



HAL
open science

Développement et transfert aux opérationnels d'outils intégratifs de mesure chimique et biologique au sein des cours d'eau pour le suivi de l'impact des pratiques agricoles et de leur évolution

Véronique Gouy, Joan Artigas, Chloé Bonnineau, Arnaud Chaumot, Eric Chauvet, François Guérol, Mathieu Le Dréau, Adeline François, Jérémy Jabiol, Camille Legrand, et al.

► To cite this version:

Véronique Gouy, Joan Artigas, Chloé Bonnineau, Arnaud Chaumot, Eric Chauvet, et al.. Développement et transfert aux opérationnels d'outils intégratifs de mesure chimique et biologique au sein des cours d'eau pour le suivi de l'impact des pratiques agricoles et de leur évolution. [Rapport de recherche] INRAE UR-RiverLy; INRAE UR EABX; LIEC Université de Lorraine; INRAE Dijon agroécologie; Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand; Université Paul Sabatier Toulouse; Hyfe. 2021. hal-03423016

HAL Id: hal-03423016

<https://hal.science/hal-03423016>

Submitted on 15 Dec 2021

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.



OFB
OFFICE FRANÇAIS
DE LA BIODIVERSITÉ

Plan Ecophyto II

Axe n°3 : Evaluer et maîtriser les risques et les impacts

Action 14 : S'appuyer sur des indicateurs de suivi, d'impact et d'évolution des pratiques

PROJET IMPACT-CE

Développement et transfert aux opérationnels d'outils intégratifs de mesure chimique et biologique au sein des cours d'eau pour le suivi de l'impact des pratiques agricoles et de leur évolution

- Rapport Final -

Coordination du projet

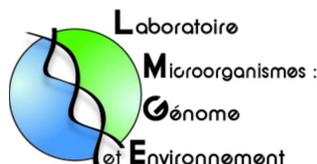
Véronique Gouy

Coordination de la rédaction

Jérémy Jabiol & Véronique Gouy

Contributeurs

Joan Artigas, Chloé Bonnineau, Arnaud Chaumot, Eric Chauvet, François Guérol, Mathieu Le Dréau, Adeline François, Véronique Gouy, Jérémy Jabiol, Camille Legrand, Christelle Margoum, Fabrice Martin-Laurent, Nicolas Mazzella, Stéphane Pesce, Vincent Tardy, Philippe Usseglio Polatera



Laboratoire écologie
fonctionnelle 1
et environnement

Remerciements : Nous tenons à remercier tous nos correspondants opérationnels (Eaux de Paris, le Syndicat Mixte des Vallées de la Veyre et de l'Auzon, le Syndicat Interdépartemental Mixte d'Aménagement de la Coise et la Ville de Lons-le-Saunier) sur les 4 sites d'étude dont la liste est donnée en Annexe 3. Nous remercions également l'ensemble du personnel impliqué au sein des différentes équipes ayant contribué au projet (Annexe 2).

Pour citer ce rapport :

Jabiol J., Artigas J., Bonnineau C., Chaumot A., Chauvet E., François A., Guérolde F., Le Dréau M., Legrand C., Margoum C., Martin-Laurent F., Mazzella N., Pesce S., Tardy V., Usseglio-Polatera P., Gouy V. (2021). Rapport final du projet Impact-CE : Développement et transfert aux opérationnels d'outils intégratifs de mesure chimique et biologique au sein des cours d'eau pour le suivi de l'impact des pratiques agricoles et de leur évolution. Ecophyto II. 157 pp.

Table des matières

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	7
I. Rappel du contexte et des objectifs.....	9
1. Contexte du projet :.....	9
1.1 Évaluation des cours d'eau dans la Directive Cadre sur l'Eau (DCE).....	9
1.2 Positionnement du projet Impact-CE.....	10
2. Objectifs du projet Impact-CE.....	11
II. Présentation des sites.....	14
1. Éléments méthodologiques généraux de choix des sites et stations.....	14
2. Site des Sources de la Vigne.....	15
2.1 Présentation.....	15
2.2 Contexte agricole.....	16
2.3 Problématique.....	16
2.4 Choix des stations d'étude.....	17
2.5 Paramètres généraux.....	18
3. Site de l'AAC de Lons-le-Saunier.....	20
3.1 Présentation.....	20
3.2 Contexte agricole.....	21
3.3 Problématique.....	21
3.4 Choix des stations d'étude.....	22
3.5 Paramètres généraux.....	23
4. Site du Charlet.....	27
4.1 Présentation.....	27
4.2 Contexte agricole.....	27
4.3 Problématique.....	27
4.4 Choix des stations d'étude.....	28
4.5 Paramètres généraux.....	29
5. Site de la Coise.....	32
5.1 Présentation.....	32
5.2 Contexte agricole.....	32
5.3 Problématique.....	32
5.4 Choix des stations d'étude.....	33
5.5 Paramètres généraux.....	34
III. Présentation des outils et des modalités de leur mise en œuvre sur chaque site.....	38

1. Échantillonneurs intégratifs passifs : échantillonnage « au fil de l'eau » de molécules spécifiques dans le milieu.....	38
2. Les communautés microbiennes naturelles permettent de cibler des molécules spécifiques....	41
2.1 Étude de la tolérance des communautés microbiennes autochtones (biofilms phototrophes) aux produits phytosanitaires (approche PICT).....	41
2.2 Potentiel génétique et fonctionnel des communautés microbiennes du sédiment pour la dégradation de pesticides.....	42
Mesure du potentiel dégradant des communautés microbiennes des sédiments.....	42
Mesure du potentiel génétique dégradant des communautés microbiennes des sédiments.	43
3. Le biomonitoring actif par encagement de gammares.....	44
3.1 Principe.....	44
3.2 Méthode.....	44
Origine, maintenance, sélection et exposition des organismes.....	44
Marqueurs étudiés.....	46
Autres marqueurs en cours de développement appliqués lors du projet.....	49
4. La décomposition des litières et ses communautés microbiennes.....	51
4.1 Perte de masse des litières.....	51
4.2 Communautés et activités microbiennes associées aux litières.....	52
5. Une alternative aux litières naturelles : la décomposition de substrats artificiels.....	55
5.1 Perte de résistance des bandes de coton.....	55
5.2 Décomposition des tablettes.....	56
6. Communautés et traits fonctionnels des invertébrés benthiques : I ₂ M ₂ et Outil de Diagnostic Invertébrés (ODI).....	57
IV. Présentation des résultats par outil.....	60
1. Échantillonneurs passifs.....	60
1.1 Spécificité vis-à-vis de la nature des substances piégées.....	60
1.2 Capacité à rendre compte des épisodes de transfert.....	61
1.3 Capacité à rendre compte d'évolutions d'usages dans l'espace et dans le temps.....	63
2. Les communautés microbiennes naturelles permettent de cibler des molécules ou des modes d'action spécifiques.....	75
2.1 PICT.....	75
2.2 Potentiel génétique et fonctionnel des communautés microbiennes du sédiment pour la dégradation de pesticides.....	78
3. Le biomonitoring actif par encagement de gammares.....	80
3.1 Conditions d'exposition.....	80
3.3 Marqueurs en développement.....	85
3.4 Étude protéomique sur Lons-le-Saunier.....	86

4. La décomposition des litières et ses communautés microbiennes.....	88
4.1 Perte de masse des litières.....	88
4.2 Communautés d'hyphomycètes aquatiques associés aux litières.....	90
4.3 Biomasse fongique.....	92
4.4 Structure des communautés bactériennes.....	93
4.5 Activités enzymatiques.....	96
5. Une alternative aux litières naturelles : la décomposition de substrats artificiels.....	97
5.1 Perte de résistance des bandes de coton.....	97
5.2 Décomposition des tablettes.....	98
6. Communautés et traits fonctionnels des invertébrés benthiques : I ₂ M ₂ et Outil de Diagnostic Invertébrés (ODI).....	99
V. Synthèse de tous les résultats acquis et analyse globale.....	102
1. Objectif et présentation de l'ensemble des données du projet Impact-CE.....	102
2. Démarche analytique et approches statistiques.....	104
3. Volet 1 - Analyse des paramètres abiotiques.....	104
3.1. Analyse des données issues des échantillonneurs passifs.....	104
3.2. Analyse globale de la contamination sur l'ensemble des sites.....	108
3.3. Calcul des unités toxiques et des indicateurs de risque.....	109
3.4. Analyse des autres paramètres abiotiques.....	112
4. Volet 2 - Analyse des indicateurs biologiques.....	114
5. Volet 3 - Analyse des relations entre la variation des paramètres abiotiques et biotiques.....	117
5.1. Analyse en partition de variance.....	118
5.2. Analyse des corrélations.....	119
5.3. Analyse en réseaux des corrélations.....	120
6. Discussion et conclusion.....	123
VI. Synthèse.....	124
1. Bilan par site : ce que nos indicateurs nous ont appris sur l'état écologique et la contamination de chaque site par les pesticides.....	124
1.1 Site de la Vigne.....	124
1.2 Site de Lons-le-Saunier.....	124
1.3 Site du Charlet.....	125
1.4 Site de la Coise.....	126
2. Présentation des résultats orientée par la réponse aux questions posées par les gestionnaires des sites étudiés.....	127
Fiche n°1.....	128
Fiche n°2.....	129

