après 15 jours d'exposition. Dans le scénario de pollution chronique appliquée dès le premier jour de l'expérimentation, après 4 semaines la diversité eucaryote apparaît diminuée (canal D) par rapport au témoin (A). Pour le témoin pollué (C), on observe un changement marqué de diversité ainsi qu'une forte décroissance en termes de production primaire et de biomasse entre T<sub>0</sub> et T<sub>15</sub> par rapport au témoin en « restauration » (D). Dans ce canal où la pollution a été arrêtée à T<sub>0</sub>, aucune différence n'est détectée par rapport au témoin non pollué (A) après 15 jours, ce qui suggère une restauration des communautés.

L'exposition au diuron modifie la diversité et la composition des communautés de micro-algues. Cette modification s'accompagne d'une diminution de la biomasse, pour les scénarios mimant une pollution aiguë ou chronique. On observe également une résilience des communautés microbiennes : augmentation de biomasse, de production primaire et retour à une diversité proche de celle du témoin. L'impact de la lumière sur ces différents scénarios a également été testé et semble de nature à modifier fortement la réaction des communautés.

## Conclusion

A court terme, le diuron en concentration faible tend à diminuer l'activité et la diversité de la communauté périphytique en systèmes expérimentaux. Il semble donc bien susceptible d'impacter le fonctionnement d'un tel écosystème microbien en milieu naturel.

Cet effet est également observé dans le cas d'un scénario de pollution chronique. Cependant l'arrêt de la pollution dans ce cas conduit à observer une résilience de la communauté, tant en terme de fonctionnement qu'en terme de diversité.

## Bioindicateurs d'impact du recyclage de produits résiduels organiques en sols cultivés : lien avec la disponibilité de micropolluants organiques et métalliques

S. Houot<sup>1</sup>, P. Benoit<sup>1</sup>, E. Barriuso<sup>1</sup>, G. Bodineau<sup>1</sup>, V. Etievant<sup>1</sup>, J.-N. Rampon<sup>1</sup>, M. Deschamps<sup>1</sup>, Y. Capowiez<sup>2</sup>, P. Cambier<sup>3</sup>, J.-P. Petraud<sup>3</sup>, A. Jaulin<sup>3</sup>, T. Lebeau<sup>4</sup>, J. Kuntz<sup>4</sup>, C. Leyval<sup>5</sup>, T. Beguiristain<sup>5</sup>, P. Leglize<sup>5</sup>, C. Steinberg<sup>6</sup>, V. Edel-Hermann<sup>6</sup>, N. Gautheron<sup>6</sup>, C. Francou<sup>7</sup>, M. Poitrenaud<sup>7</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR EGC, Environnement et Grandes Cultures, 78850 Thiverval-Grignon

<sup>2</sup>INRA, UMR Écologie des Invertébrés, Laboratoire de Toxicologie Environnementale, Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9

<sup>3</sup>INRA, Unité PESSAC, Physico-chimie et Écotoxicologie des Sols d'Agrosystèmes Contaminés, RD 10, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex

<sup>4</sup>Plate-Forme Technologique Agrosystèmes, Institut Universitaire de Technologie, Université de Haute Alsace, 29 rue d'Herrlisheim, 68008 Colmar

<sup>5</sup>LIMOS, Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les sols, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex

<sup>6</sup>INRA, UMR Microbiologie et Géochimie des Sols, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex

<sup>7</sup>Veolia Propreté, 78520 Limay

Ce projet vise à évaluer les risques d'impacts à long terme du recyclage en agriculture de composts d'origine urbaine sur la composante biologique de sols cultivés, incluant microflore et faune. Les populations testées sont proposées comme bioindicateurs d'impact dont la réponse sera reliée aux effets des composts sur les caractéristiques physico-chimiques d'un sol et à l'état des polluants dans ce sol. Les composts sont vecteurs de polluants organiques (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, HAP, étudiés ici) et métalliques (Éléments Traces Métalliques, ETM) en faibles concentrations. Leur application répétée pourrait avoir un effet perturbateur sur le fonctionnement biologique des sols, en raison du cumul de faibles doses de polluants. Mais les composts sont avant tout des matières organiques (MO) dont l'apport répété peut modifier les caractéristiques physico-chimiques du sol comme sa teneur en MO, son pH... Ces 2 composantes devront être prises en compte dans l'interprétation des effets des apports de composts sur la composante biologique du sol.

Les mesures sont réalisées dans un essai de longue durée (collaboration INRA – Centre de Recherches pour l'Environnement, l'Énergie et le Déchet, du groupe VEOLIA Environnement) où les apports répétés de composts se font selon des pratiques courantes réelles mises en œuvre chez les agriculteurs.

Les mesures portent sur :

- la taille, la diversité et l'activité de la macrofaune (vers de terre) et de la microflore (communautés bactériennes et fongiques) du sol,
- la qualité chimique des sols soumis aux épandages et donc soumis d'une part à des apports organiques, d'autre part à l'accumulation de faibles doses d'ETM et de composés trace organique (CTO), polluants dont le comportement sera dépendant de leurs interactions avec les composés organiques.
- la spéciation des ETM et des CTO comme indicateur d'exposition des organismes vivants dans le sol. Cette spéciation est faite dans différentes fractions granulométriques des produits épandus et des sols soumis aux épandages. En effet, les fractions grossières de la MO ont des turnovers plus

rapides que les MO associées aux fractions fines et sont également plus facilement consommées par la faune du sol.

Les mesures sont faites à différents pas de temps après l'épandage de Septembre 2004. La variation des réponses dans des traitements n'ayant pas reçu d'épandage permettra d'appréhender les variations « naturelles » des indicateurs qui seront comparées à l'intensité des variations dans les traitements soumis à épandage.

Le site «Qualiagro» (Feucherolles, 78) mis en place en 1998, a une superficie de 6 ha. Le sol est de type limoneux lessivé décarbonaté d'une profondeur supérieure à 1,2 m. La teneur en matière organique moyenne initiale est de 1,9 %, valeur proche du seuil critique évalué à 1,5 % dans ce type de sol. Le sol a un pH initial de 6,9. Les teneurs en ETM initiales sont faibles par rapport à la moyenne des sols du même type dans la région, celles en HAP sont faibles également, équivalentes aux valeurs citées dans la bibliographie dans un sol périurbain.

Le dispositif comprend 4 traitements organiques et un témoin. Trois composts sont comparés à un fumier de bovins, amendement organique de référence:

- un compost d'ordures ménagères résiduelles (OMR) après collecte sélective des emballages « propres et secs »
- un compost de boues (DVB) par co-compostage de boues d'épuration urbaines et de déchets verts ou de fragments de palettes
- un compost de fraction fermentescible des ordures ménagères (FFOM) issu de la collecte sélective de cette fraction co-compostée avec des déchets verts

Ces 5 traitements reçoivent ou non une fertilisation azotée (N). Le dispositif comprend 4 blocs de 10 parcelles. Le dispositif est cultivé selon une rotation blé-maïs. Les composts et le fumier sont apportés tous les 2 ans, en début d'automne, sur chaume de blé. Seuls les traitements OMR +N et DVB+N sont présentés ici et comparés aux 2 témoins avec et sans N.

Quatre applications de compost ont déjà eu lieu. Les composts OMR ont une biodégradabilité supérieure à celle des composts de DVB avec en moyenne 40 et 10 % du C des composts facilement minéralisable, respectivement pour OMR et DVB. Les teneurs en ETM sont toujours supérieures dans les composts d'OMR où la moyenne des analyses dépasse les teneurs réglementaires pour le Cr et Pb. Les teneurs moyennes en HAP des composts sont très inférieures aux maxima réglementaires.

Les doses de composts sont calculées de façon à apporter environ 4 t C/ha à chaque épandage. Les doses effectivement épandues sont mesurées. Les flux d'ETM sont conformes à la réglementation pour les DVB, à l'exception des flux de Cu. Pour les composts d'OMR, les flux d'ETM dépassent les flux réglementaires pour Cr, Cu Pb et Zn. Les flux des 3 HAP fluoranthène, benzo-*b*-fluoranthène et benzo-*a*-pyrène, sont inférieurs aux flux maxima réglementaires.

L'ensemble de ces apports a modifié les caractéristiques physico-chimiques des sols. Les teneurs en C organique ont augmenté dans les parcelles recevant les composts de DVB et de façon moindre dans les parcelles recevant le compost d'OMR. Les teneurs en N augmentent moins que celles de C, ce qui se traduit par une augmentation du C/N dans tous les traitements. Le pH et le taux de saturation en Ca et Na de la CEC tendent à augmenter dans le traitement OMR et à diminuer dans les autres traitements. Toutes ces variations des caractéristiques physico-chimiques du sol devront être prises en compte pour expliquer les modifications des populations microbiennes, de la faune, de leur activité au même titre que les modifications de teneurs et de spéciation des polluants provenant des apports de composts.

Les évolutions en ETM totaux dans les horizons de surface pour les différents traitements sont cohérentes par rapport aux flux d'ETM apportés par les composts. Seules les teneurs en cuivre augmentent significativement dans les traitements DVB

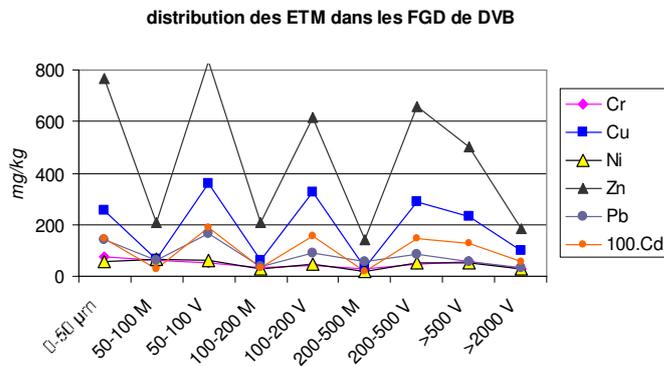
et OMR. Les teneurs en HAP totaux n'évoluent pas entre 1998 et 2004 et restent en moyenne autour de 200 mg/kg dans tous les traitements.

Les spéciations physique (distribution dans des fractions granulo-densimétriques, FGD) et chimique des ETM et des HAP dans les composts et dans les sols sont utilisées comme indicateurs d'exposition des organismes vivants. Dans les composts, elles montrent l'enrichissement en ETM des fractions légères enrichies en MO et dans la fraction < 50 µm (Fig. 1).

La distribution des ETM dans les FGD des sols sera également présentée. La spéciation chimique des ETM (extraction au Ca<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> et EDTA) dans les différentes FGD (sol et composts) complétera l'évaluation de la biodisponibilité des ETM.

Enfin, la disponibilité des HAP dans les composts est également évaluée par spéciation. Pour cela des extractions séquentielles à l'eau, puis à l'ASE (*Accelerated Solvent Extractor*) à l'eau subcritique puis à l'aide de solvants organiques sont mises au point. En particulier, une méthode de purification et de concentration des HAP contenus dans les extraits aqueux par absorption sur barreau magnétique (SBSE pour « *Stir Bar Sorptive Extraction* ») a été mise au point.

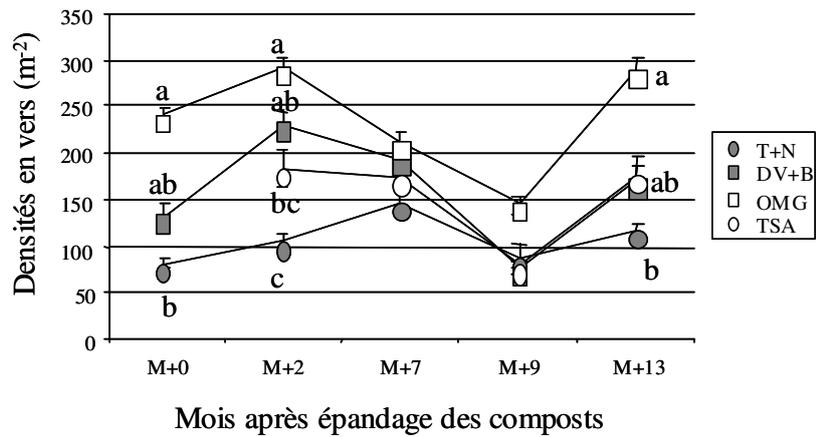
La synthèse des résultats obtenus concernant l'évaluation de la spéciation des ETM et HAP sera présentée dans l'exposé.



**Figure 1.** Distribution des ETM dans les fractions granulo-densimétriques du compost DVB. Les tailles des fractions sont en µm ; M : fraction minérale, V : fraction « végétale » ou légère.

Les effets des traitements sur la microflore du sol sont abordés *via* l'évolution de la structure des communautés microbiennes, bactériennes et fongiques, incluant les champignons mycorhiziens en utilisant deux techniques d'analyse de l'ADN extrait des sols : la PCR-TTGE et la PCR-T-RFLP. Ces 2 méthodes ont nécessité des mises au point techniques. Par ailleurs, l'intervention de trois laboratoires différents a mis en évidence la nécessité d'une intercalibration. Les premiers résultats montrent que la structure des communautés fongiques estimée par TTGE est modifiée par l'apport d'OMR dès le premier prélèvement après épandage alors que le compost DVB n'a aucune incidence.

L'épandage du compost OMR exerce des effets positifs plus importants et durables sur la taille des communautés lombriciennes que le DVB (Fig 2), sans modifier leur structure. A certaines dates, on a pu déceler des effets attractifs et répulsifs du sol ayant reçu des composts d'OMR et de DVB respectivement, qui pourraient contribuer aux évolutions d'abondance observées.



**Figure 2.** Évolution temporelle de l'abondance des vers de terre (+ ES) dans chaque traitement. A une date donnée, les points portant des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5 %.

En résumé, les épandages des 2 composts dans les conditions expérimentales du site n'ont aucun effet délétère sur les communautés de vers de terre ; ils modifient la structure des communautés microbiennes sans que cela puisse être attribué à une exposition plus importante à des composés toxiques.

## Organisation des communautés végétales et distribution des traits fonctionnels d'espèces d'intérêt pour révéler la phytotoxicité des sols sur un site de traitement du bois

M. Mench, M. Aulen et C. Bes

INRA, UMR BIOGECO, Biodiversité, Gènes et Écosystèmes, 1, avenue des Facultés, 33405 Talence

Créosote, CuSO<sub>4</sub> et CCA ont été successivement utilisés dans les formulations pour traiter du bois sur un site. Fuites de fluides de traitement, lixiviats de bois traités, dépôts de déchets, envols et entraînement particulaire ont disséminé les produits chimiques et contaminé les sols. Ils contiennent en surface de 65 à 2600 mg Cu kg<sup>-1</sup> et certains ont montré une forte écotoxicité lors de tests en microcosmes vis-à-vis de végétaux et d'invertébrés [1]. Que la contamination du sol et leur phytotoxicité s'accompagnent d'une diminution de la biodiversité et de la couverture végétale, d'un éclaircissement accru et d'un manque de nutriments ou d'eau est un postulat que l'on souhaite vérifier sur ce site au niveau des communautés [2,3]. L'objectif est d'examiner l'organisation de la biodiversité des communautés végétales sur une série de stations du site, ayant le même type de sol mais une contamination croissante (*i.e.* Cu, As, HAPs). On souhaite aussi identifier les plantes à fréquence élevée et à fort recouvrement dans les zones fortement contaminées afin de sélectionner des espèces d'intérêt pour la phytoremédiation.

### Matériels et Méthodes

Le site a une activité d'imprégnation du bois depuis le 19<sup>ème</sup> siècle. Plusieurs secteurs abandonnés montrent des sols nus ou des bosquets nains, tandis que d'autres s'auto-organisent autour de peupliers et saules. Après prospection du site, de fosses pédologiques et des communautés végétales en place, 5 stations d'échantillonnage (A, B, C, D et E) ont été choisies. D'après les analyses du sol en surface (Tab. 1), la contamination en Cu serait comme suit : D>C>E>B>A.

Tableau 1. Caractéristiques des sols (horizon 0-0,25 m)

Stations	P1	P4	B	D	E	P10
C org (g/kg)	9,2	10,1	11,6	15,7	9,4	19,6
N total (g/kg)	0,53	0,70	0,83	0,62	0,43	1,04
C/N	17,2	14,4	13,9	25,1	21,9	18,9
MO (g/kg)	15,9	17,4	20	27,2	16,2	33,9
CEC cmol <sup>+</sup> /kg	3,5	5,3	5,0	1,9	4,5	6,0
Cr (mg/kg)	23	24	26	31	87	28
Cu (mg/kg)	<b>1460</b>	<b>260</b>	<b>65</b>	<b>2600</b>	<b>185</b>	<b>118</b>
Zn (mg/kg)	46	59,7	31,8	57,7	37,8	67,8
As (mg/kg)	9,8	12,1	20,2	26,3	52,8	11,6
Σ7 PCB (mg/kg)	<0,035					
Benzo[a]pyrène (mg/kg)	0,64					

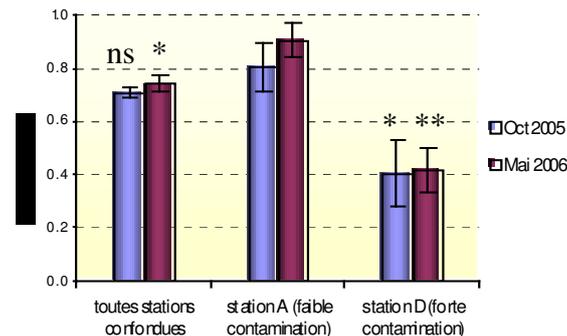
Les stations (~150 m<sup>2</sup> chacune) ont été divisées en quadrats de 4 m de côté. Les espèces végétales ont été systématiquement inventoriées, photographiées et mises sous herbier. Le nombre d'espèces végétales, les indices de recouvrement et les

biomasses spécifiques ont été mesurés en octobre 2005 et mai 2006 (indice : + : quelques individus, puis recouvrement croissant de 1, faible à 5, total).