Fiche n°3.....	130
Fiche n°4.....	131
3. Positionnement des outils et retours d'expérience.....	132
3.1 Positionnement des outils d'après les retours des opérationnels.....	132
3.2 Positionnement des outils d'après les résultats d'Impact-CE.....	141
4. Bilan et perspectives.....	144
VIII. Références.....	147
1. Normes citées dans le texte.....	147
2. Documents cités dans le texte.....	147
IX. Annexes.....	156

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAC : Aire d'Alimentation de Captage
ABTS : 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
AChE : AcetylCholine Esterase
ADN : Acide Desoxyribo-Nucléique
AFNOR : Agence Française de Normalisation
ASPT : Average Score Per Taxon
BNVD : Banque Nationale des ventes de produits phytopharmaceutiques par les Distributeurs agréés
CbE : CarboxylEsterase
CLC : Corine Land Cover
COD : Carbone Organique Dissous
COT : Carbone Organique Total
CROPPP : Cellule Régionale d'Observation et de Prévention des Pollutions par les Pesticides en
DCE : Directive Cadre sur l'Eau
DECOTAB : Decomposition and consumption tablets
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DGT : Diffusive Gradients en Thin films
DOPA : 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine
DREAL : Direction régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement
EC50 : Effect Concentration (50 %)
GST : Gluthation-S-Transférase
HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
I₂M₂ : Indice Invertébrés Multi-Métrique
IBGN : Indice Biologique Global Normalisé
INRAE : Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
IR : Indicateur de Risque
Irstea : Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture
ISO : Organisation Internationale de Normalisation
Kow : Coefficient de partage eau/octanol
LQ : Limite de Quantification
MUF : MethylUmbelliFeryl
NGS : Next-Generation Sequencing
NMDS : Non-metric MultiDimensional Scaling
NOEC : No Effect Concentration
NQE : Norme de Qualité Environnementale
ODI : Outil de Diagnostic Invertébrés

OFB : Office Français de la Biodiversité
ONEMA : Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques
OTU : Operational Taxonomic Unit
PCR : Polymerase Chain Reaction
PICT : Pollution Induced Community Tolerance
PNEC : Predicted No Effect Concentration
PO : PhénolOxydase
POCIS : Polar Organic Chemical Integrative Sampler
PPDB : Pesticide Properties Database
PRC : Performance Reference Compound
PSEE : Polluant Spécifique de l'État Ecologique
RCO : Réseau de Contrôle Opérationnel
RDA : Redundancy Analysis
RPG : Registre Parcellaire Graphique
SDP : Substances Dangereuses Prioritaires
SIMA-Coise : Syndicat Interdépartemental Mixte pour l'Aménagement de la Coise
SMVVA : Syndicat Mixte des Vallées de la Veyre et de l'Auzon
SP : Substance Prioritaire
TSP : Tige Silicone Polaire

I. RAPPEL DU CONTEXTE ET DES OBJECTIFS

1. Contexte du projet :

1.1 Évaluation des cours d'eau dans la Directive Cadre sur l'Eau (DCE)

Adoptée par l'Europe en 2000, la DCE introduit de nouvelles notions modifiant notre approche dans la gestion de l'eau qui avait été jusqu'alors sectorielle, selon le type de milieu, le type d'usages ou la nature des pollutions (nitrates, substances dangereuses). Pour les cours d'eau, elle fixe comme objectifs environnementaux de protéger, d'améliorer et de restaurer leur qualité, mais également de réduire la pollution due à certaines substances chimiques dites « substances prioritaires » (SP). L'ensemble des compartiments des milieux aquatiques est pris en compte (eau, sédiment, faune et flore), avec l'obligation d'atteindre le bon état (chimique et écologique) de tous les cours d'eau à des échéances impératives. L'état chimique est apprécié sur la base de la comparaison des concentrations dans le milieu de chacune des 45 SP exprimées sous forme de moyenne annuelle et de concentration maximale avec leur norme de qualité environnementale (NQE), c'est-à-dire la concentration dans l'eau, le sédiment ou le biote ne devant pas être dépassée afin de protéger la santé humaine et l'environnement. Parmi ces SP on retrouve des produits industriels, des produits de consommation courante et bon nombre de pesticides de synthèse d'usage actuel et passé (par ex. insecticides organochlorés).

L'état écologique d'un cours d'eau est quant à lui l'appréciation de la structure et du fonctionnement des écosystèmes aquatiques associés à ce cours d'eau. Cette évaluation s'appuie sur différents éléments de qualité biologique (algues, plantes aquatiques, invertébrés et poissons) et sur l'hydromorphologie et la physico-chimie des cours d'eau (dans la mesure où ces éléments influent sur la biologie des organismes). Elle s'établit sur la base d'un écart à des conditions de référence (i.e. conditions représentatives d'un cours d'eau très peu influencé par l'activité humaine). Les concentrations de certains polluants spécifiques (PSEE) parmi lesquels figurent de nombreux herbicides et fongicides sont également mesurées dans les cours d'eau pour évaluer le bon état écologique.

Pour atteindre ces objectifs de bon état, les acteurs en lien avec la gestion des cours d'eau et des milieux aquatiques s'appuient, pour chaque district hydrographique (ou « bassin DCE ») :

- Sur un état des lieux, qui comprend une analyse des activités et des usages s'exerçant sur le territoire et une synthèse des impacts subis par les eaux de surface.
- Sur un programme de surveillance de l'état des eaux.
- Sur un plan de gestion, qui fixe pour 6 ans les objectifs de qualité à atteindre pour chaque cours d'eau du bassin et définit un programme de mesures territorialisé, décrivant les actions nécessaires à la réalisation de ces objectifs.

Les données recueillies dans le cadre de la surveillance fondent la connaissance de l'état des eaux et des impacts des activités humaines dont dépendent en grande partie l'efficacité et la pertinence des programmes de mesures. Actuellement, plus de la moitié des paramètres recherchés dans les programmes de suivi des agences de l'eau sont des produits phytosanitaires (<https://ree.developpement-durable.gouv.fr/>).

Or, malgré un effort d'analyse sans précédent, les données de la surveillance de la contamination des eaux par les produits phytosanitaires souffrent encore d'un manque de représentativité temporelle. En cause, la nature variable de cette contamination, avec une forte dépendance vis-à-vis des périodes de traitement et de la pluviométrie. Les échantillonnages ponctuels d'eau réalisés dans le cadre des suivis DCE à intervalles relativement espacés (≥ 1 mois) ne rendent donc que partiellement compte des fluctuations des concentrations en contaminants au cours du temps et peuvent conduire à une appréciation biaisée de la contamination du milieu (notamment par des substances transférées sous forme de pulses de courte durée). Par ailleurs, en limitant les suivis aux substances figurant dans les listes prioritaires (SP/SDP et PSEE) ou à celles possédant un seuil de danger (concentration sans effet prévisible sur l'environnement, PNEC), les méthodes d'évaluation actuelles ne rendent que partiellement compte de la diversité des molécules et des niveaux de concentration auxquels les organismes sont exposés dans le milieu, et ne reflètent aucunement leur biodisponibilité, rendant difficile l'interprétation des résultats en termes de risque (éco)-toxique. De plus, l'approche NQE s'applique à chaque substance prise individuellement et repose sur des données de toxicité mesurées en conditions contrôlées (espèces modèles et conditions expérimentales pas forcément représentatives des conditions du milieu). Elle ne permet donc pas d'évaluer l'effet des pesticides en milieu naturel ni de leurs interactions au sein de mélanges.

1.2 Positionnement du projet Impact-CE

Le projet Impact-CE est né d'une volonté de pallier les lacunes liées aux stratégies de diagnostic d'impact des produits phytosanitaires actuelles, i.e. principalement basé sur des mesures chimiques, ponctuelles, et de faible fréquence, mises en regard de seuils de toxicité théoriques. Le projet s'inscrit dans le plan national Ecophyto II avec un suivi de l'Office Français de la Biodiversité (OFB). Le plan Ecophyto II vise à réduire l'usage des produits phytosanitaires, leur transfert et leurs impacts sur la santé humaine et les milieux naturels. Il implique un élargissement de la gamme des indicateurs utilisés pour l'évaluation des usages et leurs évolutions mais également pour mieux cerner l'impact de l'utilisation de ces substances. Le projet Impact-CE s'inscrit dans le développement et l'application d'outils de mesure et d'indicateurs de l'impact *in situ* des substances phytosanitaires sur les cours d'eau (Axe 3 : « Évaluer et maîtriser les risques et les impacts », action n° 14 : « S'appuyer sur des indicateurs d'utilisation, d'impact et d'évolution des pratiques »).

Le projet Impact-CE fait suite à une première action financée dans le cadre du plan Ecophyto I : « Développement d'outils et d'indicateurs pour mieux évaluer et gérer la chaîne de pressions – impacts des pesticides sur les eaux de surface » conduite de 2012-2015 avec l'assistance technique de l'OFB¹. Cette première action s'est basée sur une approche s'appuyant sur la combinaison de mesures chimiques et biologiques au sein des cours d'eau différente de celle classiquement mise en

1 Anciennement ONEMA dans le cadre de ce projet

œuvre dans les réseaux de suivi. Elle s'est notamment focalisée sur des outils intégratifs développés à INRAE² (gamme d'échantillonneurs passifs, gamme de descripteurs basés sur des gammars encagés ou des communautés microbiennes de cours d'eau) et une stratégie de mise en œuvre qui permette d'atteindre une meilleure représentativité spatiale et temporelle de la mesure de la contamination.

Cette première action, par le biais d'un déploiement d'indicateurs sur 3 sites contrastés d'un point de vue agro-pédo-climatique, a appuyé l'intérêt d'une combinaison d'outils intégratifs chimiques et biologiques pour un meilleur diagnostic de la contamination des eaux de surface par les produits phytosanitaires. Cette approche s'est avérée particulièrement pertinente pour (i) l'échantillonnage de substances « fugaces » (ex. insecticides) transférées en période de crues et donc difficiles à échantillonner avec un suivi ponctuel, (ii) la mesure de la gravité des impacts toxiques et écologiques de l'exposition aux phytosanitaires, (iii) la mise en évidence de gradients spatiaux (gradient amont-aval, hiérarchisation de sous bassins-versants) et d'évolutions temporelles à court (en lien avec les crues) et moyen terme (variabilité saisonnière et inter-annuelle) et (iv) la discrimination de différents types de pressions phytosanitaires en lien avec des contextes agricoles contrastés.

Cette première action a permis de définir les conditions de mise en œuvre et d'interprétation d'un certain nombre de ces outils, ainsi que de mettre en évidence l'intérêt et les attentes des acteurs locaux vis-à-vis de ces outils et leur souhait de mieux connaître leurs utilisations possibles. Elle s'est conclue par la rédaction d'une synthèse portant sur les outils intégratifs d'intérêt pour la problématique « produits phytosanitaires » (Grenier et al., 2015), ainsi que par une proposition méthodologique à destination des acteurs de terrain pour la mise en œuvre et l'interprétation des mesures associées (Le Dréau et al., 2015).

2. Objectifs du projet Impact-CE

A l'issue de ce premier premier projet, il est apparu important de poursuivre l'action par des études complémentaires visant (i) à mettre en exergue l'intérêt de ces outils pour mieux faire le lien entre les impacts mesurés et les pratiques agricoles et (ii) à évaluer la faisabilité de leur transfert opérationnel et de leur déploiement par les gestionnaires. En particulier, les objectifs d'Impact-CE, dans la continuité de la précédente action, sont les suivants :

- **Élargir la gamme des outils intégratifs utilisables pour caractériser la contamination et évaluer l'impact des produits phytosanitaires sur les cours d'eau** : Cet objectif implique d'une part la recherche d'une plus large gamme de substances par les échantillonneurs passifs chimiques, mais aussi l'intégration d'un panel d'indicateurs d'impacts biologiques. Ces derniers ont porté sur différents types d'organismes ou fonctions écologiques, afin d'identifier l'impact des phytosanitaires à différentes échelles d'intégration écologique (de l'individu à l'écosystème) et temporelle (exposition passée ou actuelle), mais aussi à différents niveaux de spécificité (certains indicateurs ciblent une molécule en particulier, d'autres intègrent l'effet de différents contaminants) (Figure 1).

2 Anciennement Irstea au démarrage du projet

- **Mettre en regard ces outils afin d'identifier leur cohérence et apports spécifiques à un meilleur diagnostic des impacts et des causes potentielles** : Un objectif secondaire a été de mettre en regard les résultats avec les pressions estimées et notamment les usages agricoles de pesticides. Sur un des sites, déjà suivi lors du précédent projet, un objectif était également d'évaluer dans quelle mesure ces outils peuvent permettre de rendre compte d'une évolution des impacts suite à des changements de pratiques (comparaison anté/post actions de modification d'usage).

Par ailleurs, ce panel d'outils et d'indicateurs associés constituera une boîte à outils permettant d'ajuster au mieux le diagnostic environnemental aux conditions de terrain et aux besoins des opérationnels.

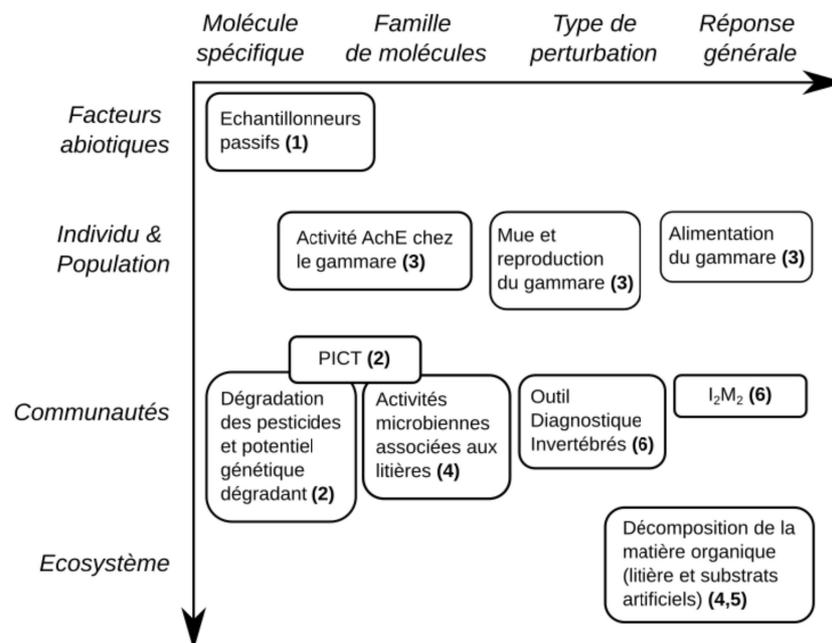


Figure 1 - Outils déployés au cours du projet, organisés selon leur niveau d'intégration écologique (axe vertical) et de leur degré de spécificité vis-à-vis d'une molécule ou perturbation particulière (axe horizontal). Les chiffres indiquent la section des chapitres III et IV présentant respectivement la méthodologie et les résultats pour chacun de ces outils.

- **Renforcer les échanges entre scientifiques, gestionnaires de l'eau et acteurs territoriaux (monde agricole)** : Ces échanges visent à (i) identifier plus précisément les besoins des opérationnels et les freins qu'ils ont pu identifier, (ii) faciliter l'appropriation des outils par les structures en charge du suivi et de la gestion de la qualité de l'eau sur les sites d'étude choisis (syndicats de rivières ou autres organismes), (iii) ainsi que la diffusion plus large des résultats auprès des acteurs territoriaux (en particulier des acteurs du monde agricole). Un retour d'expérience de la part des opérationnels sur l'utilisation de ces outils doit notamment permettre d'identifier les limites du projet et orienter les prochaines actions nécessaires à

l'amélioration du diagnostic de l'exposition des cours d'eau aux produits phytosanitaires et à l'appropriation des outils mis en avant dans ce projet. Cet objectif implique un dialogue étroit entre scientifiques et opérationnels, que l'on a cherché à matérialiser par divers modes d'échange (réunion, rencontres sur sites) et supports de communication (podcasts, plaquettes).

Les liste des outils, des scientifiques et des acteurs de terrain impliqués dans le projet sont respectivement données en Annexe 1, 2 et 3.

II. PRÉSENTATION DES SITES

1. Éléments méthodologiques généraux de choix des sites et stations

Le déploiement des indicateurs dans le cadre d'Impact-CE a été réalisé sur 4 sites (bassins-versants) différents (Figure 2). Les critères suivants ont orienté l'inclusion des sites dans le projet :

- Des activités agricoles dominantes à l'échelle du bassin.
- Des questions posées et un intérêt manifesté par les opérationnels en charge du suivi et de la gestion de la qualité de l'eau vis-à-vis des outils envisagés.
- L'existence d'un enjeu (captage prioritaire notamment) avec une problématique dominante de contamination des eaux par les phytosanitaires.
- La possibilité d'un relais logistique local.