L'indice H de Shannon ( $H = -\sum p_i \ln p_i$ , où  $p_i$  est la proportion de l'espèce  $i$  dans la communauté à  $S$  espèces) est calculé pour chaque station.

## Résultats - Discussion

Les communautés végétales des zones contaminées (*e.g.*, D) sont réduites, peu diversifiées et souvent en patch. La biodiversité en octobre sur la station A (faible contamination) est similaire à celle quantifiée sur la globalité des stations (89 espèces identifiées) et plus élevée que celle de la station D ( $p < 0,05$ ), la plus contaminée (Fig. 1).



**Figure 1.** Indices de Shannon : Moyennes des indices des quadrats de toutes les stations, de la station A (peu contaminée) et de la station D (fortement contaminée). T-test entre la station A et les autres stations (\* :  $P < 0,05$  ; \*\* :  $P < 0,01$  ; ns : non significatif).

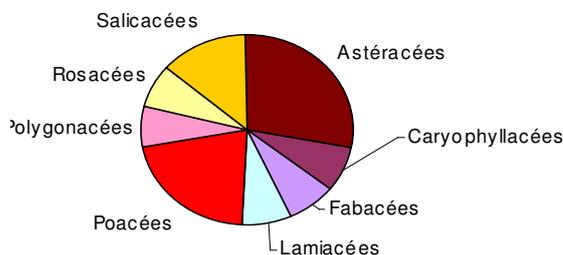
En mai, la diversité végétale est similaire à octobre quelles que soient les stations (T-test non significatif). La station A devient plus diversifiée que la moyenne de l'ensemble des stations ( $p < 0,05$ ). La station D reste moins diversifiée que A ( $p < 0,01$ ). L'indice de Shannon est le plus souvent compris entre 0,5 (communautés à diversité très faible ou dominance d'une espèce) et 4,5 (communautés complexes, riches en espèces ayant des abondances similaires) [4]. La diversité végétale diminue avec l'augmentation de la contamination des sols des stations et leur écotoxicité testée au préalable, mais reste faible sur l'échelle de l'indice, même aux stations peu contaminées. La couverture globale des quadrats varie entre 0 (pas de couverture végétale) et 5 (couverture maximum). La moyenne toutes parcelles confondues est de 3,3. Dans les zones à forte contamination, elle est de 2,8. Elle vaut 4,7 dans les zones à faible contamination. Hutchinson & Symington [5] et Zvereva & Kozlov [3] montrent le même sens de variation. La composition de la communauté végétale A diffère de celle de la D et ne correspond pas à la composition floristique moyenne sur l'ensemble des stations (Tab. 2). Ce sont les zones peu contaminées (*e.g.*, A) qui contribuent le plus à la diversité végétale en octobre et mai, cependant une dynamique des communautés végétales existe entre l'automne et le printemps. Les espèces dominantes pour la station D contaminée sont des herbacées plutôt que des ligneuses. Pour les herbacées, les pérennes sont toujours plus abondantes que les annuelles, quelle que soit la zone considérée. Les Poacées et Astéracées sont fréquentes dans les zones à forte contamination ; aux faibles contaminations, ce sont les Poacées, Fabacées et Rosacées (Fig. 2a et b), confirmant les données de Wang *et al.* [6]. En zones contaminées, des plantes pionnières et tolérantes aux métaux s'installent en premier [5,7]. Parmi les plantes les plus abondantes de la station A, il y a des espèces connues pour leurs traits fonctionnels lorsqu'elles sont exposées aux métaux dont Cu. *Agrostis stolonifera* est tolérant aux métaux [8]. *A. capillaris* [9] et *Rumex acetosella* [7] sont tolérants au Cu. *Populus nigra* est un accumulateur de Zn [10] qui serait tolérant aux métaux grâce à des mécanismes de détoxification comme les métallothionéines [11]. L'écologie des espèces de la station D et de l'ensemble

des stations correspond au type de sol sableux, sec, légèrement acide, présent sur la majorité du site (e.g. *Rumex acetosella*, *Agrostis capillaris*, *Geranium molle*, *Trifolium campestre*, *Vicia sativa*, *Ulex europaeus*, *Tuveraria gutata*) (J. Laporte-Cru, com. pers.). D'autres sont plus rudérales (*Sporobolus tenacissimus*, *Hypericum perforatum*, *Rubus fruticosus*, *Galium aparine*). Les espèces sur la station A sont caractéristiques de milieux mésophiles (plus humide, lisières de bois) comme *Stellaria holostea*, *Teucrium scorodonia*, *Hedera helix*, *Geranium robertianum*. La station A est effectivement plus ombragée, moins contaminée et en lisière de chênaie (*Quercus robur*, mésophile).

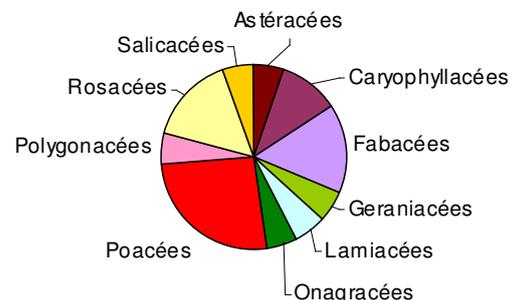
**Tableau 2.** 10 plus fortes abondances spécifiques (% de recouvrement) en mai.

Toutes stations confondues				Station A (faible contamination)			Station D (forte contamination)		
rang	Genre	espèce	%	Genre	espèce	%	Genre	Espèce	%
1	<i>Agrostis</i>	<i>capillaris</i>	43.6	<i>Hedera</i>	<i>helix</i>	31.4	<i>Agrostis</i>	<i>capillaris</i>	50.8
2	<i>Rumex</i>	<i>acetosella</i>	29.8	<i>Agrostis</i>	<i>stolonifera</i>	22.9	<i>Rumex</i>	<i>acetosella</i>	28.3
3	<i>Agrostis</i>	<i>stolonifera</i>	14.1	<i>Cytisus</i>	<i>scoparius</i>	22.9	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	10.8
4	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	12.9	<i>Agrostis</i>	<i>capillaris</i>	20.0	<i>Hypericum</i>	<i>perforatum</i>	22.5
5	<i>Sporobolus</i>	<i>tenacissimus</i>	8.5	<i>Galium</i>	<i>aparine</i>	20.0	<i>Agrostis</i>	<i>stolonifera</i>	11.7
6	<i>Rubus</i>	<i>fruticosus</i>	9.9	<i>Quercus</i>	<i>robur</i>	17.1	<i>Populus</i>	<i>nigra</i>	10.8
7	<i>Geranium</i>	<i>molle</i>	9.6	<i>Rubus</i>	<i>fruticosus</i>	17.1	<i>Lotus</i>	<i>corniculatus</i>	6.7
8	<i>Cerastium</i>	<i>glomeratum</i>	8.8	<i>Vicia</i>	<i>hirsuta</i>	14.3	<i>Cerastium</i>	<i>glomeratum</i>	6.7
9	<i>Hypericum</i>	<i>perforatum</i>	6.0	<i>Vicia</i>	<i>sativa</i>	11.4	<i>Rubus</i>	<i>fruticosus</i>	3.3
10	<i>Vicia</i>	<i>sativa</i>	5.7	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	8.6	<i>Sporobolus</i>	<i>tenacissimus</i>	3.3

**Forte contamination**



**Faible contamination**



**Figure 2.** Fréquence des familles en zones de forte et faible contamination.

En conclusion, la contamination de l'horizon de surface des sols, notamment en Cu, leur écotoxicité et leur texture sableuse forment des zones sur le site où un stress fort s'exerce sur les espèces végétales. La contamination du sol et de sa solution affecte la biodiversité et la composition des communautés végétales. Les espèces présentes dans les zones les plus contaminées sont des candidats d'intérêt pour la phytoremédiation. L'effet de la contamination sur la banque de graines n'est pas connu, mais sera étudié.

#### Références bibliographiques

- [1] Mench & Bes, 2006. 3<sup>ème</sup> Séminaire d'Écotoxicologie de l'INRA, Dinard, 17-19 Septembre 2006.
- [2] Freitas *et al.*, 2004. *Environ. Int.* 30, 65-72.
- [3] Zvereva & Kozlov, 2004. *J. Ecol.* 92, 288-296.
- [4] [http://www.ifn.fr/spip/IMG/pdf/if\\_3\\_biodiv.pdf](http://www.ifn.fr/spip/IMG/pdf/if_3_biodiv.pdf)
- [5] Hutchinson & Symington, 1997. *J. Geochem. Explor.* 58, 323-330.
- [6] Wang *et al.*, 2004. *Acta Botanica Sinica* 46, 780-787.
- [7] Bagatto & Shorthouse, 1999. *Can. J. Bot.* 77, 410-425.
- [8] Siedlecka *et al.* 2001. In Prasad (ed.), *Metals in the Environment. Analysis by Biodiversity*, Marcel Dekker, NY, 171-217.
- [9] Lepp *et al.*, 1997. *Environ. Pollut.* 95, 363-369.
- [10] Di Baccio *et al.*, 2003. *New Phytologist* 159, 443-452.
- [11] Kohler *et al.*, 2004. *New Phytologist* 164, 83-93.

Les auteurs remercient l'Ademe, Département sites et sols pollués, Angers.

# Caractéristiques des modèles d'écosystèmes aquatiques et conséquences pour l'évaluation des risques écotoxicologiques

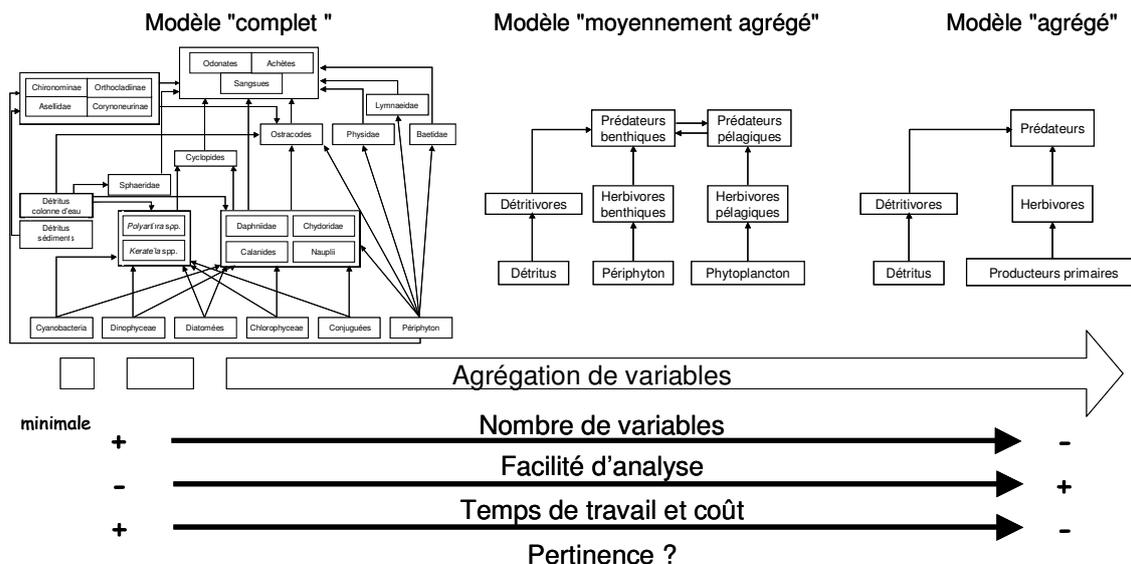
S. Sourisseau<sup>1</sup>, A. Bassères<sup>2</sup>, F. Périé<sup>2</sup> et T. Caquet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR EQHC, Écobiologie et Qualité des Hydrosystèmes Continentaux, 65 rue de Saint Briec, 35042 Rennes Cedex

<sup>2</sup>TOTAL Petrochemicals, Pôle de Recherches et Développement de Mont-Lacq, Service Environnement, BP 47, 64170 Lacq.

## Introduction

Divers outils numériques destinés à simuler le devenir des polluants dans l'environnement et leurs impacts sur les écosystèmes ont été développés [1]. Leur mise en œuvre implique le plus souvent l'élaboration d'une représentation théorique, ou modèle conceptuel, de l'écosystème étudié, généralement présentée sous la forme d'un modèle à compartiments. Schématiquement, les modèles se répartissent en deux grands types : des modèles détaillés comportant de nombreuses variables, et des modèles agrégés, qui ne comportent que quelques variables (Fig. 1). Pour un même écosystème, le passage d'un type de modèle à l'autre se fait *via* une agrégation de variables. Selon les cas, l'agrégation peut être envisagée d'un point de vue taxonomique, fonctionnel (regroupement selon des traits écologiques et/ou biologiques) ou encore en fonction de la sensibilité au toxique considéré. Il est toutefois essentiel d'évaluer jusqu'à quel point cette agrégation peut être réalisée sans que cela remette en cause la pertinence du modèle. Inversement, il convient de déterminer le meilleur compromis entre la pertinence du modèle et la difficulté de l'acquisition des informations nécessaires à son établissement (Fig. 1).



**Figure 1.** Exemples d'agrégation appliquée à un modèle conceptuel de réseau trophique aquatique et conséquences pratiques associées.

## Matériel et Méthodes

Le cas retenu est celui de la contamination ponctuelle d'un écosystème aquatique par un insecticide, la deltaméthrine. Les données utilisées ont été obtenues lors d'expérimentations réalisées dans des mésocosmes lenticques (U3E, INRA, Rennes) et lotiques (Total Petrochemicals, Lacq). Les modèles conceptuels ont été définis en fonction des groupes taxonomiques présents et des connaissances disponibles sur leur écologie. Ils ont été agrégés selon la sensibilité à la deltaméthrine des compartiments planctoniques (agrégation moyenne), ou en fonction des caractéristiques trophiques et fonctionnelles des groupes (agrégation forte). Les simulations ont été réalisées à l'aide du logiciel AQUATOX [2]. Cet outil fournit des sorties (dynamiques temporelles des paramètres physico-chimiques et des biomasses des différents compartiments) dans deux types de conditions : normales (systèmes témoins) et perturbées (systèmes contaminés). Il est alors possible de calculer un pourcentage d'effet simulé associé à la contamination en comparant les évolutions des biomasses de chaque compartiment en conditions normales et perturbées à différentes dates  $t$  après le traitement :

$$\% \text{ effet}_{t} = \frac{(\text{Biomasse Contaminé, } t - \text{Biomasse Témoin, } t)}{\text{Biomasse Témoin, } t} \times 100$$

Les données réelles ont été utilisées pour calculer de la même façon un pourcentage d'effet observé. Les deux types de résultats ont ensuite été comparés qualitativement (sens de l'effet) et quantitativement (intensité de l'effet).

D'autre part, un logiciel d'évaluation du risque (TerraSys) a été utilisé pour déterminer des indices de risque (IR) pour chacun des compartiments. Ces indices sont déduits du rapport entre l'exposition estimée à la deltaméthrine et un niveau présumé sécuritaire pour le compartiment considéré. Une valeur inférieure à 1 indique une absence de risque tandis qu'un indice égal ou supérieur à 1 met en évidence la possibilité d'effets écotoxicologiques.

## Résultats-Discussion

*Mésocosmes lenticques* - D'un point de vue qualitatif, les trois modèles prédisent bien l'évolution des biomasses à la suite de la contamination, sauf en ce qui concerne les microprédateurs pélagiques (Tab. 1). D'un point de vue quantitatif, le modèle détaillé permet une bonne estimation des effets sur les différents compartiments. Le modèle moyennement agrégé prédit relativement bien la réponse des compartiments planctoniques, mais il sous-estime fortement les effets sur les macroinvertébrés. Le modèle très agrégé simule assez bien l'évolution des compartiments benthiques mais il surestime fortement les effets sur les compartiments planctoniques.

**Tableau 1.** Pourcentages d'effet observés et simulés, 21 jours après la contamination, en mésocosmes lenticques et indices de risque (IR) calculés avec TerraSys (Ag. : agrégation).

Variable	Effet observé	Ag. forte	Ag. moyenne	Ag. faible	IR
Phytoplancton	+43,5 %	+225,7 %	+37,4 %	+6,8 %	0,012
Zooplancton herbivore	-18,7 %	-100%			6,25
Rotifères	+6,2 %		+45,9 %	+40,7 %	6,25
Microcrustacés	-39,9 %		-100 %	-100 %	6,25
Microprédateurs pélagiques	+210,2 %	-92,8 %	-83,0 %	-93,6 %	6,25
Herbivores brouteurs	+429,8 %	+0,5 %	+0,2 %	+927,9 %	0,51
Baetidae	-95,2 %			-100 %	0,51
Lymnaeidae	+225,6 %			+119 %	0,51
Détritivores	-92,7 %	-100 %	-0,1 %		0,51
Chironomidae	-92,7 %			-88,1 %	0,51
Macroinvertébrés prédateurs	-65,5 %	-60,5 %	-17 %		0,51

*Mésocosmes lotiques* – D'un point de vue qualitatif, les différents modèles ne permettent pas une bonne simulation de l'évolution des biomasses à la suite de la contamination de l'écosystème (Tab. 2). D'un point de vue quantitatif, les deux types de modèles surestiment fortement l'impact de la deltaméthrine sur les compartiments planctoniques. Cet écart découle vraisemblablement d'une insuffisance des données disponibles pour les organismes concernés.

**Tableau 2.** Pourcentages d'effet observés et simulés, 21 jours après la contamination, en mésocosmes lotiques et indices de risque (IR) calculés avec TerraSys (Ag. : agrégation).

Variable	Effet observé	Ag. forte	Ag. faible	IR
Herbivores filtreurs	24,6 %	-100 %		6,25
Herbivores brouteurs	-66,9 %	0,14 %		0,51
Baetidae	-75,5 %		-93,7 %	0,51
Elmidae	-62,6 %		-100 %	0,51
Ephemerellidae	-100 %		-27,7 %	0,51
Microprédateurs pélagiques	119 %	-100 %		6,25
Microprédateurs benthiques	49 %	-100 %		0,51
Ceratopogonidae	-15,8 %		-94,2 %	0,51
<i>Polycelis</i> sp.	-82,5 %		-100 %	0,51
Détritivores	22 %	-100 %		0,51
Macroprédateurs	0,02 %	-100 %		0,51

*Comparaison des deux logiciels* – Dans le cas des mésocosmes lentiques, les valeurs de IR reflètent relativement bien les pourcentages d'effets observés en mésocosmes et estimés avec AQUATOX lors de la simulation à partir d'une représentation agrégée. Cependant, TerraSys ne permet pas de prendre en compte les effets positifs (indirects) sur certains groupes.

La modélisation du fonctionnement des différents compartiments nécessite de définir précisément un grand nombre de caractéristiques (éco)physiologiques et écologiques dont certaines ont une influence importante sur la sortie des modèles (taux maximal de photosynthèse et taux de sédimentation du phytoplancton par exemple). L'absence de mesures expérimentales propres ou de données bibliographiques pour ces paramètres semblent être les sources principales des écarts entre les valeurs observées et les valeurs simulées.

L'évaluation des risques écotoxicologiques au niveau des communautés implique notamment de prendre en compte les différences inter-spécifiques de sensibilité aux toxiques et les éventuels effets indirects découlant par exemple de l'altération de relations de compétition ou de prédation. En théorie, une représentation agrégée permet une estimation plus fiable de l'évolution de la biomasse des groupes fonctionnels [3] mais elle ne permet pas de mettre en évidence certains phénomènes comme des effets indirects par exemple. Une agrégation faible permet une meilleure analyse de la réponse de chacun des compartiments à la contamination mais il semble extrêmement difficile de pouvoir disposer de données fiables pour tous les compartiments. En fin de compte, le choix du modèle et du niveau d'agrégation dépendront avant tout de la question posée et de la quantité (et de la qualité) des données disponibles.

#### Références bibliographiques

- [1] Pastorok R.A. *et al.* (Eds), 2002. *Ecological Modeling in Risk Assessment: Chemical effects on Populations, Ecosystems, and Landscapes*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA. 302 p.
- [2] Park R.A. & Clough J.S., 2004. *AQUATOX (RELEASE 2). Modeling environmental fate and ecological effects in aquatic ecosystems. Volume 2: Technical documentation*. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington DC. 210p.
- [3] Brinkman *et al.*, 1994. *Vie Milieu* 44, 29-37.



## Session 5

### **Stress toxique et stress environnementaux**



## Application des isotopes stables à l'étude des conséquences des perturbations environnementales en milieu aquatique

T. Caquet, J.-M. Roussel, J. Haury et M. Roucaute

INRA, UMR EQHC, Écobiologie et Qualité des Hydrosystèmes Continentaux, 65 rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes Cedex

### Introduction

La mesure des teneurs en isotopes stables de certains éléments par spectrométrie de masse est de plus en plus employée pour l'étude des réseaux trophiques aquatiques [1]. Les mesures les plus utilisées sont l'enrichissement relatif en  $^{13}\text{C}$  et en  $^{15}\text{N}$  (exprimé en ‰) des organismes, respectivement désignés par  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{15}\text{N}$  et définis de la façon suivante (les standards sont la bélemnite de Pee Dee pour le carbone et l'azote de l'air pour le second élément) :

$$\delta^{13}\text{C} = \left[ \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{organisme}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{standard}}} - 1 \right] \times 1000 \quad \text{et} \quad \delta^{15}\text{N} = \left[ \frac{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{organisme}}}{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{standard}}} - 1 \right] \times 1000$$

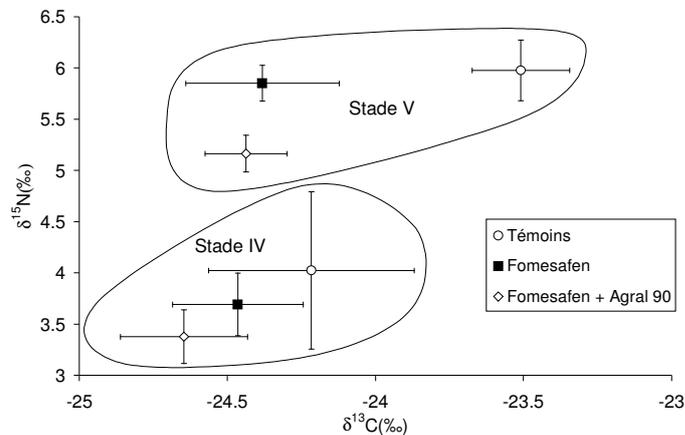
La mesure de l'enrichissement en isotope stable de certains éléments permet en théorie de reconstituer le flux d'énergie depuis les producteurs primaires jusqu'aux consommateurs secondaires, d'identifier les ressources alimentaires utilisées par un consommateur (phytoplancton, macrophytes, proies présentes localement ou apports exogènes, etc.) et le niveau trophique auquel il appartient, les isotopes les plus légers étant préférentiellement éliminés par les consommateurs. L'analyse de la signature isotopique peut ainsi permettre la mise en évidence d'une modification de la longueur des réseaux trophiques (diminution de  $\delta^{15}\text{N}$  pour les organismes situés au plus haut niveau du réseau si celui-ci est plus court) ou bien d'identifier des modifications de leur architecture générale suite à une perturbation.

Les travaux présentés ici portent sur la caractérisation, à l'aide de la mesure du  $\delta^{13}\text{C}$  et du  $\delta^{15}\text{N}$ , de la réponse de communautés d'invertébrés aquatiques à deux types de perturbations (contamination par un pesticide et par des nutriments issus d'activités d'élevage), dans deux contextes environnementaux différents (mésocosmes lenticques et cours d'eau, respectivement).

### 1. Effets d'un herbicide et d'un mélange herbicide-adjuvant de pulvérisation sur des réseaux trophiques aquatiques expérimentaux

Les études en mésocosmes, soutenues dans le cadre du programme 'Pesticides' du Ministère de l'Écologie et du Développement Durable et par l'ACI Écologie Quantitative, ont été réalisées sur la plate-forme expérimentale de l'Unité Expérimentale Écologie et Écotoxicologie Aquatique (U3E) de l'INRA de Rennes. Le dispositif comprenait 12 mésocosmes rectangulaires d'un volume utile de 18 m<sup>3</sup>. Le scénario retenu était celui correspondant à la contamination non-intentionnelle d'un écosystème lentique par un herbicide, le fomesafen, appliqué à la dose moyenne d'emploi au champ, seul ou en mélange avec un adjuvant de pulvérisation, l'Agral 90, en respectant le rapport des concentrations préconisé par le fabricant de l'herbicide. Les concentrations nominales correspondantes étaient de 40 µg/L pour le fomesafen et de 90 µg/L pour l'Agral 90.

L'analyse de larves de notonecte, des insectes prédateurs, a permis de mettre en évidence des modifications significatives de signature isotopique (et donc vraisemblablement de régime alimentaire) entre les différents stades larvaires d'une part, et entre mésocosmes témoins et traités d'autre part (Fig. 1). La contamination par le mélange a entraîné une diminution de la valeur de  $\delta^{15}\text{N}$  et de  $\delta^{13}\text{C}$  par rapport aux témoins. La contamination par l'herbicide seul a uniquement entraîné une diminution de la valeur de  $\delta^{13}\text{C}$  par rapport aux témoins [2].



**Figure 1.** Valeurs moyennes ( $\pm$  erreur standard) de l'enrichissement en isotopes stables du carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) et de l'azote ( $\delta^{15}\text{N}$ ) pour les différents stades larvaires de Notonectidae prélevés dans les mésocosmes témoins, contaminés par le fomesafen seul et par le mélange fomesafen + Agral 90.

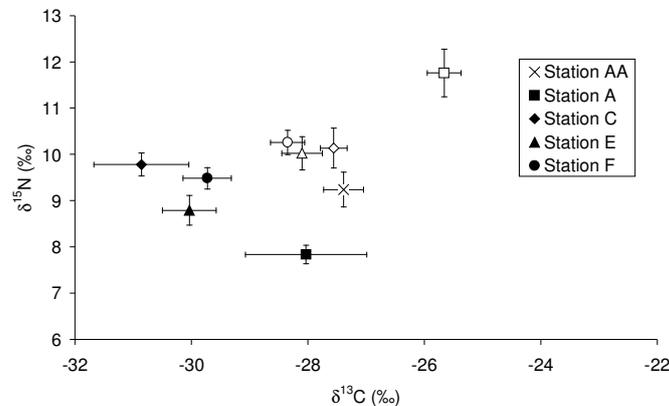
Les deux traitements ont eu des effets directs et indirects sur la structure du phytoplancton [3] qui ont pu avoir des conséquences sur la valeur de  $\delta^{13}\text{C}$ . L'herbicide seul n'a pas eu d'effet sur le zooplancton, alors que le mélange a entraîné une diminution de l'abondance des Calanides, accompagnée d'une augmentation de celle de leurs compétiteurs (rotifères, nauplii de Cyclopidés). La baisse de la valeur de  $\delta^{15}\text{N}$  chez les notonectes dans les mésocosmes contaminés par le mélange pourrait découler d'une augmentation de la contribution des rotifères, qui présentent souvent une valeur de  $\delta^{15}\text{N}$  inférieure à celle des Crustacés, au régime alimentaire des notonectes ou à celui de leurs proies (adultes de Cyclopidés par exemple).

## 2. Mise en évidence de l'incorporation d'azote d'origine anthropique dans des réseaux trophiques lotiques

Une étude, financée dans le cadre des projets fléchés du Département Hydrobiologie et Faune Sauvage, a été réalisée en 2002 sur un affluent du Scorff (Morbihan), le ruisseau de Pont-Houarn, dont le bassin versant est classé en Zone d'Excédent Structurel (ZES ; plus de 170 kg de N organique épanable/ha/an). L'étude avait pour objectif de mettre en évidence l'existence d'apports éventuels d'azote d'origine animale et leurs conséquences sur les réseaux trophiques (producteurs primaires, macro-invertébrés, poissons) du ruisseau et du Scorff, grâce à la mesure du  $\delta^{15}\text{N}$  pour des organismes appartenant à différents niveaux trophiques (producteurs primaires, macro-invertébrés, poissons). Les déjections animales, et notamment le lisier de porc, présentent en effet une valeur de  $\delta^{15}\text{N}$  plus élevée que celle des sources naturelles d'azote [4]. Des stations réparties le long du ruisseau (d'amont en aval : stations AA, A, C et E) et sur le Scorff après la confluence des deux cours d'eau (station F) ont été échantillonnées en mai et septembre. Seuls les résultats obtenus pour les macro-invertébrés sont présentés ici.

Les valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  sont élevées dans toutes les stations, y compris pour des organismes herbivores (larves de Baetidae), ce qui indiquerait une contamination générale des réseaux trophiques par des apports d'azote liés à des épandages.

Lorsque les résultats obtenus sont regroupés par station, il est possible de mettre en évidence un gradient de  $\delta^{15}\text{N}$  entre l'amont et l'aval du ruisseau en mai (Fig. 2). En septembre, le gradient est inversé (la station A est celle où la valeur de  $\delta^{15}\text{N}$  est maximale). Des épandages ont sans doute été réalisés dans la partie amont du bassin versant entre les deux dates. Dans ces conditions, la station située la plus en amont (AA) constituerait la meilleure référence, même si est, elle-aussi, contaminée.



**Figure 2.** Valeurs moyennes ( $\pm$  erreur standard) de l'enrichissement en isotopes stables du carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) et de l'azote ( $\delta^{15}\text{N}$ ) mesurés sur les macro-invertébrés benthiques échantillonnés dans les différentes stations en mai (symboles pleins) et en septembre 2002 (symboles ouverts).

L'analyse détaillée des données a montré que l'enrichissement en azote d'origine anthropique était particulièrement important pour les larves d'Éphéméroptères herbivores (Baetidae et Heptageniidae) et de Trichoptères suspensivores (Hydropsychidae). Une partie de l'azote est vraisemblablement incorporée dans les biofilms dont se nourrissent les larves d'Éphéméroptères. Une fraction significative pourrait aussi parvenir au ruisseau en étant associée à des particules, lesquelles seraient captées par les larves d'Hydropsychidae. Aucun enrichissement n'a été observé en revanche pour les Gammaridae qui se nourrissent essentiellement à partir des apports de litière en provenance des berges.

## Conclusion

Ces résultats soulignent l'intérêt de l'utilisation de la mesure du degré d'enrichissement en isotopes stables du carbone et de l'azote pour l'étude des réponses des communautés de macro-invertébrés et des réseaux trophiques vis-à-vis de perturbations variées :

- En mésocosme, les effets de xénobiotiques sur la structure des communautés planctoniques se traduisent par des modifications des ressources alimentaires disponibles pour certains macro-invertébrés. Les prédateurs tels que les notonectes semblent constituer de bons organismes modèles pour ce genre d'étude. Toutefois, des travaux complémentaires sont encore nécessaires avant de pouvoir conclure sur la pertinence de cet outil en écotoxicologie.
- En milieu naturel, les apports d'azote par épandage de déchets d'élevage sont essentiellement mis en évidence par une augmentation du  $\delta^{15}\text{N}$  des consommateurs primaires qui se nourrissent de biofilms. Le caractère fortement anthropisé du système étudié rend toutefois difficile l'utilisation de l'outil isotopique dans ce type d'écosystème, la contamination étant importante depuis la tête du bassin versant.

## Références bibliographiques

- [1] Van der Zanden & Rasmussen, 2001. *Limnol. Oceanogr.* 46, 2061-2066.
- [2] Caquet T., 2006. *Environ. Pollut.* 141, 54-59.
- [3] Caquet T. et al., 2005. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1116-1124.
- [4] Karr et al., 2003. *Agr. Ecosyst. Environ.* 95, 103-110.

## Élaboration et validation d'un indice d'état biologique des sols

S. Barray<sup>1</sup>, K. Laval<sup>2</sup>, M. Legras<sup>2</sup>, C. Mougin<sup>3</sup>, S. Taibi<sup>4</sup> et D. Tessier<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Microbiologie du Froid, Université de Rouen, 76281 Mont-Saint-Aignan Cedex

<sup>2</sup>Laboratoire BioSol, ESITPA, 13 rue du Nord, 76000 Rouen

<sup>3</sup>INRA, Unité PESSAC Physico-chimie et Écotoxicologie des Sols d'Agrosystèmes Contaminés, RD 10, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex

<sup>4</sup>LAMSAD, ESITPA, 13 rue du Nord, 76000 Rouen

### Contexte

L'analyse de l'influence respective des facteurs anthropiques (pratiques agricoles) et environnementaux (apports de contaminants) sur l'état du sol et son fonctionnement biologique, passe dans les agrosystèmes par une étape de modélisation. Cette dernière implique la connaissance de la structure des sols (composition, richesse, abondance relative des populations) et des facteurs biotiques (compétition entre espèces, prédation...) ou abiotiques (nutriments biodisponibles, oxygénation, température, pH, pollutions...) qui les régulent.

La composante microbiologique assure en grande partie les fonctions biologiques d'un sol. La mise au point de bioindicateurs microbiens nécessite tout particulièrement une démarche méthodologique pluridisciplinaire et l'établissement de référentiels permettant de valider ces outils à des fins prédictives et/ou rétrospectives, et donc de pallier les biais méthodologiques relatifs à chacune des méthodes. En effet, la problématique de développement de bioindicateurs est confrontée à deux niveaux de régulation : (1) variabilité, sensibilité, robustesse du bioindicateur lui-même (organisme ou communautés d'organismes), mais aussi (2) validité de la variable descriptive de cet indicateur (méthode et méthodologie). Ainsi, le compartiment microbien peut être décrit par des variables dont les réponses suivent des fonctions mathématiques spécifiques de chaque bioindicateur mais aussi de la méthodologie employée pour déterminer la variable descriptive correspondante.