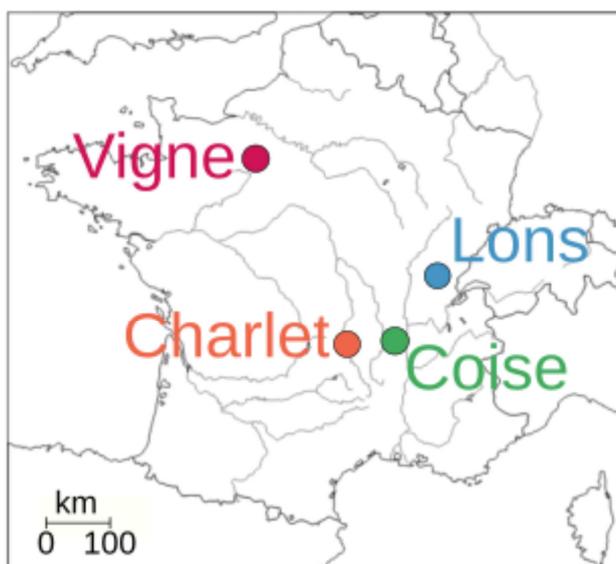


Figure 2 - Localisation des sites. Le code couleur pour chaque site sera utilisé tout au long du document.

Par ailleurs, la sélection des 4 bassins-versants a été motivée par l'intérêt d'inclure des sites présentant des contextes agro-pédo-climatiques, mais aussi des structures d'animation locale, contrastés. Ce dernier point permet en effet d'aborder le transfert vers les opérationnels avec des professionnels ayant des attentes variées et étant confrontés à des enjeux différents (Tableau 1) vis-à-vis de la contamination des milieux aquatiques par les phytosanitaires. Deux premiers sites (le Charlet et la Coise) ont déjà bénéficié de campagnes de suivi au cours de la précédente action. Les deux autres sites (les sources de la Vigne et le site de Lons-le-Saunier) correspondent à des Aires d'Alimentation de Captages (AAC) sur lesquelles des diagnostics de la contamination ont déjà été

réalisés par les gestionnaires locaux mais où persistent des questions auxquelles les suivis actuels ne permettent pas de répondre.

Tableau 1 - Sites retenus, principales caractéristiques et acteurs opérationnels

Site	Responsable	Caractéristiques principales
La Coise	SIMA Coise	Polyculture-élevage, Monts du Lyonnais, déjà suivi en juin 2014 et avril 2015
Le Charlet	SMVVA	Grandes cultures (débouché alimentaire et production de semences), coteaux et plaine de la Limagne, déjà suivi en avril 2015
AAC des Sources de la Vigne	Eau de Paris	Grandes cultures, sud-ouest de Paris, site karstique
AAC de Lons-le-Saunier	Ville de Lons-le-Saunier	Polyculture, agriculture bio encouragée, région de Lons-le-Saunier

Pour chaque site, le choix des stations de mesure et le déploiement des outils ont été abordés en concertation entre chercheurs et acteurs opérationnels, associant notamment les gestionnaires des eaux et la profession agricole. Ils ont été choisis afin de refléter différents contextes d'utilisation du sol et de se positionner le long d'un gradient de contamination amont-aval. Par ailleurs, certains outils biologiques nécessitent une confrontation des résultats avec une situation non impactée (station de référence). Ainsi, sur chaque site une station a été choisie a priori comme reflétant une situation de référence vis-à-vis de la contamination par les produits phytosanitaires. Le choix de cette station a été orienté par les connaissances antérieures des partenaires du projet ou déterminé par les données issues du suivi des pesticides par les agences de l'eau. Enfin, il a également fallu prendre en compte des considérations pratiques telles que la facilité d'accès, une hauteur d'eau minimale et un écoulement pérenne pour héberger les outils, ainsi qu'une situation pas trop en vue pour limiter les risques de vandalisme.

2. Site des Sources de la Vigne

2.1 Présentation

Situées à Rueil-la-Gadelière en Eure-et-Loire, les Sources de la Vigne sont un ensemble de 7 captages alimentant en eau potable la ville de Paris, via l'aqueduc de l'Avre. La contribution des Sources de la Vigne est de 25 000 m³/j en moyenne (AH2D – Environnement 2008). Les Sources de la Vigne sont alimentées en amont par un réseau de cours d'eau, dont le bassin représente une surface totale de 37 550 ha. Ces cours d'eau ont la particularité de s'infiltrer dans le sous-sol (karstique), progressivement ou brusquement (bétoires). L'eau, circulant dans le sous-sol pendant plusieurs kilomètres, est bloquée en aval par une masse argileuse : elle remonte alors à la surface

par des « cheminées » qui constituent les Sources de la Vigne. L'écoulement latéral dans le karst, qui dépend fortement des conditions hydroclimatiques, est rapide, d'une dizaine d'heures à quelques jours.

2.2 Contexte agricole

L'agriculture est une activité importante sur le bassin d'alimentation des Sources de la Vigne, qui s'étend sur 57,2 % du territoire. Les cultures céréalières (blé, orge) et oléagineuses (colza) y sont prédominantes (Figure 3). La forêt occupe la majeure partie du reste de la surface, notamment en amont.

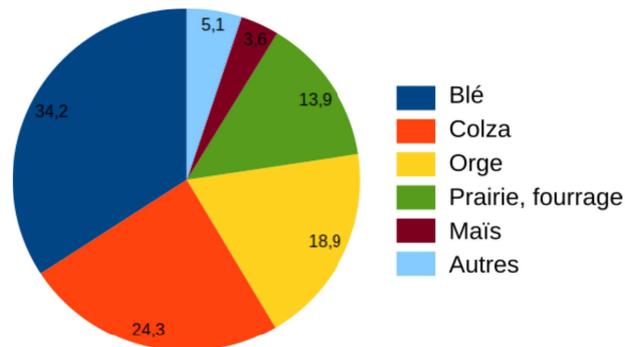


Figure 3 - Occupation de la surface agricole sur le bassin-versant des Sources de la Vigne (source : RPG 2012).

2.3 Problématique

Les Sources de la Vigne constituent un enjeu stratégique dans la mesure où elles contribuent fortement à l'alimentation en eau potable de la ville de Paris. Des mesures régulières dans les sources ont mis en évidence, lors d'événements pluvieux, des augmentations de la turbidité et des concentrations en nitrates et produits phytosanitaires. En ce qui concerne ces derniers, ce sont surtout les herbicides utilisés sur céréales qui posent problème (chlortoluron, isoproturon), avec des concentrations dépassant parfois 1 µg/L. Ces eaux de captage sont néanmoins des eaux « brutes » et ne sont donc pas des eaux de consommation. Pour se protéger de la pollution résultante d'épisodes de crue, Eau de Paris dérive vers une rivière l'eau des captages pendant les périodes de plus forte turbidité pour éviter la contamination des puits. Face à cette problématique, les captages des sources de la Vigne ont été reconnus comme captage prioritaire par le Grenelle de l'Environnement en 2009.

Intérêt des acteurs de terrain pour les outils intégratifs sur ce site :

De nombreuses questions restent en suspens quant au fonctionnement de l'hydrosystème et la dynamique du transfert des pesticides dans le sous-sol karstique pour lesquelles le gestionnaire souhaiterait évaluer l'intérêt des outils intégratifs afin d'apporter des éléments de réponse. Parmi ces questions : le « passage souterrain » du cours d'eau influence-t-il la contamination au niveau de la source (ex : atténuation entre les cours d'eau et les sources) ? Retrouve-t-on les mêmes molécules à l'amont (cours d'eau) et à l'aval (source) ? Quelle est la contribution de chaque sous-bassin-versant à la contamination des sources ? La question de la pertinence du suivi des pesticides au niveau des sources se pose également du fait du manque de représentativité des échantillonnages ponctuels (non prise en compte de pics de contamination, possibilité de « manquer » certaines molécules).

Dans ce contexte, où le gestionnaire dispose déjà d'un suivi ponctuel conséquent (fréquence bimensuelle avec l'analyse d'un large spectre de substances), un objectif complémentaire est de vérifier si ces suivis ponctuels sont suffisants ou s'ils gagneraient à être complétés par des suivis basés sur les outils intégratifs testés.