### Objectifs

Les objectifs généraux du projet consistent en :

- L'établissement d'un indice d'état biologique du sol qui devrait permettre *a minima* une classification hiérarchique de l'impact relatif des pratiques agricoles (de l'impact du travail du sol à l'impact des intrants phytosanitaires et autres polluants) selon un modèle comparable à un indice de qualité de l'air.
- Une analyse critique des différentes variables descriptives au travers d'une analyse comparative et intégrative des approches permettant d'accroître les connaissances fondamentales concernant les relations structure/fonctions.
- La mise au point et/ou la validation de nouvelles technologies pour l'évaluation des communautés microbiennes telluriques.
- La mise en perspective des résultats au regard des propriétés des sols d'ordre physique, chimique et physico-chimique, révélatrices de contextes pédoclimatiques, et par delà de fonctionnement des sols sous différents modes de gestion. Ceci devrait permettre de donner aux indices précédents une portée générale.

## Matériels et méthodes

Dans un premier temps, nous mesurons 45 variables physico-chimiques et biologiques sur des échantillons provenant de 2 sites (incluant prairies et grandes cultures) afin de tester la variabilité des descripteurs au champ, en fonction de l'usage du sol et du climat. Dans un second temps, les sols (provenant d'un des deux sites) sont mis en cosmes sans déstructuration, puis incubés en extérieur à l'INRA de Versailles en présence de polluants. Les variables descriptives sont mesurées au cours du temps (1 semaine ; 5 semaines ; 2 mois) dans les cosmes mais également dans les parcelles de référence. La mise en relation mathématique de l'ensemble des résultats est en cours.

## Résultats

### *Expérimentations au champ*

Les premières analyses statistiques intégrant l'ensemble des paramètres ont permis de mettre en évidence que la variabilité intra-parcellaire est plus élevée en sols de prairie qu'en sols de grande culture. Elle est plus élevée sur le site de Saint George que sur le site d'Yvetot, mais demeure modérée à l'échelle mesurée. Pour la majorité des variables, l'effet "pratique culturale" domine sur les effets "date (climat)" et "site", ce qui permet d'envisager l'élaboration d'un indice d'état biologique des sols sensible aux activités anthropiques et indépendant de l'évolution naturelle des sols (applicable dans le cadre de sols limoneux du Nord Ouest de la France).

Ces premiers résultats ont donc permis d'établir des valeurs caractéristiques en sols de référence : prairies / grandes cultures. Les variables biologiques en sols de prairie étant en moyenne trois fois supérieures à celles observées en grande culture, l'impact écotoxicologique d'un apport de polluants devra être évalué en considérant la nature différente de ces situations.

Cette approche multidisciplinaire permet d'établir les relations entre les différentes variables. Ainsi les régressions multiples donnent accès à l'estimation d'une variable par une combinaison mathématique des autres variables mesurées (première étape de réflexion dans une démarche de modélisation), les corrélations relient les activités enzymatiques exprimées aux différents compartiments microbiens.

### *Expérimentations en cosmes*

L'impact des polluants est évalué en maintenant la quantification de l'ensemble des variables descriptives, dans des cosmes prenant en compte les deux pratiques culturales de référence (prairie permanente et grande culture) pour le site d'Yvetot où la conduite des prairies est plus représentative des pratiques actuelles. Les cosmes ont été traités par le sulfate de cuivre à deux concentrations, représentatives pour l'une d'un usage en culture légumière (2 ppm) et pour l'autre d'une utilisation en viticulture (200 ppm).

Des effets contrastés sont observés en fonction des paramètres par rapports aux mêmes sols non traités servant de témoins, cependant l'amplitude des variations reste toujours inférieure à la variabilité notée au champ ou encore à l'évolution propre de l'échantillon en cosme et/ou au champ.

## Conclusion

Actuellement, nos résultats suggèrent que des effets écotoxiques dans les sols sont moins marqués que des effets liés aux pratiques (labour...). Dans des systèmes non déstructurés, une éventuelle toxicité de polluants s'exprimerait peu, alors qu'elle serait plus forte après un stress physique du sol entraînant une forte activité microbienne.

Les résultats présentés ont été acquis dans le cadre du programme « Bioindicateurs » soutenu par l'ADEME. Les auteurs remercient tous les personnels qui se sont impliqués dans ces travaux.

## Caractérisation de l'écotoxicité des sols d'un site de traitement de bois avant leur phytoremédiation

M. Mench et C. Bes

INRA, UMR BIOGECO, Biodiversité, Gènes et Écosystèmes, 1 avenue des Facultés, 33405 Talence

En Aquitaine, l'industrie du bois est fort développée et compte plus de 150 entreprises, dont des sites de traitement du bois [1]. Certains sont historiquement contaminés par des produits de traitement. Caractériser l'écotoxicité de leurs sols est une étape complémentaire de l'analyse physico-chimique et un préalable avant leur éventuel assainissement par différentes techniques dont celles de phytoremédiation. Une série de sols a été collectée sur un site dont l'activité remonte au 19<sup>ème</sup> siècle. La créosote, le  $\text{CuSO}_4$  et le CCA ont été successivement utilisés dans les formulations en tant que fongicides et/ou insecticides. Fuites de fluides de traitement, lixiviats de bois traités, déchets et poussières ont disséminé les produits et sont les sources de contamination des sols. L'étude rapporte la composition des sols et les réponses de bioindicateurs terrestres exposés en microcosmes: laitue, radis, vers de terre (*Dendrobaena octaedra*) et limace (*Arion rufus*).

### Matériels et Méthodes

Les stations ont été sélectionnées à partir d'une prospection des communautés végétales en place, de photos d'archives et de témoignages d'employés. A l'aide de photos aériennes, des bâtiments détruits ont été localisés, ainsi que les infrastructures actuelles et les zones sans végétation. Les stations 1 à 4 se situent dans une ancienne zone de stockage du bois traité (les stations 1 à 3 explorées pour évaluer la variabilité spatiale ont été ensuite regroupées en une station, la 3), la 5 dans une zone en friche, la 6 près d'un stockage de poteaux, la 7 sur l'emplacement de l'ancienne usine de traitement. La station 8 correspond à une zone de stockage de piquets. La 9 est au droit d'un chemin correspondant à une ancienne voie ferrée et la 10 est un jardin potager adjacent.

Pour chaque sol, 3 kg de terre ont été prélevés dans l'horizon 0-0,25 m (Afnor AF X31-100). Les paramètres des végétaux étaient la germination (NFX 31-201) et les biomasses (ISO 11269-2) des feuilles et racines [2,3]. On a étudié d'une part, l'évitement et la mortalité des vers de terre et d'autre part, l'herbivorie et la mortalité des limaces, en microcosme et exposition chronique [2]. Les réponses des bioindicateurs ont été normalisées et traduites en classes d'écotoxicité (1 non écotoxique à 4 forte écotoxicité) par rapport à des sols témoins négatifs de même type (*Arenic Udifluvent*) à texture sableuse.

### Résultats - Discussion

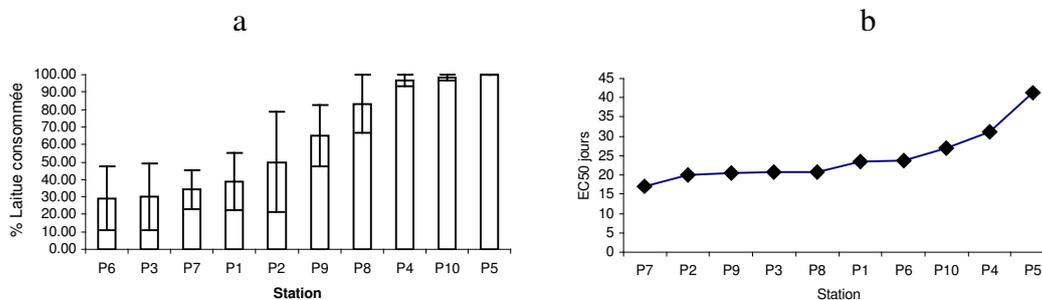
Les sols sont sableux, avec une faible CEC à leur pH respectif qui varie de 5,5 (P10) à 8,2 (P8) (Tab. 1). Le sol P10 n'a reçu que des retombées atmosphériques. Des empièvements calcaires ont été réalisés pour faciliter le transport du bois aux P8 et P9. Des sols (e.g. P3, P4, et P6) ont une teneur moindre en matière organique. Les diagnostics de danger et de contamination, par rapport au fonds pédogéochimique des sols sableux français [4] établissent Cu comme contaminant majeur, parmi les composés inorganiques recherchés, dans tous les horizons de sol de surface. Sa concentration dans P3 et P7 excède 456 et 813 fois la valeur

médiane des sols sableux français. Le Cu migre souvent peu vers les horizons profonds [5]. La valeur seuil d'investigation de Baize [4], *i.e.* 35 mg Cu kg<sup>-1</sup>, est dépassée. La contamination en surface reflète plus les formulations au CuSO<sub>4</sub>. Le chrome et As (sauf au P8) sont au niveau du fonds pédogéochimique. Cr(VI) et As(V) ont pu migrer en profondeur. Selon l'équation de Sauvé [6], pCu<sup>2+</sup> varierait entre 7,1 (P6) et 11 (P8). La solution du sol serait une source d'exposition des racines au Cu. Les concentrations prédites sans effet négatif (PNEC) sont également dépassées pour le pyrène et le benzo[a]pyrène au P3.

**Tableau 1.** Caractéristiques physico-chimiques des sols.

Sols	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
C org (g/kg)	9,2	10,1	11,6	9,6	15,7	9,4	17,6	19,6
N total (g/kg)	0,53	0,70	0,83	0,41	0,62	0,43	0,56	1,04
C/N	17,2	14,4	13,9	23,5	25,1	21,9	31,5	18,9
MO (g/kg)	15,9	17,4	20	16,7	27,2	16,2	30,4	33,9
CEC (cmol <sup>+</sup> /kg)	3,5	5,2	5,0	2,1	1,9	4,5	3,4	6,0
pH	7,0	7,7	6,7	6,1	7,0	8,2	7,9	5,5
As (mg/kg)	9,8	12,1	20,2	14,4	26,3	52,8	12,6	11,6
Cr (mg/kg)	23	24	26	22	31	87	20	28
Cu (mg/kg)	<b>1460</b>	<b>260</b>	<b>65</b>	<b>536</b>	<b>2600</b>	<b>185</b>	<b>2390</b>	<b>118</b>
Ni (mg/kg)	5	5,58	5,18	5,7	7,11	6,81	12,3	7,02
Zn (mg/kg)	46	59,7	31,8	21,4	57,7	37,8	65,5	67,8
Co (mg/kg)	2	2,09	2	1,73	2,46	2,44	4,39	2,95
Σ7 PCB (mg/kg)	<0,035							
B[a]P (mg/kg)	0,64							
pCu <sup>2+</sup> (μM)	7,6	10,1	9,7	7,1	7,2	11,1	8,6	7,5

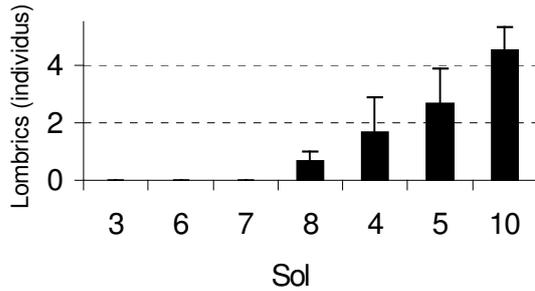
La teneur en Cu du sol n'influe pas significativement sur le temps de résidence des limaces sur le sol ou leur mortalité, mais affecte leur comportement alimentaire ( $p=0,009$ ) (Fig. 1). Le taux d'herbivorie est réduit pour les sols 6, 3 et 7 ayant les faibles pCu<sup>2+</sup> (Fig. 1a, Tab. 1). Le sol 7 occasionne la mortalité la plus rapide des limaces. Des tests sur limaces montrent que Cu agit comme un repoussant et est létal pour elles [7].



**Figure 1.** Pourcentage de laitue consommée (a) par les limaces et mortalité (b) en fonction de la station (EC50: nombre de jours pour obtenir 50 % de mortalité des limaces)

La contamination en Cu affecte ( $p<0,001$ ) le comportement des lombrics. Ils se localisent toujours dans les sols les moins contaminés et évitent le contact dermal et/ou d'ingérer les sols à faible pCu<sup>2+</sup> (P3, P6, et P7) (Fig. 2). Les vers de terre éviteraient les sols avec des apports anthropiques de Cu même aux faibles concentrations (4 mg Cu kg<sup>-1</sup> sol) ; aux concentrations supérieures à 600 mg Cu kg<sup>-1</sup> sol, l'évitement atteint 100 % [8].

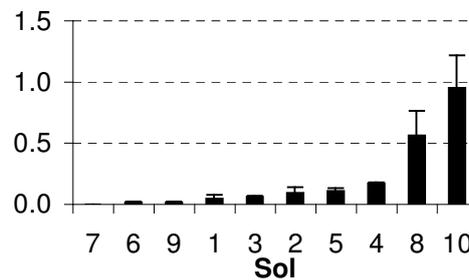
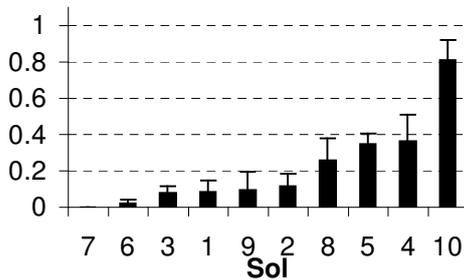
La germination des laitues ( $p=0,02$ ), les biomasses (MS) des feuilles de radis ( $p<0,001$ , Fig. 3a) et des racines de radis ( $p<0,01$ , Fig. 3b) diffèrent selon les sols, mais pas la germination des radis, ni la biomasse des feuilles de laitues. Les sols 7, 6 et 3 sont les plus phytotoxiques.



**Figure 2.** Nombre moyen de lombrics présents selon les sols (3 réplifications). Les histogrammes surmontés de lettres différentes sont significativement différents.

**Tableau 2.** Moyenne des classes d'écotoxicité des sols.

Station	Moyenne des classes	Rang
10	1.85	1
8	2.00	2
4	2.40	3
5	2.50	4
1	2.57	5
2	2.57	5
9	2.57	5
3	3.00	8
6	3.20	9
7	3.20	10



**Figure 3.** Biomasse de matière sèche (MS) des feuilles (a) et des racines (b) des radis selon les sols.

Le sol 8, assez écotoxique pour les 2 invertébrés, est moins phytotoxique pour les radis et les laitues. Schultz *et al.* [9] rapportent une moindre germination des laitues à 2330 mg Cu kg<sup>-1</sup> sol et Chen *et al.* [10], l'inhibition de la biomasse du radis par des sols contaminés mais pas celle de leur germination.

La moyenne des valeurs des classes d'écotoxicité relatives aux variables des tests ordonne les sols selon leur écotoxicité (Tab. 2). Le sol 7 est le plus écotoxique. Si l'on excepte ce dernier, une corrélation linéaire ( $r^2 = 0,72$ ) existe entre pCu<sup>2+</sup> calculé (Tab. 1) et l'écotoxicité de chaque sol (Tab. 2). Celle-ci est moins reliée à la teneur totale en Cu du sol. L'organisation des communautés végétales sur le site montre une richesse spécifique plus faible pour les stations 7 et 3, et conforte les tests de phytotoxicité. La restauration de la croissance de haricots sur le sol phytotoxique P7, après un amendement alcalin et/ou de matière organique, suggère le pH et les teneurs en matière organique et Cu comme des facteurs contrôlant l'exposition des racines au Cu<sup>2+</sup> *via* la solution de sol et l'écotoxicité des sols étudiés.

#### Références bibliographiques

- [1] [www.industrie.gouv.fr/sessi/index.htm](http://www.industrie.gouv.fr/sessi/index.htm).
- [2] Bes, 2005. Phytostabilisation assistée d'un site contaminé au CCA: Caractérisation de l'écotoxicité du site, choix des amendements et implantation d'espèces végétales tolérantes. Mastère II Modélisation et fonctionnement des écosystèmes terrestres, Université Bordeaux I, UFR des Sciences Biologiques. 39 p.
- [3] Mench *et al.*, 2005 1<sup>st</sup> Scientific Workshop and Management Committee Meeting, Phytotechnologies to promote sustainable land use and improve food safety, Cost 859, 14-16 June 2005, CNR Research Campus, Pisa, Italy.
- [4] Baize, 1997. Un point sur les teneurs totales des éléments traces métalliques dans les sols (France), Paris.
- [5] Lepp *et al.*, 1997. *Environ. Pollut.* 95, 363-369.
- [6] Sauvé, 2003. Modelling trace element exposure and effects on plants. pp. 69-70. In Risk assessment and sustainable land management using plants in trace element-contaminated soils, M. Mench, B. Mocquot (Eds.), Cost Action 837, 4<sup>th</sup> WG2 Workshop, Bordeaux'2002, INRA, Centre Bordeaux-Aquitaine, Villenave d'Ornon, France.
- [7] Schuder *et al.*, 2004. *Pest Mgmt Sci.* 60, 1171-1177.
- [8] Zwieten *et al.*, 2004. Review of impacts on soil biota caused by copper residues from fungicide application. p 8 In Sydney (ed.), *Supersoil 2004*, Sydney, Australia.
- [9] Schultz *et al.*, 2004. *Sci. Total Environ* 326, 71-84.
- [10] Chen *et al.*, 2002. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 439-444.



## Session 6

### **Bioremédiation et bioprocédés**



## Phytotoxicité d'un sol contaminé par des produits de traitement du bois après un amendement pour stabiliser des contaminants

C. Bes et M. Mench

INRA, UMR BIOGECO, Biodiversité, Gènes et Écosystèmes, 1 avenue des Facultés, 33405 Talence

Des concentrations élevées en Cu, atteignant jusqu'à 2 600 mg Cu kg<sup>-1</sup>, se sont accumulées dans les horizons de surface des sols d'un site de traitement du bois par imprégnation, exploité depuis le 19<sup>ème</sup> siècle. De la créosote, du CuSO<sub>4</sub> et du CCA (arséniate de cuivre chromé) ont été successivement utilisés dans les formulations. Fuites de fluides de traitement, lixiviats de bois traités, déchets et poussières ont disséminé les produits et sont les sources de contamination des sols. La remédiation des sols les plus contaminés et écotoxiques de ce site par la technique de phytostabilisation aidée comprend une première étape de stabilisation des contaminants par un amendement. L'hypothèse est de rendre les contaminants moins solubles en favorisant dans le sol des réactions d'adsorption, d'échange d'ions et/ou de sorption avec des oxydes et hydroxydes (Fe, Mn, Al) [1,2]. Plusieurs mécanismes sont possibles pour immobiliser le Cu de la solution du sol. Sous sa forme soluble, Cu<sup>2+</sup> a une affinité pour l'oxygène et donc se lie avec les oxydes, hydroxydes de la matière organique [3], avec les phosphates [4], avec les oxydes de Fe et de Mn [5]. La concentration en Cu dans la solution du sol et donc l'exposition des racines passe par un minimum lorsque le pH croît, puis réaugmente sous l'effet de la solubilité des complexes organiques [6]. Ces mécanismes n'ayant pas la même efficacité selon les sols, nous les avons testés en vases de végétation. L'efficacité de la stabilisation peut être évaluée par différents bioindicateurs dont des récepteurs végétaux tels que le haricot qui est sensible à la contamination. On présente l'évolution de la phytotoxicité d'un sol contaminé par des composés issus du traitement du bois (Cu, As, HAP) après l'apport d'amendements susceptibles d'immobiliser Cu et As et/ou de faciliter la biodégradation des HAPs.

### Matériels et Méthodes

Le sol P7, contaminé en Cu, est un sol sableux de Graves (Arenic Udifluent) issu d'un site girondin d'imprégnation du bois (Tab. 1). Un sol de jardin non contaminé est utilisé comme contrôle négatif. Les amendements utilisés sont (en % par rapport au sol séché à l'air) : grenailles d'acier (ZVIG) (1 %), compost (C, 5 %), tourbe (5 %), beringite (B) (5 %), sépiolite (SEP, 5 %), silicates de Fe:Mn (0,25 et 0,5 %), MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub> et oxyde de calcium (CaO) (0,05, 0,1, et 0,3 %). Ces amendements sont apportés seuls ou en combinaison avec 1 % ZVIG. Après mélange par rotation, les sols sont placés en pots plastiques de 1 kg, réhydratés à 50 % de la capacité de rétention avec de l'eau distillée et placés en chambre climatique. Pour les traitements combinés avec 1 % ZVIG, l'apport du second amendement est effectué au bout de 2 semaines. Enfin après 2 autres semaines, chaque pot reçoit 20 mL d'une solution rhizosphérique (obtenue par agitation de la même quantité d'eau distillée et de sol rhizosphérique, issu du secouage de racines de trèfle blanc cultivé sur une parcelle de référence, et récupération du surnageant). La phytotoxicité est déterminée par le test PlantTox avec *Phaseolus vulgaris* L, cv. vroege Limburgs [7]. Les haricots sont cultivés en pots placés en chambre climatique avec les conditions suivantes: 14 h jour/8 h nuit, 150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 25°C/22°C, 65 % d'humidité relative. Le développement des plantes a été quotidiennement noté avec un indice. Des paramètres biométriques (indice de croissance,

biomasses des organes: parties aériennes, feuilles primaires et racines, nombre de nodules sur racines), biochimiques (densités de chlorophylles et caroténoïdes, activité gâïacol-peroxydase des feuilles comme indicateur de stress oxydant) et les concentrations des éléments majeurs et traces dans les feuilles primaires sont déterminés au bout de 2 semaines.

**Tableau 1.** Caractéristiques des sols utilisés.

	Pierroton	P7	Fonds pédogéochimique sols sableux français [8]
sables (%)	93	86	
C/N	25,9	25,1	
Matière organique (g/kg)	33,7	27,0	
pH	6,8	6,4	
CEC (cmol/kg)	5,9	1,9	
As (mg/kg)		26,3	1,0 - 25
Cr total HF (mg/kg)	6,7	31	14,1 – 40,2
Cu total HF (mg/kg)	3,5	2600	3,2 – 8,4
Fe total HF (mg/kg)	1090	9060	6000 - 14300
Zn total HF (mg/kg)	10,3	58,0	17 - 48

## Résultats – Discussion

Les modifications de pH (Tab. 2), les réactions de sorption induites et/ou les phases porteuses, introduites ou développées dans le sol, aboutissent à former une série de sols avec un gradient de  $pCu^{2+}$  en solution et de nutriments. D'après le pH et le Cu total,  $pCu^{2+}$  devrait varier entre 6 et 9,2  $\mu M$ , avec une solubilité de Cu plus élevée pour ZVIG combiné avec la tourbe et plus faible pour ZVIG combiné avec CaO.

**Tableau 2.** pH mesuré et  $pCu^{2+}$  calculé selon Sauvé [6] pour les sols amendés

Amendement	pH	$pCu^{2+}$ ( $\mu M$ )
ZVIG (1%)+tourbe (5%)	6.03	6.06
ZVIG (1%)+MnSO <sub>4</sub>	6.74	7.05
ZVIG (2%)	6.83	7.18
ZVIG (1%)+MgSO <sub>4</sub>	6.96	7.36
non traité	7.01	7.43
ZVIG (1%)	7.06	7.49
ZVIG (1%)+ZVIG (1%)	7.2	7.69
ZVIG (1%)+FeMn (0,5%)	7.38	7.94
ZVIG (1%)+FeMn (0,25%)	7.61	8.27
ZVIG (1%)+SEP (5%)	7.79	8.52
Contrôle	7.84	8.59
ZVIG (1%)+B (5%)	8.14	9.01
ZVIG (1%)+CaO (0,1%)	8.27	9.19

La contamination du sol non traité abaisse de 77 % la biomasse des parties aériennes du haricot par rapport au sol contrôle (Fig. 1). L'apport d'amendement et la diminution de Cu dans la solution du sol permettent de restaurer la biomasse des parties aériennes sauf pour les traitements ZVIG+tourbe, ZVIG+FeMn 0,25 et ZVIG (2 %). Les 3 traitements les plus bénéfiques à la biomasse des parties aériennes sont les combinaisons de ZVIG avec la béringite, MgSO<sub>4</sub> et la sépiolite. L'effet n'est pas seulement dû au pH si l'on compare avec CaO. Le fractionnement de l'apport de grenailles accroît leur efficacité. L'effet des matières organiques diffère selon leur nature. L'apport de tourbe combiné à ZVIG a la moindre efficacité, tandis que l'apport d'un compost de fumier de cheval, combiné à ZVIG (1 %) ou ZVIG (1 %+ 1 %), rétablit la croissance au niveau du sol contrôle (*i.e.* g MF/ plante, C+ZVIG 2,67 ± 0,67, C+ZVIG (1 %+1 %) 3,33 ± 0,36, contrôle 3,22 ± 0,34). Les résultats sont similaires pour les racines. Les concentrations en Cu des feuilles primaires varient de 8 à 324 mg kg<sup>-1</sup> MS et excèdent les seuils de phytotoxicité dans les feuilles du haricot (15-30 mg Cu kg<sup>-1</sup> MS [9]) dans 7 des sols. L'activité GuPx des feuilles primaires s'inscrit dans

l'intervalle 0,9 – 1,45 fois par rapport au sol contrôle, sans relation dose-effet avec l'imprégnation en Cu. Elle augmente pour le traitement silicates de Fe:Mn avec l'accumulation de Mn dans les feuilles primaires (Fig. 2a) et indique un stress oxydant. L'inhibition de l'allongement des cellules par Cu fait croître la densité de chlorophylle totale (Fig. 2b) et des caroténoïdes totaux (« bronzing »).

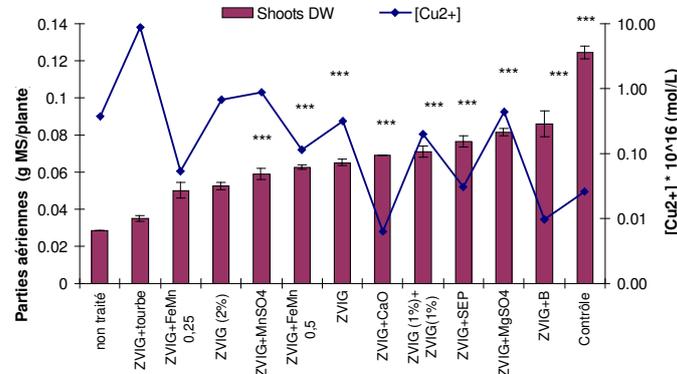


Figure 1. Biomasse des parties aériennes des haricots et pCu<sup>2+</sup> calculé [6].

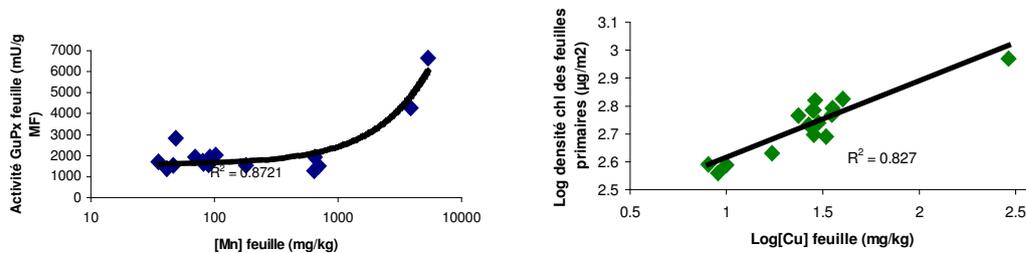


Figure 2. Activité GuPx (a) et densité de chlorophylle (b) dans les feuilles primaires.

La concentration en P des feuilles primaires varie de 1,6 à 6,8 mg g<sup>-1</sup> MS. Les modifications des teneurs en Ca, Fe, Mn et Zn des feuilles ne sont pas corrélées avec leur imprégnation en Cu. Elles reflètent l'évolution de biomasse et la nature des amendements. Les mécanismes de sorption de Cu par la béringite, la sépiolite ou le compost combiné à ZVIG permettent de restaurer la croissance du haricot mais leur persistance et effets sur d'autres récepteurs biotiques et abiotiques sont à étudier en parcelles sur le long terme.

#### Références bibliographiques

- [1] Williford *et al.*, 2001. Physical separation of metal-contaminated soils. pp. 121-166 in I.K. Iskandar (ed.), Environmental restoration of metal-contaminated soils. Lewis publishers.
- [2] Mench *et al.*, 2005. Phytostabilisation of metal-contaminated sites. pp. 109-190, in Phytoremediation of metal-contaminated soils, Morel J.L. et al (Eds.), Springer, The Netherlands.
- [3] Garrido *et al.*, 2005. *Appl. Géochimie*. 20, 397-408.
- [4] Maenpaa *et al.*, 2002. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 389-398
- [5] Kumpiene *et al.*, 2006. *Environ. Pollut.* 144 (in press).
- [6] Sauvé, S., 2003. Modelling trace element exposure and effects on plants. pp. 69-70. In Risk assessment and sustainable land management using plants in trace element-contaminated soils, M Mench, B Mocquot (Eds.), Cost Action 837, 4<sup>th</sup> WG2 Workshop, Bordeaux'2002, INRA, Centre Bordeaux-Aquitaine, Villenave d'Ornon, France.
- [7] Ruttens *et al.*, 2006. *Environ. Pollut.* (in press).
- [8] Baize, D. 1997. Un point sur les teneurs totales des éléments traces métalliques dans les sols (France), Paris.
- [9] MacNicol & Beckett, 1985. *Plant Soil* 85, 107-129.

Les auteurs remercient l'Ademe, Département sites et sols pollués, Angers et le Conseil Régional d'Aquitaine.

## Traits fonctionnels d'espèces d'intérêt (*Sporobolus tenacissimus*, *Carex praecox*, *Amorpha fruticosa*, et *Agrostis capillaris*), pour phytoremédier des sols contaminés sur un site de traitement du bois

M. Mench<sup>1</sup>, H. Gasté<sup>1</sup>, J. Taberly<sup>1</sup>, M. Aulen<sup>1</sup> et S. Gawronski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR BIOGECO, Biodiversité, Gènes et Écosystèmes, 1 avenue des Facultés, 33405 Talence

<sup>2</sup>Dept. Pomology and Basic Natural Sciences in Horticulture, Faculty of Horticulture and Landscape Architecture, Ul. Nowoursynowska 159, PL 02776, Warsaw, Pologne

Les sols de sites contaminés sont des sources d'exposition aux contaminants qui peuvent être assainies par des techniques de génie civil, de la physico-chimie ou des sciences de la vie. Les biotechnologies basées sur les plantes et micro-organismes associés, *i.e.* phytoremédiation, relèvent de la dernière catégorie. Leur efficacité s'affirme pour décontaminer des sols (phytoextraction, phytodégradation) ou diminuer une source d'exposition comme la solution du sol (phytostabilisation) [1]. Cependant des domaines d'investigation restent ouverts tels le choix et l'amélioration du matériel végétal, notamment des plantes natives de sites contaminés. Dans cette étude, de la créosote, du CuSO<sub>4</sub> et du CCA (arséniate de cuivre chromé) ont été successivement utilisés pour traiter du bois sur un site. Fuites de fluides de traitement, lixiviats de bois traités, déchets et poussières ont disséminé les produits et contaminé les sols en surface jusqu'à 2600 µg Cu g<sup>-1</sup>. L'objectif est de connaître l'aptitude de 4 espèces végétales à phytostabiliser les contaminants et à faciliter la revégétalisation. Les traits fonctionnels en réponse à l'exposition au Cu sont étudiés sur des espèces herbacées natives, *Sporobolus tenacissimus*, *Carex praecox* et *Agrostis capillaris*, et un ligneux, *Amorpha fruticosa*, en comparant des biotypes d'origine métallicoles et non-métallicoles. Ces espèces d'intérêt sont cultivées en pots sur une série de sols à l'exposition en Cu croissante.

### Matériels et Méthodes

Le sol non contaminé est un podzol sableux de lande forestière humide (INRA Pierroton, Cestas), cultivée et régulièrement chaulé (Tab. 1). Le sol P7, contaminé en Cu, est un sol sableux de Graves (*Arenic Udifluent*) issu d'un site girondin d'imprégnation du bois.

Tableau 1. Caractéristiques des sols utilisés.

	Pierroton	P7	Fonds pédogéochimique sols sableux français [2]
sables (%)	93	86	
C/N	25,9	25,1	
Matière organique (g/kg)	33,7	27,0	
pH	6,8	6,4	
CEC (cmol/kg)	5,9	1,9	
As (mg/kg)		26,3	1,0 - 25
Cr total HF (mg/kg)	6,7	31	14,1 – 40,2
Cu total HF (mg/kg)	3,5	2600	3,2 – 8,4
Fe total HF (mg/kg)	1090	9060	6000 - 14300
Zn total HF (mg/kg)	10,3	58,0	17 - 48

Chacune des espèces végétales a été cultivée (3 réplifications) sur une série de sols formant

un gradient de contamination en Cu, obtenu par mélange de 0, 250, 500, 750 et 1000 g de sol contaminé (P7) complété à 1000 g avec le sol non contaminé. Le pH des sols est mesuré selon la norme Afnor X31-103 (Hanna Instruments pH210, électrode Ag/AgCl). Les concentrations en Cu dans chaque solution du sol, recueillie par un Rhizon MOM, ont été déterminées par ICP-AES radiale. Des plants métallicoles d'*A. fruticosa* de 1 an, issus d'un semis de graines provenant d'un site contaminé en Cu en Pologne [3] ont été utilisés. *Agrostis capillaris*, *C. praecox* et *S. tenacissimus* ont été prélevés sur le site contaminé (métallicole, M) et dans des sites non contaminés (non métallicole, NM) - Route forestière (Belin Beliet), friche à Martillac (33), bois à Gradignan (33). *A. capillaris* (30 mg de graines par pot), *S. tenacissimus* et *C. praecox* (3 transplants/pot), et *A. fruticosa* (1 transplant/pot) ont été placés 14 semaines (février - mi-mai) sous serre non chauffée à humidité régulée, en pot de 1 kg et arrosés (eau déminéralisée) tous les 1-2 jours jusqu'à 70 % de la capacité de rétention en eau. Les hauteurs des plus hauts brins, le nombre et la longueur des feuilles, le nombre de rejets ont été mesurés. Les parties aériennes ont été coupées puis pesées avant et après séchage en étuve ventilée (65 °C).