Pour répondre à ces interrogations, il a été décidé sur ce bassin d'étude de déployer les échantillonneurs passifs et les gammars engagés dans trois cours d'eau afin d'en estimer la contribution respective à la contamination et de discriminer leurs sous-bassins-versants en termes de toxicité, en lien avec les usages agricoles. Compte tenu du caractère non pérenne des écoulements dans ces cours d'eau, le suivi des communautés microbiennes et de macro-invertébrés naturelles n'a pas été jugé pertinent. Les échantillonneurs passifs ont également été mis en place au niveau des sources afin d'évaluer si ces outils permettaient de rendre compte des évolutions de contamination entre les cours d'eau et les sources, et permettaient d'identifier des substances non suivies par le gestionnaire. Les gammars engagés n'ont en revanche pas pu être déployés au niveau des sources dans la mesure où ces outils n'ont pas été calibrés, à ce jour, pour réaliser des mesures au sein de captages.

2.4 Choix des stations d'étude

4 stations d'étude ont été choisies (Figure 4), une au niveau des sources, 3 stations sur les 3 rivières principales (Avre, Buternay, Lamblore) en choisissant l'emplacement des stations en amont d'importants engouffrements connectés aux sources.

- Parmi les Sources de la Vigne, c'est le captage du **Nouvet** qui mélange les sources du Chêne, Ganderole et Blaou qui a été choisi. Des études précédentes ont en effet montré de fortes concentrations de pesticides sur ces sources et des expérimentations de traçage ont montré qu'elles étaient connectées au bassin d'alimentation amont. Les échantillonneurs passifs ont été placés dans un aquarium en dérivation, alimenté en continu par l'eau du captage.

- Une station sur l'Avre, seule rivière pérenne du bassin. L'emplacement de la station est proche d'un point de suivi RCO (Coordonnées N 48° 41' 41,3" E 0° 49' 12,5", surface du sous-bassin : 106,7 km²).
- Une station sur le **Buternay** sur la commune de Le Rohaire, située entre les bétaires de « Le Jarrier (amont) » et « Ancien Lavoir ». (Coordonnées N 48° 40' 13,6" E 0° 50' 53,2", surface du sous-bassin : 11,1 km²).
- Une station sur le **Lamblore** juste avant la bétaire de « Haut Chevrier ». (Coordonnées N 48° 37' 50,5" E 0° 55' 27,7", surface du sous-bassin : 27,6 km²).

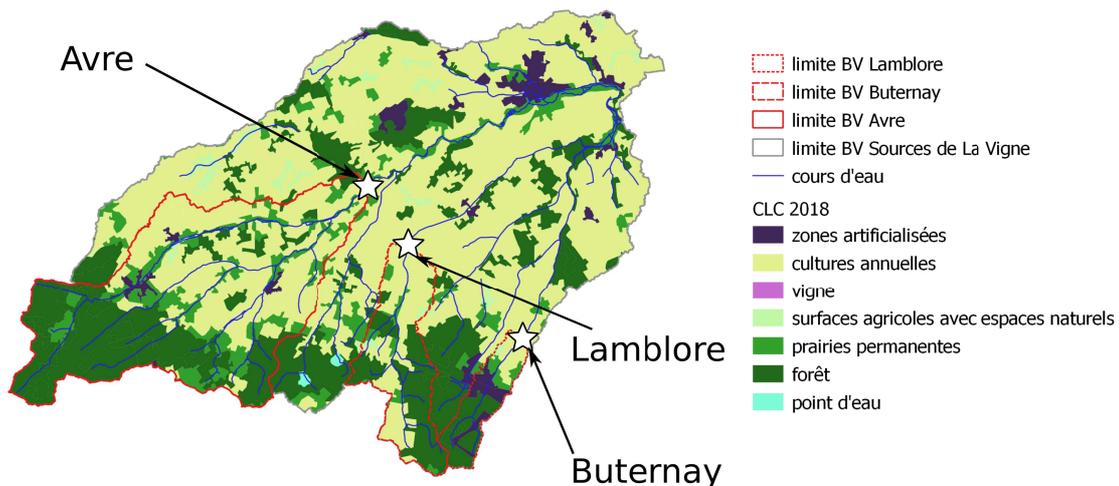


Figure 4 - Bassin-versant des Sources de la Vigne - Stations de suivi.

Les principales contaminations (herbicides céréales) ont lieu en automne – hiver, entre les mois de novembre et février suivant les années. Le manque de précipitations sur le bassin d'étude à la fin de l'année 2016 - début 2017 a incité à organiser la campagne à la fin de l'hiver 2017 (du 09 février au 09 mars). Une seconde campagne initialement prévue en automne 2018 a été annulée en raison d'une très faible pluviométrie qui n'a pas permis d'engendrer d'écoulements suffisants dans les cours d'eau non pérennes.

2.5 Paramètres généraux

Hydrométrie, pluviométrie

La Figure 5 présente les débits de l'Avre et la pluviométrie mesurée sur le bassin en février - mars 2017. Les débits sont mesurés sur la station de Saint Christophe sur Avre (DREAL Haute Normandie, station H9202020, proche de notre station Avre), et les données de précipitations sont fournies par météo France (station 28206001 à Laons, à 15 km à l'Est des sources de la Vigne). Bien que la station de mesure de débit et la station météo France ne soient pas situées sur le même bassin, une bonne adéquation entre pluviométrie et débit est observée (par exemple l'épisode pluvieux et le pic de crue du 06 – 07 mars). La première campagne a débuté à la fin d'un épisode de

crue lié à des précipitations ayant eu lieu au début du mois de février. Par la suite 2 crues sont visibles successivement sur l'Avre (02 et 07 mars).

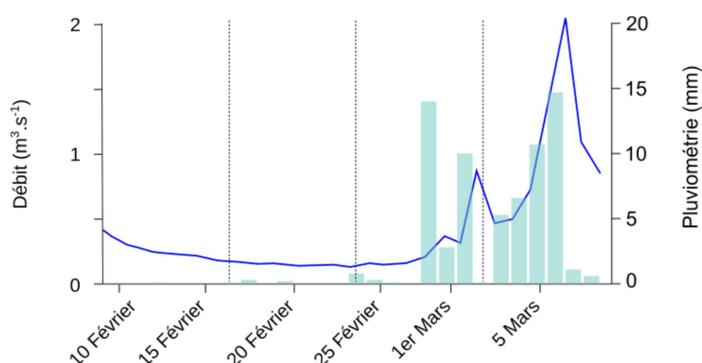


Figure 5 - Débits (courbe) de l'Avre (DREAL Haute-Normandie, station H9202020) et précipitations à la station Météo France de Senonches (histogramme) en février – mars 2017.

Paramètres majeurs

La Figure 6 présente quelques paramètres physico-chimiques mesurés pendant le mois d'expérimentation.

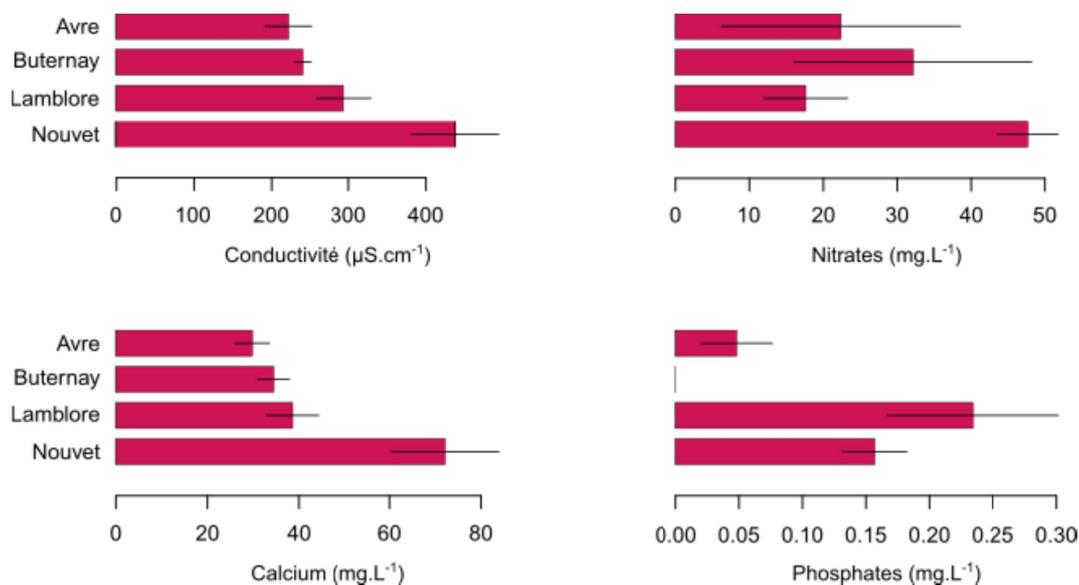


Figure 6 - Valeurs moyennes des paramètres physico-chimique mesurés sur le bassin d'alimentation des Sources de la Vigne ($n=5$ sauf pour Nouvet $n=3$) du 09 février au 09 mars 2017. Les barres d'erreur représentent les écart-types.

Les stations présentent des caractéristiques relativement similaires, notamment en ce qui concerne les concentrations en nitrates élevées, certains prélèvements dépassant les 50 mg/L. La

concentration en phosphates est plus variable et plus importante dans le Lamblore et les sources du Nouvet que dans l'Avre et le Buternay. La station des sources du Nouvet présente une conductivité plus élevée que les 3 stations amont situées en rivière, liée à une concentration en ions calcium supérieure (caractère souterrain des sources).

Métaux

Les concentrations moyennes de quelques métaux dissous (<0.45 µm) sur les stations amont sont présentées sur la Figure 7. Une forte augmentation des concentrations de quelques métaux le 02/03/2017 est responsable d'une importante variabilité (notamment pour le fer et l'aluminium, mais aussi le zinc et le manganèse). C'est en particulier le cas sur la station du Lamblore sur laquelle des concentrations en fer de l'ordre de 60 mg/L ont été mesurées.

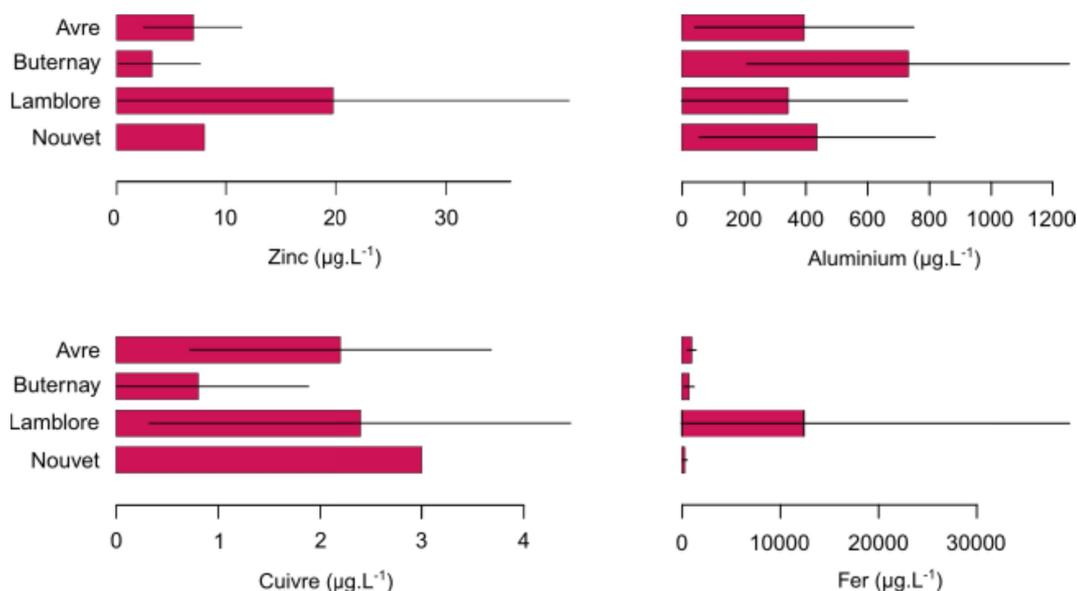


Figure 7 - Valeurs moyennes des concentrations en métaux dissous mesurées sur le bassin d'alimentation des Sources de la Vigne (n = 5 sauf sur le Nouvet n=1-3) en Février-Mars 2017. Les barres d'erreur représentent les écart-types.

3. Site de l'AAC de Lons-le-Saunier

3.1 Présentation

Située dans le département du Jura, au nord-ouest de Lons-le-Saunier, la zone de captage de Villevieux permet l'alimentation en eau potable de la ville de Lons-le-Saunier et des communes avoisinantes.

Un bassin d'alimentation du captage d'environ 5 400 ha a été défini en 2010, présenté sur la Figure 8 (Ville de Lons-le-Saunier, 2012). Plusieurs cours d'eau (la Madeleine, le Sedan et les Mouraches) serpentent sur ce bassin avant de confluer dans la Seillette et de traverser la zone de protection du captage.

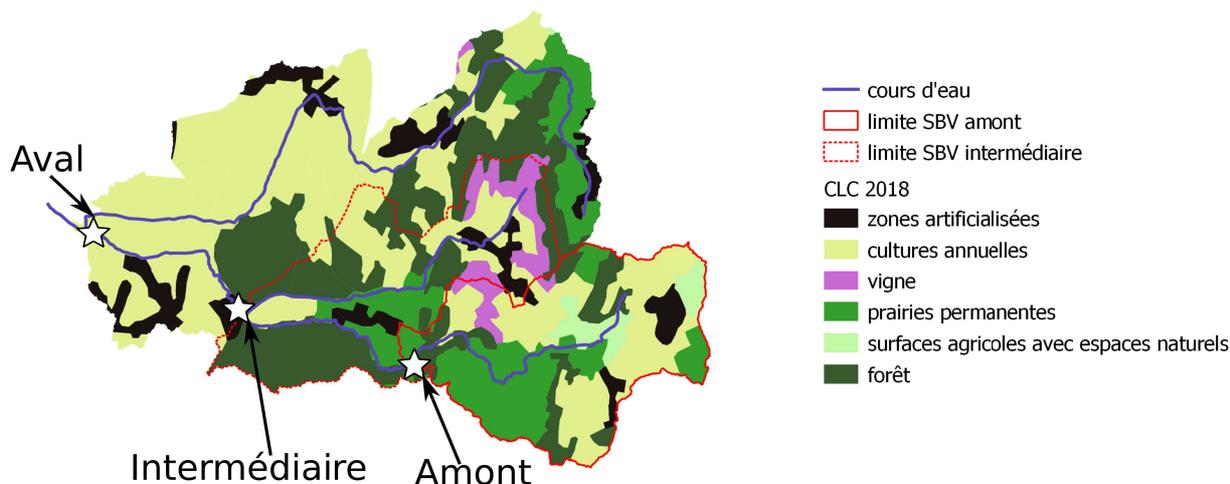


Figure 8 - Bassin-versant de la Madeleine - Stations de suivi.

3.2 Contexte agricole

Selon le Registre Parcellaire Graphique de 2012 (Figure 9), les surfaces agricoles recouvrent 54,1 % du territoire du bassin. L'AAC peut être séparée en deux zones distinctes :

- La partie amont à l'Est présente un paysage de collines, occupée principalement par des prairies et de la viticulture.
- La partie aval à l'Ouest, en plaine, tournée vers les grandes cultures (céréales, colza, maïs...).

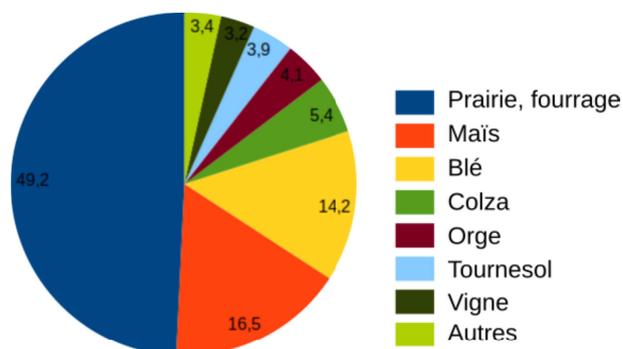


Figure 9 - Occupation de la surface agricole sur l'AAC de Lons-le-Saunier (RPG 2012).

3.3 Problématique

Le captage de Villevieux a été reconnu comme captage prioritaire par le Grenelle de l'Environnement en 2009. Afin d'évaluer la qualité des eaux superficielles alimentant le captage et de mesurer l'efficacité d'actions engagées pour améliorer les pratiques agricoles, la ville de Lons-le-Saunier a réalisé une étude à partir de 2011. Elle a pour cela mis en place un réseau de 11

stations, réparties sur les 4 rivières principales présentes sur le bassin. Des prélèvements ponctuels pour analyses chimiques y ont été réalisés de 2011 à 2017 (2 à 3 prélèvements par an) dans la mesure du possible après des événements pluvieux conséquents (> 10 mm sur 10 jours).

Cette étude a mis en évidence l'importance de la contamination en pesticides des rivières du bassin, et ce dès l'amont de celles-ci. Ainsi, pour chaque station et chaque prélèvement, les cumuls de concentrations dépassent généralement le seuil de 0,5 µg/L. Tous types de substance sont retrouvés : herbicides totaux (glyphosate/AMPA), herbicides utilisés sur maïs et/ou céréales (métolachlore, chlortoluron, bentazone, clopyralid, etc...), fongicides vignes (foséthyl-aluminium...) (Naldéo, 2012, 2014, 2016). Les concentrations en pesticides les plus importantes sont retrouvées en mai-juin, ce qui correspond aux périodes de traitement de la vigne (fongicides) ou encore du maïs (herbicides).