## Résultats – Discussion

Le Cu total croît sur la série de sols de 3,5 à 2600  $\mu\text{g g}^{-1}$  mais le pH décroît seulement de 0,4 unité (Tab. 2). L'équation de Sauvé [4] sous-estime le Cu soluble dans la solution du sol (Tab. 2) qui varie de <0,3 à 12  $\mu\text{M}$ .

**Tableau 2.** Série de sols utilisée pour le gradient d'exposition au Cu en vases de végétation

	100%	75%	50%	25%	0%
Sol non contaminé	100%	75%	50%	25%	0%
Sol contaminé (P7)	0%	25%	50%	75%	100%
pH du sol	6,83 ± 0,06	6,50 ± 0,08	6,40 ± 0,04	6,44 ± 0,10	6,40 ± 0,05
Cuivre total ( $\mu\text{g Cu g}^{-1}$ )	3,5	652	1301	1951	2600
pCu <sup>2+</sup> ( $\mu\text{M}$ ) [4]	0	0,02	0,13	0,24	0,48
Cu en solution du sol ( $\mu\text{M}$ )	<0,3	3,46	4,19	12,05	10,57

**A. capillaris.** En termes de productivité, les EC 50 des biotypes NM et M sont respectivement 940 et 2275  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$  (Fig. 1A). La densité d'individus est plus importante chez le biotype NM jusqu'à 1951  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$ . La croissance des plants M est plus performante aux fortes contaminations (> 652  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$ ). La sélection sur le site contaminé conserverait des individus tolérants.

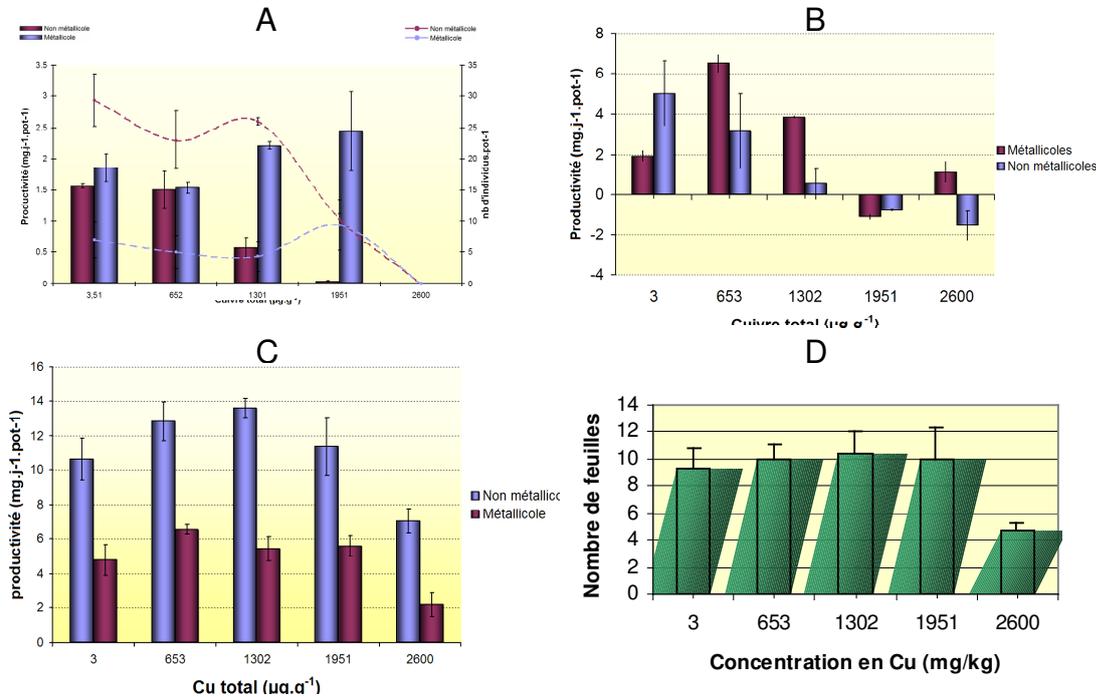
**S. tenacissimus.** La productivité des transplants NM décroît à partir de 1302  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$  (Fig. 1B). Les transplants M présentent un optimum de croissance entre 653 et 1302  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$ . Les transplants M et NM arborent respectivement des feuilles chlorosées à partir de 1302 et 1951  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$ . Le nombre moyen de brins par transplant M décline à partir de 1302  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$  puis reste constant à 2600  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$ . Pour les NM, une baisse significative n'est observée qu'à 1951  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$ . Le nombre de rejets reste constant pour les M jusqu'à 1302  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$  puis s'annule au-delà. Pour les NM, une diminution forte est constatée dès 1302  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$ . La hauteur du plus haut brin par transplant des M est faiblement supérieure à celle des NM pour les concentrations de 3 et 653  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$  sol. Au-delà les deux biotypes présentent une même réponse avec une diminution à partir de 1951  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$  sol.

**C. praecox.** Les transplants M sont moins productifs sur tout le gradient (Fig. 1C), le nombre de nouveaux rejets diminue d'un facteur 3, et la densité de chlorophylle foliaire baisse à partir de 1951  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$ . Les plantes NM sont les seules à fleurir. Le nombre d'inflorescences augmente jusqu'à 1302  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$  puis chute. La biomasse des nouveaux rejets des NM est maximale à 1951  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$ . Cependant les biomasses initiales sont plus importantes chez les NM (2,3 fois celles des M) avec probablement des nutriments en réserves et des systèmes racinaires n'ayant pas encore accumulé de Cu.

**A. fruticosa.** La longueur et la taille des feuilles ne sont pas affectées par l'exposition croissante au Cu. Ces deux paramètres ont une forte variabilité entre les individus. Le nombre de feuilles ne varie pas par rapport au témoin pour les traitements 653, 1302 et 1951  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$  (Fig. 1D). Il chute de 50 % pour 2600  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$ . Aucun des plants ne présente de

chlorose foliaire, ni d'épinastie. La biomasse des plantes souvent décroît à 10  $\mu\text{M}$  Cu [5] et donc *A. fruticosa* montre une bonne résistance au Cu.

Chez *A. fruticosa* exposé à Pb, la concentration en acide citrique augmente dans les racines et de l'acide malique est exsudé [6]. Ces acides organiques sont des ligands pour les métaux et auraient un rôle dans la tolérance et la détoxification [7].



**Figure 1.** Productivité ( $\text{mg MS j}^{-1} \text{ pot}^{-1}$ ) et nombre d'individus (pointillés) par pot pour *A. capillaris* (A), productivité de *S. tenacissimus* (B) et *C. praecox* (C), et nombre de feuilles d'*A. fruticosa* (D).

Des herbacées testées, la population NM de *C. praecox* a la meilleure productivité aux fortes expositions en Cu. Pour les populations métallocoles d'*A. capillaris* et de *S. tenacissimus*, la sélection irait vers des individus plus tolérants à l'exposition au Cu. *A. fruticosa* est un ligneux d'intérêt pour la phytostabilisation qui tolère un niveau faible de nutriments et une exposition en Cu dans la solution du sol qui devrait induire un stress oxydant. Il pourrait être une espèce pionnière servant d'abri aux autres espèces contre l'ensoleillement et fixant de l'azote, mais son caractère invasif et son potentiel allopathe sont à étudier.

#### Références bibliographiques

- [1] Mench *et al.*, 2005. Phytostabilisation of metal-contaminated sites. pp. 109-190, in Phytoremediation of metal-contaminated soils, Morel J.L. et al (Eds.), Springer, The Netherlands.
- [2] Baize, 1997. Un point sur les teneurs totales des éléments traces métalliques dans les sols (France), Paris.
- [3] Gawronski & Raczka, 2004. Lead uptake and PAHs capture by plants cultivated in urban area. p. 30. In Integration and application of phytotechnologies. COST 859 WG 4 Meeting, Leipzig, Allemagne.
- [4] Sauvé, 2003. Modelling trace element exposure and effects on plants. pp. 69-70. In Risk assessment and sustainable land management using plants in trace element-contaminated soils, Mench & Mocquot (Eds.), Cost Action 837, 4<sup>th</sup> WG2 Workshop, Bordeaux'2002, INRA, Centre Bordeaux-Aquitaine, Villenave d'Ornon.
- [5] Mocquot *et al.*, 1996. *Plant Soil* 182, 287-300.
- [6] Raczka *et al.*, 2004. Heavy metals uptake and accumulation in various organs by legumes and *Arabidopsis thaliana* L. plants. p. 44. In Phytotechnologies to promote sustainable land use management and improve food safety. COST 859 WG 1 Meeting, Varsovie, Pologne.
- [7] Clemens, 2000. *Planta* 212, 475-486.

## Mécanismes physico-chimiques d'action de l'immobilisation *in situ* des éléments traces dans les sols

V. Sappin-Didier et L. Denaix

INRA, UMR TCEM, Transfert Sol-Plante et Cycle des Éléments Minéraux dans les Écosystèmes Cultivés, 71 avenue E. Bourleaux, BP 81, 33883 Villenave-d'Ornon Cedex

### Introduction

Les activités anthropiques liées aux industries, mais également aux pratiques agricoles, peuvent induire une contamination des sols en éléments traces métalliques (ETM). Dans les deux cas, il convient de diminuer la quantité d'élément susceptible d'être dispersée dans l'environnement (sol, eau de surface et eaux profondes) et transférée vers les organismes vivants.

Différentes techniques peuvent être proposées pour diminuer l'exposition des organismes vivants aux ETM. Ces techniques sont classées en 3 catégories : méthodes physiques, méthodes biologiques et méthodes chimiques. Ces techniques peuvent être pratiquées *in situ* ou *ex-situ*. Les méthodes physiques sont généralement considérées comme des méthodes "dures", altérant fortement la structure physique du sol (excavation du sol, lavage sous pression, solidification) [1]. Dans les sols fortement pollués, notamment les sites industriels et aux alentours proches, ce type de méthode est applicable. Par contre dans les sols agricoles, des méthodes dites "douces" sont préférables. Ces méthodes sont destinées à éliminer les risques liés à la présence d'ETM sans détruire le sol, c'est-à-dire sans bouleverser l'activité biologique, les propriétés chimiques et la structure physique du sol. Il existe ainsi des méthodes biologiques de phytoextraction, basées sur le principe de l'utilisation de plantes capables d'accumuler des concentrations très élevées en ETM [2]. Cette technique permet ainsi de diminuer dans le sol le stock d'ETM disponible par la suite pour les plantes. Des méthodes chimiques sont également utilisées. Elles sont basées principalement sur la prise en compte du fonctionnement pédo-géochimique et la réactivité du sol. Ainsi, la technique d'immobilisation *in situ* peut être appliquée afin de diminuer le transfert sol-plante et la lixiviation des éléments traces [3-5]. Le principe de cette méthode est d'immobiliser les ETM dans le sol en modifiant leur spéciation dans le sol et la solution du sol. L'objectif de cette méthode n'est pas de décontaminer le sol mais de diminuer la quantité d'ETM dans la solution du sol, milieu où les organismes vivants du sol et notamment les végétaux prélèvent les éléments nutritifs.

Le travail présenté a pour objectif de décrire les différents mécanismes physico-chimiques pouvant être utilisés afin de modifier la spéciation et immobiliser les ETM dans le sol en fonction des types de sol et de leurs propriétés minéralogiques et chimiques.

### Immobilisation *in situ*

Cette méthode est basée sur la modification de la spéciation des ETM dans le sol afin de diminuer leur transfert du sol à la solution du sol. La disponibilité des ETM est déterminée par des échanges sol - solution du sol, le système sol étant en déséquilibre. L'immobilisation *in situ* consiste donc à insolubiliser les ETM dans le sol en augmentant leur rétention dans le sol. Les différents mécanismes de rétention d'ETM dans un sol sont définis sous le terme de sorption. Ce terme englobe principalement trois processus : adsorption, précipitation et fixation [6].

### *Mécanismes de sorption dans le sol :*

#### - Adsorption

L'adsorption est une accumulation bidimensionnelle de matière à l'interface de solide/eau [7]. Concernant l'adsorption des ETM dans les sols, deux mécanismes sont généralement identifiés : l'adsorption spécifique, correspondant principalement à des liaisons chimiques fortes et irréversibles entre ETM et des matières organiques ou des minéraux à charges variables (complexe de sphère interne), et l'adsorption non spécifique (ou échange ionique), correspondant à des liaisons faibles et réversibles de type électrostatique entre un cation en solution et un autre cation sur une surface (complexe de sphère externe).

#### - Précipitation

La précipitation est caractérisée par la croissance d'une nouvelle phase solide, formant un nouveau réseau à trois dimensions [7]. Les ETM peuvent précipiter sous forme d'oxyde, d'hydroxyde, de carbonates, de sulfate et de phosphate dans le sol. Ces réactions sont fonction du pH et de la quantité de cation et d'anion présent en solution.

#### - Fixation (ou absorption)

La fixation est un mécanisme de sorption qui correspond à la diffusion des espèces aqueuses métallique dans une phase solide [8]. Les ETM qui sont spécifiquement adsorbés sur les minerais argileux et les oxydes peuvent diffuser dans le réseau cristallin de ces minerais. L'élément est alors fixé dans la structure minérale. Seule la dissolution du minéral permettra la libération de l'ETM.

L'adsorption est un des mécanismes chimiques les plus importants dans les sols.

### *Paramètres influençant l'immobilisation des ETM dans le sol*

Les échanges sol-solution des ETM sont dépendants de différents facteurs du sol comme la composition minéralogique et organique, le pH, le type et la spéciation des ions ETM impliqués. La compréhension de ces différents mécanismes et paramètres permet ainsi de dégager les solutions pour augmenter la capacité de sorption et d'immobiliser les ETM dans le sol. En agissant sur ces paramètres, il est ainsi possible de modifier la disponibilité des ETM dans le sol.

La technique généralement employée pour immobiliser les ETM dans un sol pollué est l'apport de certains amendements dans le sol afin de modifier soit la composition minéralogique et organique du sol, soit les conditions physico-chimiques du milieu.

**Apport de phase minérale ou organique :** Cette technique permet d'agir directement sur le mode de sorption. Ainsi, l'apport de minéraux ou composés organiques augmentent soit la capacité d'adsorption (minéraux argileux, oxyde et hydroxyde de fer ou de manganèse, matière organique) [9,10], soit permet la précipitation des ETM (chaulage, minéraux phosphatés comme l'hydroxyapatite) [11].

**Modification du pH :** le pH est le paramètre qui influence le plus la solubilité des ETM dans le sol. Il joue en rôle la quantité de charges sur les composés à charges variables, sur réactions de précipitations [6].

**Rôle des ions métalliques :** la concentration ionique détermine l'intensité de la compétition entre les cations pour les sites de surface des phases solide du sol, et la présence des ligands solubles qui pourraient complexe le métal libre.

## **Conclusion**

Pour diminuer la concentration en ETM dans la solution du sol par la méthode d'immobilisation *in situ*, il est nécessaire d'avoir des informations sur le type de sol et ces propriétés pédogéochimiques, et identifier le ou les ETM responsables de la pollution. Compte tenu de ces informations, il faut ensuite choisir quel paramètre pédo-géochimique

sera modifié. Ce choix est fonction notamment de l'élément(s) que l'on souhaite immobiliser (ex : pour Pb, les traitements phosphatés sont privilégiés ; pour Cd, les traitements modifiant le pH ou d'adsorption sont souhaités ; pour Cu, les amendements organiques sont choisis). La pollution d'un sol n'est généralement pas monométallique. Il faut donc également dans les cas polymétalliques, immobiliser plusieurs ETM. Mais le choix d'un ou des amendement(s) ne doit pas seulement être raisonné en fonction de l'ETM incriminé, car il est important d'éviter de diminuer la solubilité des éléments essentiels aux végétaux [12].

Par ailleurs, même si nous avons une connaissance théorique des mécanismes de sorption des différents composés, dans un système complexe qu'est le sol, et compte tenu des interactions entre éléments et/ou les phases solides du sol, les réactions d'immobilisation des ETM dans le sol restent souvent inconnues ou difficilement prévisibles. Ainsi, certains amendements permettront de diminuer l'exposition en ETM dans certains sols, mais ceci ne sera pas le cas pour un autre type de sol.

Enfin, il y a également la question de la pérennité de l'immobilisation. Ceci peut être dû à des variations géochimiques (pH), climatiques (température, teneur en eau,...), ces variations étant liées, mais également aux réactions de sorption plus ou moins rapide et réversible. Ainsi par exemple, si l'ETM est immobilisé dans le réseau cristallin du minéral nouvellement formé après un apport, seule la dissolution du minéral permettra la libération de l'ETM.