Intérêt des acteurs de terrain pour les outils intégratifs sur ce site :

La Ville de Lons-Le-Saunier souhaite valider les conclusions du suivi ponctuel en cours à la fois en termes de gradient de contamination amont-aval et de nature de molécules recherchées.

Une estimation conjointe d'altération de la qualité biologique des écosystèmes aquatiques est également une question soulevée sur ce site.

3.4 Choix des stations d'étude

En concertation avec le service des eaux de la ville de Lons-le-Saunier, 3 stations ont été choisies sur la rivière de la Madeleine (Figure 8). Cette rivière présente en effet l'avantage de cumuler les substances de tous les types de cultures présents sur le bassin (maïs, céréales, vigne).

- Une station en **Amont** de la Madeleine est choisie, correspondant à la station 6 du réseau de mesure de la ville de Lons-le-Saunier (coordonnées N 46° 42' 17,7" E 5° 31' 8,8", surface du sous-bassin : 10,2 km²). Cette station apparaît comme la moins contaminée (d'après les suivis antérieurs) sur la rivière de la Madeleine, notamment en pesticides utilisés en viticulture.
- Une station **Intermédiaire** située juste après le confluent avec la rivière des Mouraches (coordonnées : N 46° 42' 38,3" E 5° 28' 51,0", surface du sous-bassin : 20,0 km²). Cette rivière est la plus contaminée en termes de substances d'origine viticole. Cette station Intermédiaire permet de quantifier l'influence des Mouraches (et donc des pratiques viticoles) sur la Madeleine en termes de niveau de contamination et d'impact biologique.
- Une station en **Aval** située juste en aval du confluent avec la rivière du Sedan (coordonnées : N 46° 43' 25,3" E 5° 26' 49,5", surface du sous-bassin : 39,8 km²), et proche du captage. Cette station permet de mesurer l'impact supplémentaire possible des grandes cultures présentes en plaine (ex : maïs, colza, blé), et pour partie drainées, sur la qualité de l'eau.
- Les réponses de certains outils (ex : dégradation des litières, PICT) doivent être comparées à une situation de référence (station pas ou peu contaminée par les produits phytosanitaires)

afin de rendre compte d'une altération. Aucun site de référence non contaminé par les pesticides n'a pu être identifié sur l'AAC, qui présente une contamination significative même dans les parties amont des cours d'eau. Une 4ème station a donc été choisie hors du bassin d'alimentation. Elle se situe sur la commune de Baume-les-Messieurs à l'amont de la rivière **Seille**, à une dizaine de kilomètres du bassin d'étude. Elle semble répondre aux critères d'une station de référence : elle est située non loin d'une station suivie par l'agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse dont l'état chimique et écologique y est considéré comme bon à très bon. Les coordonnées géographiques de cette station de référence sont les suivantes : N 46°42'58,4", E 5°37'53,8", et la surface du sous-bassin versant est de 58,8 km².

Deux campagnes ont été réalisées en 2017 :

- Une première campagne entre les mois de mai et juin 2017 (du 16 mai au 13 juin) pour appréhender l'impact des cultures printanières (traitements herbicides maïs et fongicides céréales et vigne).
- Une seconde campagne en octobre 2017 (du 03 au 30 octobre) pour cibler l'impact des traitements herbicides des céréales d'hiver.

3.5 Paramètres généraux

Hydrométrie, pluviométrie

La Figure 10 présente les débits de la Seille (pas de stations de mesures de débit sur l'AAC) et la pluviométrie mesurée sur le bassin respectivement en mai - juin 2017 et octobre 2017. Les débits sont mesurés sur la station de Voiteur (DREAL Bourgogne, station U3404030 à 4 km en aval de la station de référence), les données de précipitations sont fournies par Météo France (station 39362001 à Montmorot, à 1 km au sud de la station Amont).

Bien que la station de mesure de débit et la station Météo France ne soient pas situées sur le même bassin, une bonne adéquation entre pluviométrie et débit est observée (par exemple l'épisode pluvieux du 03 juin et le pic de crue du 04 juin). La première campagne a débuté à la fin d'un important épisode de crue lié à de fortes précipitations ayant eu lieu au début du mois de mai. Par la suite 2 petites crues sont visibles sur la Seille (19 mai et 04 juin). La seconde campagne est marquée par une seule augmentation de débit (04 octobre). Les débits de la Seille sont relativement faibles au regard des débits moyens observés sur les 10 années précédant le déploiement des indicateurs (2006-2016). Les outils ont donc été immergés dans des conditions faibles de débits et de hauteurs d'eau, particulièrement en octobre 2017 (0,34 m³/s contre 2,01 m³/s en moyenne depuis 2006).

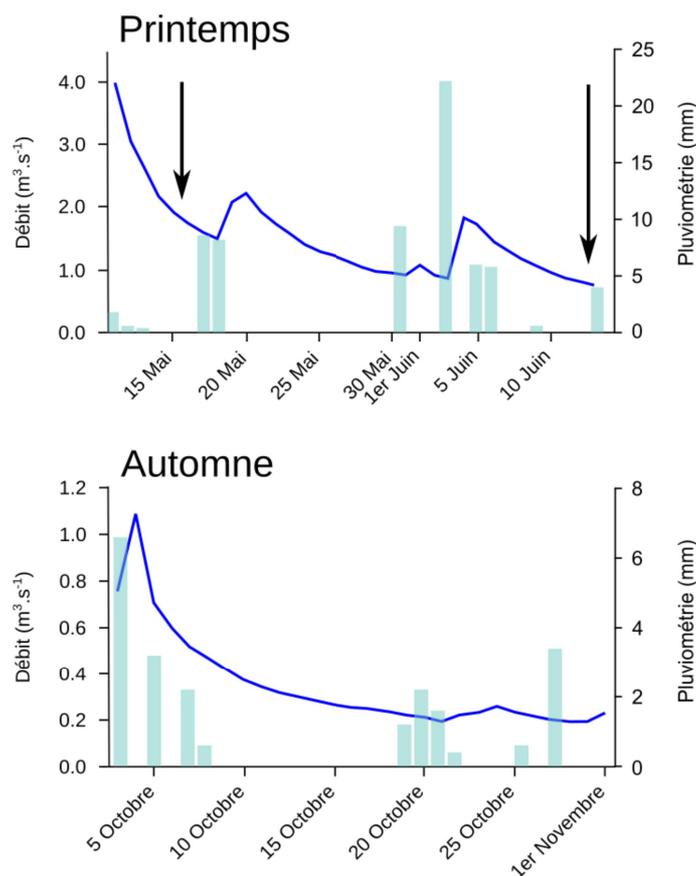


Figure 10 - Débits (courbe) de la Seille (DREAL Bourgogne, station U3404030) et précipitations sur la station Météo France de Lons-le-Saunier (histogramme) au printemps et à l'automne 2017. Les flèches noires représentent le début et la fin de l'exposition des dispositifs dans les cours d'eau au printemps. Pour l'automne, la plage du graphique correspond à la période d'immersion des dispositifs.

Paramètres majeurs

La Figure 11 présente quelques paramètres physico-chimiques mesurés sur les 4 stations du site de Lons-le-Saunier pendant les campagnes de printemps et octobre 2017. Les vitesses de courant mesurées sont très faibles (sauf pour la Seille au printemps), d'autant plus pour la campagne d'automne, en accord avec les mesures de débits présentées précédemment (Figure 10). La station Amont présente les plus faibles vitesses, l'eau étant quasiment stagnante sur quelques dates de la campagne d'octobre. Peu de différences sont à signaler sur la composition générale des eaux des 4 stations (ions majeurs). Les concentrations en ions calcium élevées sont caractéristiques du substrat calcaire jurassien. Les concentrations en nitrates et phosphates sont relativement peu élevées sur les 3 stations de l'AAC et s'avèrent plus importantes dans la station de référence.

En se référant au système d'évaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau (arrêté du 27 juillet 2015), ces paramètres obtiennent un classement de qualité de l'eau par altération de très bon à

moyen, révélant globalement un bon état chimique des eaux vis-à-vis de ces paramètres. Les variations de température sont essentiellement expliquées par la saisonnalité, avec une température supérieure de 3,7 °C (en moyenne) au printemps. Les écarts entre les sites sont moindres, avec toutefois une température sensiblement plus fraîche sur la station de référence, surtout au printemps.