#### Références bibliographiques

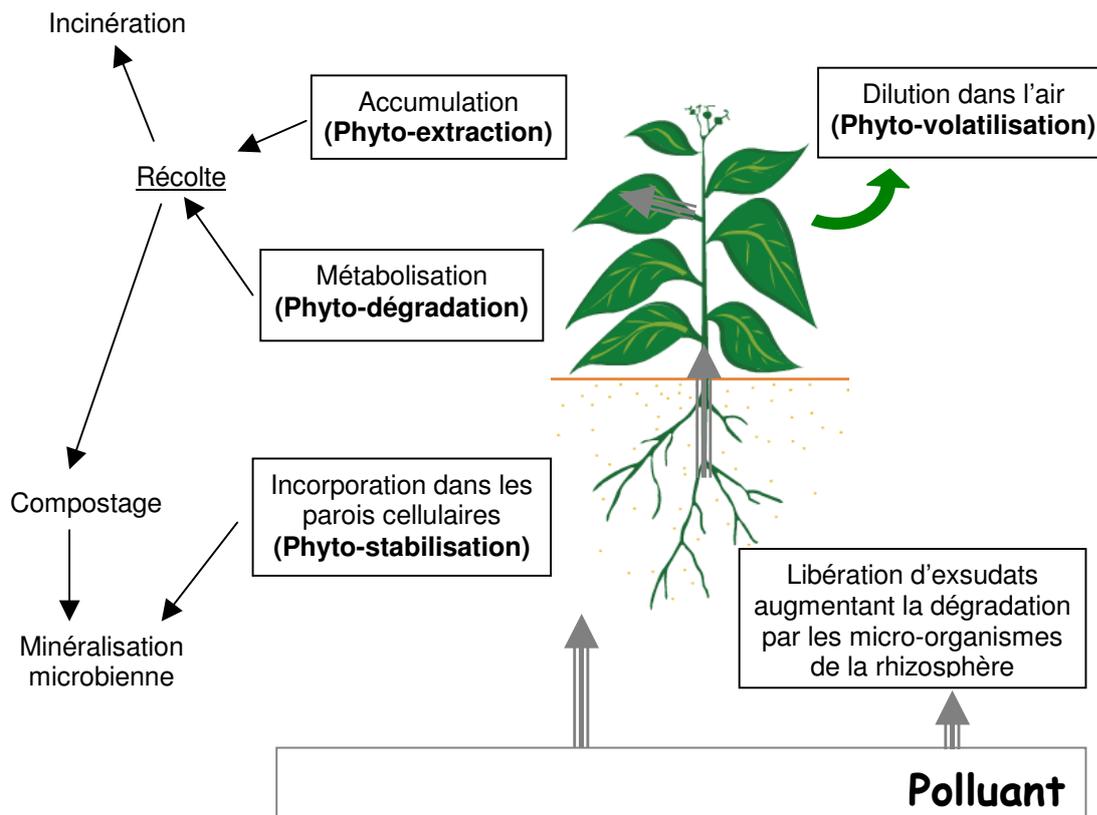
- [1] Ayen *et al.*, 1994. Thermal desorption. pp. 265-310, in Hazardous Waste Site Soil Remediation. Theory and application of innovation technologies, Wilson & Clarke (Eds), Marcel Dekker, New York.
- [2] Cunningham *et al.*, 1995. *Trends Biotechnol.* 13, 393-397.
- [3] Sappin-Didier, 1995. Utilisation de composés inorganiques pour diminuer les flux de métaux dans deux agrosystèmes pollués : étude des mécanismes impliqués par l'emploi d'un composé du fer. Thèse doctorat, chimie analytique et environnement, Université Bordeaux I, 189 p.
- [4] Mench *et al.*, 2000. *In situ* metal immobilisation and phytostabilisation of contaminated soils. pp. 323-358, in Phytoremediation of Contaminated Soils and Water, Terry & Banuelos (Eds), Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton.
- [5] Brown *et al.*, 2004. *J. Environ. Qual.* 33, 522-531.
- [6] Bradl, 2004. *J. Colloid interface Sci.* 277, 1-18.
- [7] Sposito, 1984. *The Surface Chemistry of Soils*, Oxford Univ. Press, New York.
- [8] Sposito, 1986. Geochemical processes at mineral surfaces. In Davies J. and Hayes K. (Eds). ACS Symposium series, American Chemical Society, Washington, DC, 217 p.
- [9] Didier *et al.*, 1993. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sér. III* 316, 83-88.
- [10] Eick *et al.* *Soil Sci.* 166, 11-17.
- [11] Geebelen *et al.*, 2006. *Environ. Pollut.* Sous presse.
- [12] Boisson *et al.*, 1999. *Environ. Pollut.* 104, 225-233.

## Utilisation de plantes agronomiques pour la phyto-dépollution des sols contaminés par des explosifs

M. Vila, S. Pascal-Lorber et F. Laurent

INRA, UMR Xénobiotiques, 180 chemin de Tournefeuille, BP 3, 31931 Toulouse Cedex 9

La phyto-dépollution est une technologie émergente qui consiste à utiliser les plantes pour absorber, accumuler, dégrader ou détoxifier des polluants de diverses natures (polluants organiques ou minéraux). De par leur immobilité, les plantes sont sans cesse soumises à des contraintes environnementales qui constituent des facteurs importants dans leur adaptation et leur évolution. Beaucoup de plantes ont développé des systèmes biochimiques pour la détoxification et le contrôle des conditions géochimiques locales. S'appuyant sur ces caractéristiques, la phyto-dépollution met en œuvre divers mécanismes qui n'aboutissent pas au même traitement de la pollution (Fig. 1). La phyto-dépollution permet d'éviter l'usage de méthodes invasives et chères comme l'incinération totale des sols après excavation.

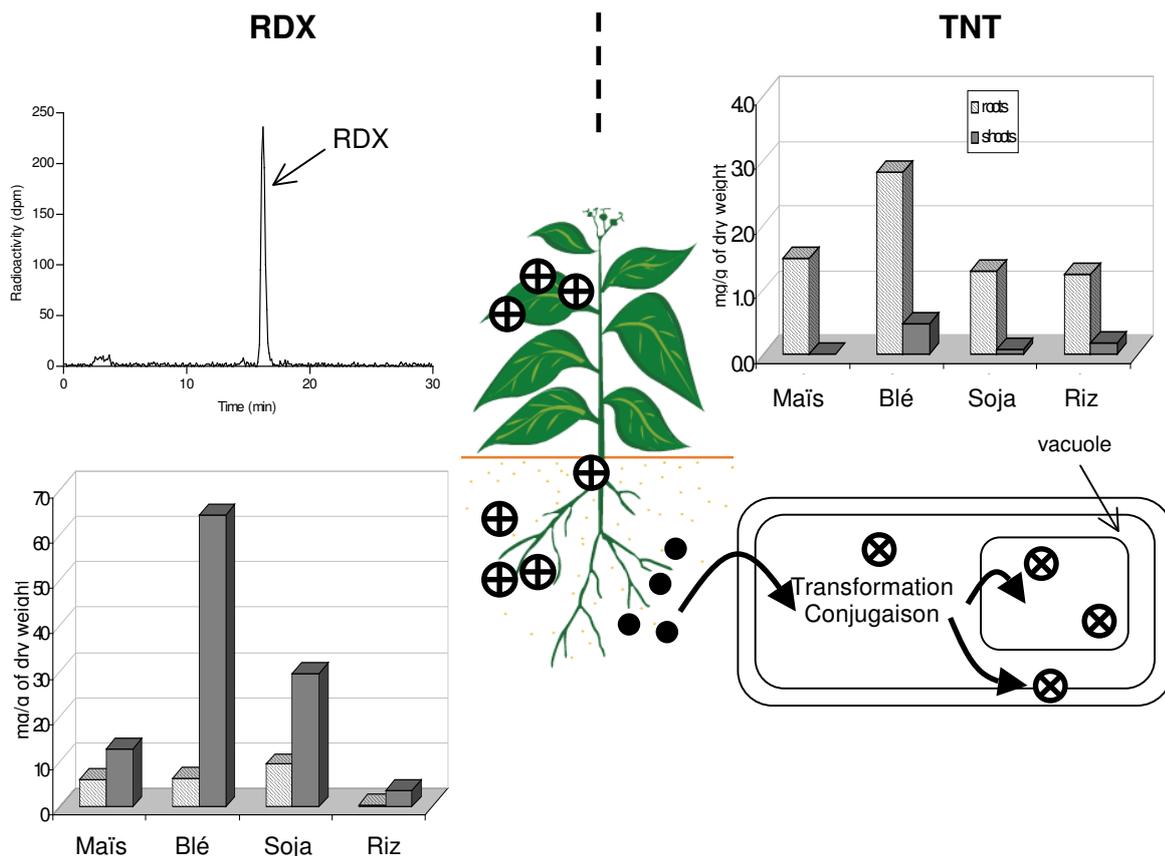


**Figure 1.** Représentation schématique des différents mécanismes impliqués dans la phyto-dépollution.

La phyto-dépollution est une méthode envisagée pour la dépollution de sols contaminés par des explosifs nitrés. En effet, la pollution résultant de la production, du stockage et de l'utilisation de l'hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) et du 2,4,6-trinitrotoluène (TNT) représente un problème environnemental important. Ces composés toxiques se retrouvent

dans les sols à des teneurs très élevées. Auparavant, au cours de la production d'explosifs, les eaux usées étaient rejetées dans des bassins de décantation pour permettre la sédimentation des polluants. L'eau après cette dépollution était orientée vers les rivières avoisinantes. Il en résulte aujourd'hui des lagunes hautement contaminées par les explosifs mais aussi d'autres produits intervenants dans leur synthèse. Sur les autres sites pollués, la pollution est plus diffuse mais tout aussi préoccupante. L'utilisation de plantes agronomiques a été envisagée pour cette dépollution car elles ont une croissance rapide et peuvent produire une biomasse importante.

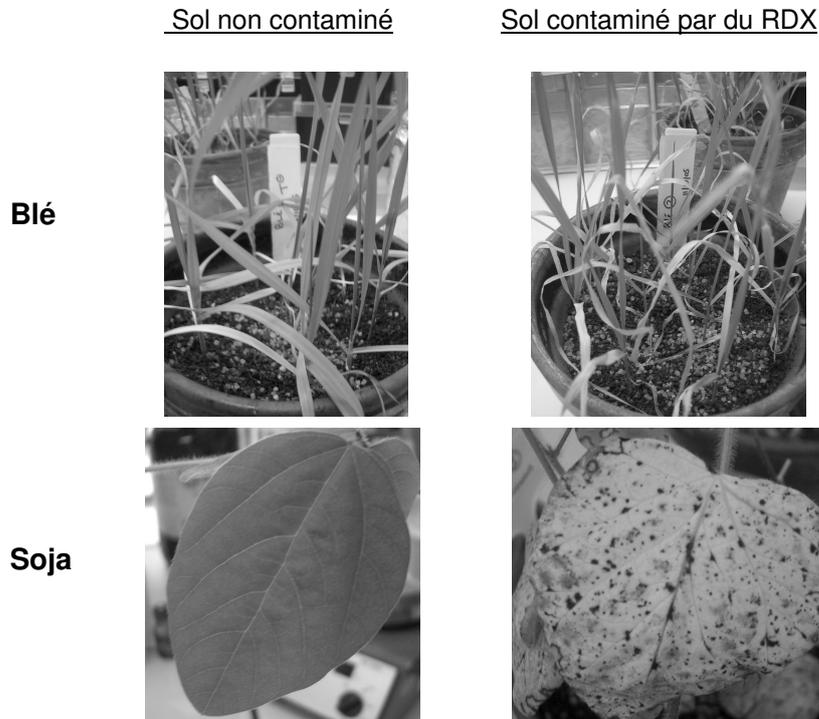
Des expérimentations utilisant des molécules marquées au carbone 14 ont été mises en place pour étudier les capacités des plantes agronomiques à absorber les explosifs. Des études ont aussi été menées pour connaître le devenir de ces explosifs une fois absorbés par les plantes. Les plantes testées sont le blé, le maïs, le soja et le riz. Ce dernier a été envisagé pour son adaptation à des cas de pollution sur des sites lagunaires. Les plantes ont été semées sur des sols contaminés avec 138 mg/kg avec chacun des explosifs séparément ainsi que son équivalent radiomarké. Les pots ont été disposés dans une chambre de culture avec une alternance jour nuit de 16 h et une température de 25°C le jour et de 20°C la nuit. Après 42 jours de culture, les plantes sont récoltées, lyophilisées, broyées puis analysées pour déterminer la quantité de radioactivité dans les parties racinaires et aériennes. Une analyse en radio-CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la détection de la radioactivité) a permis d'étudier les transformations de chacun des explosifs après pénétration dans les plantes.



**Figure 2.** Principaux résultats obtenus lors de l'étude de l'absorption et du devenir du RDX (à gauche) et du TNT (à droite) dans quatre espèces végétales.

Les quatre plantes se sont révélées capables d'absorber le RDX et le TNT (Fig. 2). Toutefois, les quantités, la répartition et le devenir de chaque explosif après absorption sont totalement différents. Le RDX est absorbé en grande quantité et plus de 80 % de la radioactivité est transférée vers les parties aériennes. Le RDX est très peu dégradé puisqu'il

représente plus de 95 % de la radioactivité absorbée. Le TNT, quant à lui, est absorbé en quantité 20 fois plus faible. Le TNT est totalement dégradé en composés plus polaires (principalement des conjugués à des sucres) qui sont ensuite stockés dans les vacuoles ou liés à la paroi au niveau des racines (plus de 60 % de la radioactivité est non extractible). Après pénétration dans la plante, le TNT est donc bloqué dans les parties racinaires et seulement 20 % de la radioactivité est transférée vers les parties aériennes.



**Figure 3.** Effets de l'accumulation de RDX dans les parties aériennes du blé et du soja.

Chez le soja, le riz et le blé, la forte accumulation de RDX dans les parties aériennes provoque l'apparition de nécroses précédée d'un jaunissement des tissus aériens (Fig. 3). Ces nécroses conduisent à la chute des feuilles de soja. Ce phénomène pourrait conduire à la dispersion du polluant et à une impossibilité d'utilisation pour la phyto-dépollution du RDX. Par contre, ce phénomène est moins marqué chez les graminées qui pourraient donc être utilisées pour la phyto-dépollution. Après phyto-accumulation du RDX dans les parties aériennes, les plantes devront être récoltées puis incinérées ou compostées. Il faudra donc privilégier l'utilisation de monocotylédones pour éviter la chute des feuilles ayant accumulé le RDX. Parmi les plantes testées, le blé semble être la plus efficace.

La séquestration du TNT dans les parties racinaires ne permet pas l'usage des plantes dans un processus de phyto-accumulation suffisamment efficace pour dépolluer des sols. Toutefois, elle conduit à une phyto-stabilisation du polluant évitant sa dispersion vers les nappes phréatiques. De plus, certains micro-organismes capables de dégrader la lignine, probable site de fixation des résidus du TNT dans la paroi, pourront dégrader le polluant dans le sol après la mort du végétal.

## Devenir des composés disrupteurs endocriniens et de l'activité œstrogénique au sein d'une station d'épuration des eaux urbaines

M. Muller<sup>1</sup>, F. Rabenoelina<sup>2</sup>, N. Delgènes<sup>1</sup>, D. Patureau<sup>1</sup>, P. Balaguer<sup>2</sup> et G. Hernandez-Raquet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Étangs, 11100 Narbonne

<sup>2</sup>INSERM, Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire des Cancers, 60 rue de Navacelles, 34090 Montpellier

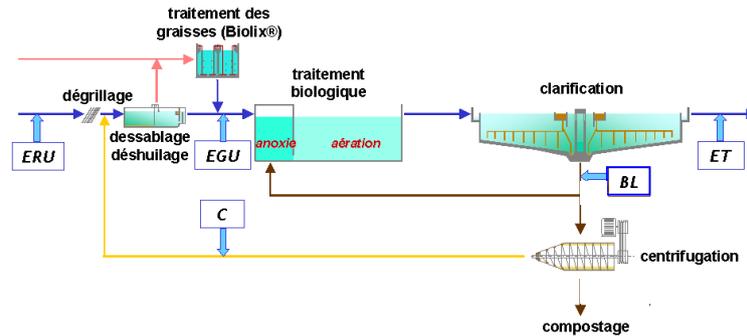
Des perturbations endocriniennes, tels que la féminisation de certaines populations de poissons, ont été observées dans l'environnement [1]. Ces perturbations ont été attribuées à la présence, dans les milieux naturels, de micropolluants organiques à caractère disrupteur endocrinien. Les composés disrupteurs endocriniens (CDE) interfèrent avec le système endocrinien des organismes vivants induisant des dysfonctionnements et des malformations du système reproducteur [2,3]. Dans cette étude, nous nous focalisons sur deux types de CDE : les xéno-œstrogènes du type alkylphénol, de par les gros volumes introduits dans l'environnement, et les composés stéroïdiens naturels et synthétiques, de par leur pouvoir œstrogène élevé.

Les êtres humains et, plus généralement, les animaux excrètent naturellement des œstrogènes. Les hormones synthétiques sont quant à elles utilisées dans le cadre de la contraception orale et des thérapies de remplacement hormonal. Ces molécules rejoignent les eaux usées par l'intermédiaire des urines et, dans une moindre mesure, des fèces. Les NPE sont issues de la dégradation de tensioactifs non ioniques, largement utilisés dans le secteur industriel et domestique en tant que détergent, constituant de peinture, agent de traitement des surfaces, etc. [4]. Les NPE et les œstrogènes ont été décelés dans les eaux de surface, en particulier, à proximité des sites de rejet des effluents de STEP [5,6]. Il a en effet été montré, dans de nombreux cas, que les STEP n'éliminaient pas complètement les CDE des eaux usées [7]. Les effluents de STEP constituent donc la principale voie de transfert de ces molécules vers les milieux aquatiques [8].

L'objectif de cette étude est de mieux comprendre le devenir des œstrogènes et des NPE au cours du traitement d'eau résiduaire urbaine au sein d'une STEP moderne. De plus, une attention particulière a été portée à l'aspect écotoxicologique en déterminant le rôle de ces deux composés dans l'activité œstrogénique globale des effluents de la STEP étudiée.

### Matériels et méthodes

Le site étudié est la STEP de Narbonne-Ville (Aude) qui assure un traitement biologique à boue activée comprenant des étapes de nitrification, dénitrification et déphosphoration des effluents. Elle offre une capacité épuratoire de 120 000 équivalent-habitants. Des échantillons d'eau, moyens sur 24 h et proportionnels au flux entrant, ont été prélevés en différents points de la STEP (Fig. 1). Ces prélèvements ont été réalisés de manière hebdomadaire, durant trois semaines, lors de deux campagnes effectuées à des saisons différentes (octobre 2005 et avril 2006).

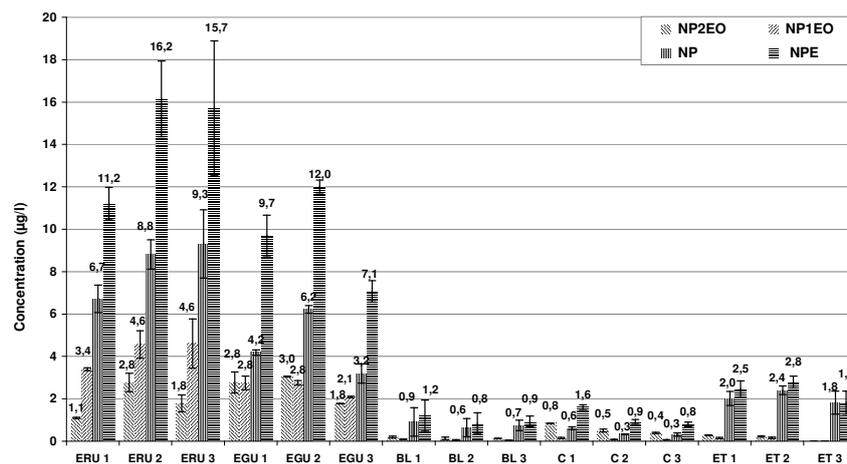


**Figure 1.** Schéma de la STEP de Narbonne-Ville avec les différents points de prélèvement (ERU = eau usée, EGU = eau pré-traitée, BL = boue liquide, C = centrat, ET = eau traitée)

Les composés d'intérêt ont été extraits en phase solide (SPE) et analysés en GC-MS [9] et HPLC-FLD [10], respectivement, pour les œstrogènes et les NPE. Les œstrogènes mesurés sont les composés naturels œstrone (E1), 17 $\beta$ -œstradiol (E2), œstriol (E3) et synthétiques 17 $\alpha$ -éthinyloœstradiol (EE2) et mestranol (MeEE2), ainsi que leurs formes conjuguées sulfates et glucuronides. Le nonylphénol (NP) et les nonylphénols mono et diéthoxylés (NP1EO et NP2EO) sont les molécules dosées pour la famille des alkyphénols. L'activité œstrogénique (capacité à activer les récepteurs aux œstrogènes) a été évaluée en utilisant des cellules cancéreuses humaines modifiées (test MELN). Ces cellules expriment les récepteurs aux œstrogènes humains et émettent une bioluminescence proportionnelle au degré d'activation de ces derniers [11]. L'activité œstrogénique d'un produit est exprimée par rapport à l'activité de E2 (ng E2eq/L).

## Résultats

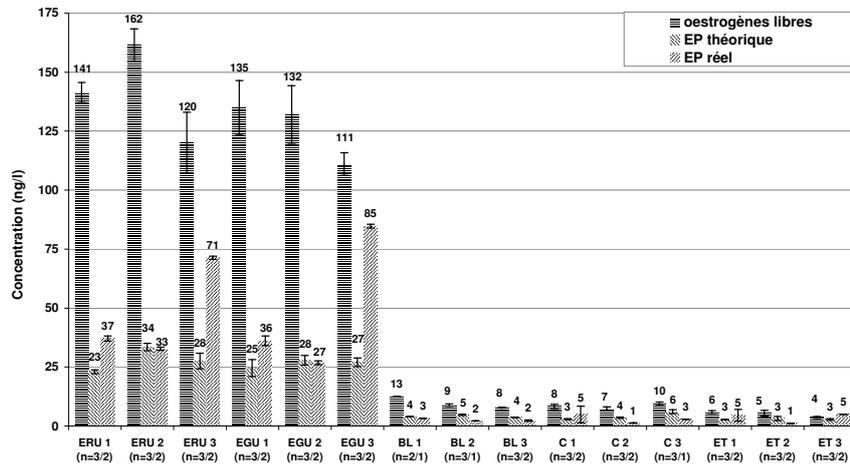
Les résultats des analyses effectuées aux différentes étapes de traitement montrent des concentrations en œstrogènes dans les ERU de l'ordre de 230 à 450 ng/L avec une proportion relative des formes libres et conjuguées quasiment équivalente. Les formes libres, les plus actives, présentent des teneurs de 120 à 270 ng/L avec pour hormones majoritaires E1 et E3. Les NPE sont détectés dans les ERU à des teneurs de l'ordre de 9 à 15  $\mu$ g/L ; la molécule majoritaire étant le NP (Fig. 2).



**Figure 2.** Concentration globale des NPE et de chacune des molécules aux différents points de prélèvement (avril 2006)

L'élimination des œstrogènes conjugués par la STEP est presque totale (>99 %) et les formes libres sont éliminées avec plus de 90 % d'efficacité. E2 et son produit d'oxydation E1 sont les œstrogènes prédominants dans les ET. Les NPE restent très présents dans les ET, avec un abattement de leurs concentrations de 80 à 92 % au cours du traitement. Le NP est

le nonylphénol majoritaire dans les ET (fig. 2). Ainsi, les concentrations d'œstrogènes dans les ET varient entre 6 et 9 ng/L, tandis que les teneurs en NPE sont de l'ordre de 1 à 3 µg/L. La détermination de l'activité œstrogénique a mis en évidence un pouvoir œstrogène des ERU allant de 20 à 100 ng E2eq/L contre moins de 5 ng E2eq/L pour les ET. En considérant un effet additif du pouvoir œstrogène de chacune des hormones, l'activité œstrogénique estimée à partir des concentrations en œstrogène (EP théorique) est très proche de l'activité œstrogénique mesurée à l'aide du test *in vitro* MELN (EP réel) en entrée et sortie de STEP (Fig. 3).



**Figure 3.** Concentration globale en œstrogènes libres et activité œstrogénique aux différents points de prélèvement (avril 2006)

## Conclusions

Les œstrogènes sont 50 à 200 fois moins concentrés que les NPE dans les eaux brutes et traitées. Cependant, les NPE ont un pouvoir œstrogène  $10^4$  à  $10^5$  fois plus faible que les hormones. Par conséquent, les concentrations en hormones détectées dans la STEP permettent d'expliquer la quasi-totalité de l'activité œstrogénique mesurée aux différentes étapes du traitement. Dans le cas particulier du site étudié, le facteur de dilution des effluents dans les eaux réceptrices est de 10 à 20 ×. Ainsi, l'activité œstrogénique résultante dans le milieu naturel est, probablement, légèrement supérieure aux seuils capables d'induire un effet chez certains organismes [2]. La dilution des effluents dans le milieu récepteur joue donc un rôle important sur l'impact écotoxicologique des CDE. Par ailleurs, les effets sur les organismes d'une exposition chronique à de faibles concentrations d'œstrogènes, ainsi que les effets des mélanges de polluants sont encore mal connus. Or, d'autres polluants, tels le cadmium et des pesticides, molécules œstrogènes, sont fréquemment détectés à proximité du site d'étude [12].

## Références bibliographiques

- [1] Jobling *et al.*, 2002. *Biol. Reprod.*, 66, 272-281.
- [2] Jobling *et al.*, 2003. *Aquat. Toxicol.* 65, 205-220.
- [3] Sharpe & Irvine, 2004. *Brit. Med. J.* 328, 447-451.
- [4] Birkett, 2003. *Sources of endocrine disrupters*, in *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*, J.W. Birkett and J.N. Lester, Eds. Lewis publishers/IWA publishing: Boca Raton (Florida). p. 35-58.
- [5] Baronti *et al.*, 2000. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 5059-5066.
- [6] Koplín *et al.*, 2002. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4004-4004.
- [7] Johnson *et al.*, 2005. *Water Res.* 39, 47-58.
- [8] Svenson *et al.*, 2003. *Water Res.* 37, 4433-4443.
- [9] Labadie & Budzinski, 2005. *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 1199-1205.
- [10] Ahel *et al.*, 2000. *Croatica Chemica Acta* 73, 209-227.
- [11] Balaguer *et al.*, 1999. *Sci. Tot. Environ.* 233, 47-56.
- [12] Données issues de la surveillance du site par le Centre Permanent d'Initiatives pour l'Environnement des Pays Narbonnais (<http://www.languedoc-roussillon.ecologie.gouv.fr/loadPge.php?file=eau/fogem/fogem.file>).

## Impact écotoxicologique des composés organiques présents dans les boues d'épuration valorisées par épandage sur les sols agricoles

A. Ghanem<sup>1</sup>, J. Einhorn<sup>2</sup>, F. Laurent<sup>3</sup>, F. de Alencastro<sup>4</sup>, Y. Levi<sup>5</sup>, C. Jolival<sup>6</sup>, D. Patureau<sup>7</sup> et C. Mougin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, Unité PESSAC Physico-chimie et Écotoxicologie des SolS d'Agrosystèmes Contaminés, RD 10, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex

<sup>2</sup>INRA, Unité Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques, RD 10, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex

<sup>3</sup>INRA, UMR Xénobiotiques, 180 chemin de Tournefeuille, BP 3, 31931 Toulouse Cedex 9

<sup>4</sup>Institut des Sciences et Technologies de l'Environnement, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH-1015, Lausanne, Suisse

<sup>5</sup>Santé Publique et Environnement, Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry

<sup>6</sup>Laboratoire de Synthèse sélective organique et produits naturels, École Nationale Supérieure de Chimie de Paris, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05

<sup>7</sup>INRA, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Étangs, 11100 Narbonne

### Contexte

La valorisation des boues d'épuration par épandage sur les sols agricoles constitue une pratique de plus en plus répandue qui contribue à améliorer la qualité des sols sur le plan physique et chimique, et fournit des éléments nutritifs aux micro-organismes et végétaux. Toutefois, les boues peuvent contenir de nombreux contaminants chimiques et biologiques potentiellement bioactifs, et présenter de ce fait des risques écotoxicologiques et sanitaires. Depuis plusieurs décennies, l'épandage des boues est soumis à réglementation. Un projet de directive européenne va proposer de nouvelles valeurs limites pour sept métaux lourds dans les boues, ainsi que pour six familles de polluants organiques et un phtalate. Si la situation semble relativement contrôlée concernant les contaminants métalliques (faible nombre d'éléments) et biologiques (procédés d'hygiénisation des boues), les risques liés aux contaminants organiques restent peu connus.

### Objectifs

Dans ce contexte, nos objectifs sont de déterminer les impacts écotoxicologiques sur l'écosystème sol, de composés connus comme ou suspectés d'être des perturbateurs endocriniens et apportés *via* les boues d'épuration contaminées. Nous développons des systèmes sol-plante-eau (cosmes) permettant d'explicitier le devenir (transformation et transfert vers les eaux de lixiviation et les végétaux) et de réaliser des tests écotoxicologiques sur des organismes du sol appartenant à différents niveaux écologiques (micro-organismes, végétaux, invertébrés) [1-3].

### Matériels et méthodes

Différentes conditions de traitement du sol sont comparées. Pour les études concernant le devenir des contaminants organiques, apportés sous la forme de radiotraceurs, le sol seul traité par pulvérisation de polluants est considéré comme référence ; le sol amendé par les boues contaminées à des doses équivalentes à 6 ou 30 T MS/ha représente soit une situation agronomique, soit une situation de pire cas. Pour l'évaluation des impacts écotoxicologiques, le sol n'ayant reçu aucun traitement est considéré comme référence. Les cosmes sont incubés au laboratoire pendant 90 jours sous conditions de température, de lumière et d'humidité contrôlées. Des graines de blé et de radis sont semées dans tous les

cosmes. Des échantillons de sol sont prélevés pour les tests collemboles. L'estrogénicité des lixiviats est mesurée après leur obtention lors de la simulation d'un épisode pluvieux.

## Résultats

### *Contamination des boues par les composés organiques*

Nos campagnes de suivi ont révélé la présence du glyphosate et de l'AMPA, son métabolite majeur, à des doses de l'ordre de la ppm dans tous les échantillons de boues provenant de stations urbaines, ainsi que celle du diuron au niveau de la ppb. Le nonylphénol est quant à lui présent à des doses supérieures à celles préconisées dans la future norme (50 ppm). Les données de la littérature font état d'une contamination en hormones stéroïdiennes (naturelles ou de synthèse), en phtalates et HAPs de l'ordre de la ppb, et de la ppm.

Les teneurs en herbicides, notamment glyphosate et AMPA, sont les plus élevées dans les boues issues de STEP raccordées à des réseaux séparatifs. D'autre part, il n'a pas été possible de relier les teneurs des boues en herbicides à d'éventuelles périodes de traitement herbicide.

### *Devenir des polluants organiques dans les systèmes sol/boues*

D'une façon générale, la minéralisation des contaminants organiques étudiés est ralentie lorsque ces composés sont apportés au sol *via* les boues, avec parfois apparition d'une phase de latence de la dégradation selon le type de boue (chaulée). Ceci peut être dû à d'éventuels effets toxiques des composés déjà présents dans les boues, ou à l'apport excessif d'éléments nutritifs qui détournent l'activité des micro-organismes. Dans ces conditions, les extraits organiques de sol contiennent de fortes teneurs en composés chimiques non transformés. À l'inverse, l'apport par la boue stimule la minéralisation du 17 $\beta$ -œstradiol, ce qui serait dû à la présence dans la boue d'une microflore déjà adaptée à la biotransformation des hormones.

Nos résultats démontrent également que les composés organiques contenus dans les boues sont mobiles, et sont partiellement transférés dans les eaux de lixiviation et les végétaux.

### *Effet des boues sur les organismes et l'activité biologique du sol*

Les boues, en l'absence de tout traitement par les composés organiques, stimulent ou sont sans effet sur l'activité de transformation de matière organique du sol (secs de litière). Les boues à forte dose sont légèrement inhibitrices, en raison de l'apport important de matière organique qui est une source de substrat. En présence des herbicides et nonylphénol, l'activité biologique est légèrement inférieure ou égale à celle du sol témoin. Le type de boue (brute, digérée...) influe sur l'activité biologique du sol.

L'analyse des profils d'acides gras phospholipidiques du sol montre souvent un développement fongique supérieur à celui des populations bactériennes. Nous n'avons pas observé d'effet toxique direct des contaminants ajoutés aux boues.

### *Effet des boues sur les performances de croissance des végétaux*

Les résultats les plus significatifs ont été obtenus avec le blé. Des effets inhibiteurs sont notés sur la germination, effets qui dépendent du type de boue et de la présence de contaminants organiques, qui semblent exercer en mélange une certaine phytotoxicité. Toutefois, la croissance des plantules reste globalement stimulée par l'apport de boue. La boue séchée à forte dose conduit dans certains cas à une prolifération de filaments fongiques à la surface du sol.

### *Effet des boues sur les collemboles*

La reproduction et la survie de *Folsomia candida* ne sont pas affectées par l'ajout des boues non contaminées, à faible dose. A l'inverse, la mortalité des collemboles augmente et le nombre de juvéniles diminue fortement à la forte dose de boues, en raison de la prolifération fongique (boue séchée) ou de l'alcalinité du milieu (boue chaulée). La présence des herbicides et du nonylphénol a un effet négatif sur la reproduction et la survie uniquement dans le cas de la boue séchée, aux deux doses d'application.

### *Estrogénicité des percolats*

L'estrogénicité des percolats récoltés après 15 jours d'incubation des mélanges sols/boues a été mesurée sur des lignées cellulaires MELN. Seuls les percolats issus des cosmes incubés en présence de la boue séchée à forte dose ont révélé des effets oestrogéniques, et ce avec et sans ajout de polluants.

## **Conclusion**

Dans ces différents programmes, nous avons montré que les boues renferment des polluants organiques préoccupants à des concentrations non négligeables. Leur persistance est réelle dans le sol, comme leur mobilité vers les eaux et les végétaux. Toutefois, l'écotoxicité des boues contaminées n'a pas pu être mise en évidence.

### **Références bibliographiques**

- [1] Ghanem *et al.*, 2006. *Environ. Chem. Letters* 4,63-67.
- [2] Kollmann *et al.*, 2003. *J. Environ. Qual.* 32,1269-1276.
- [3] Mougin *et al.*, 2006. *Environ. Chem. Letters* (on line).

Les résultats présentés ont été acquis dans le cadre de plusieurs programmes soutenus par l'ADEME, l'INSU et la CEE. Les auteurs remercient tous les personnels qui se sont impliqués dans ces travaux.