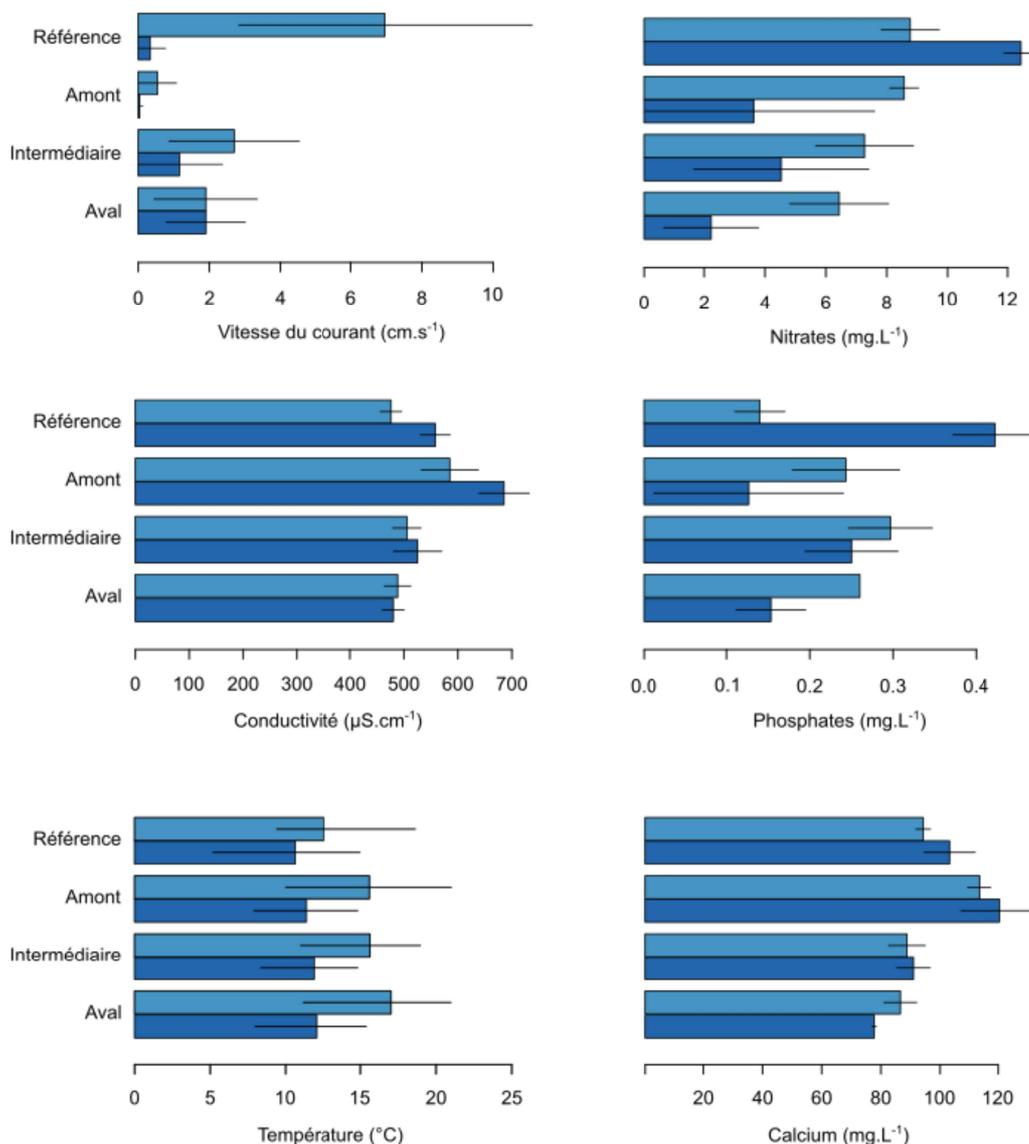


Figure 11 - Valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques mesurés sur le bassin-versant de l'AAC de Lons-le-Saunier ($n=5$ pour les mesures terrain, $n=3$ pour les ions majeurs) en mai-juin (bleu clair) et octobre (bleu foncé) 2017. Les barres d'erreur représentent les écart-types, sauf pour la température (amplitude de variation).

Métaux

Les concentrations moyennes en métaux dissous sont présentées sur la Figure 12. La station de référence présente des concentrations en métaux différentes des stations de l'AAC, en particulier au printemps : les concentrations y sont notamment moins élevées pour les éléments Fer, Cuivre, Aluminium et Arsenic.

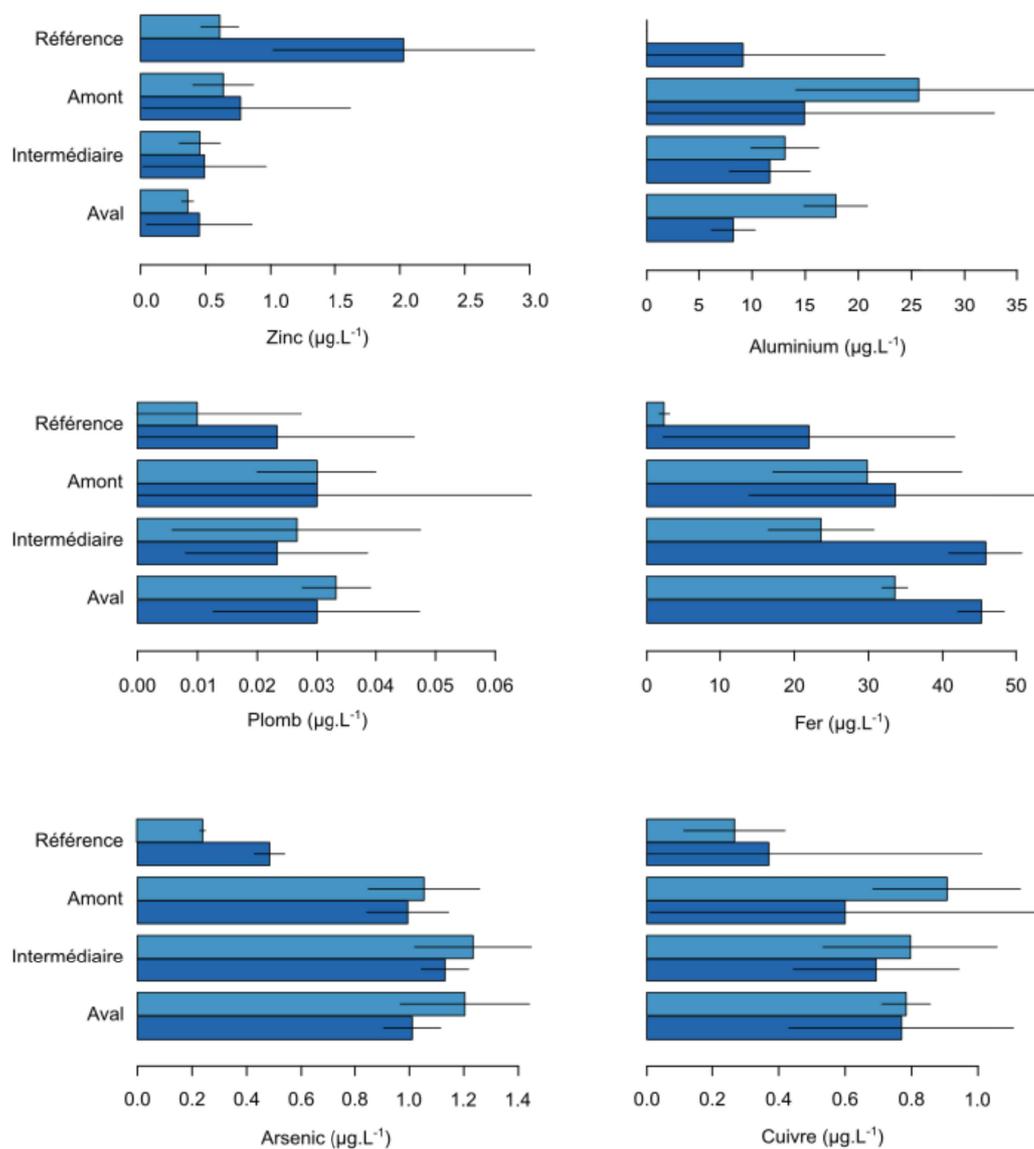


Figure 12 - Valeurs moyennes des concentrations en métaux dissous mesurées sur le bassin-versant de l'AAC de Lons-le-Saunier (n=3) en mai-juin (bleu clair) et octobre (bleu foncé) 2017. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.

4. Site du Charlet

4.1 Présentation

Situé au sud de Clermont-Ferrand en Auvergne, le Charlet est un affluent direct de l'Allier. Son bassin de 42 km² s'étend des Puys de Peyronère et de Saint-Sandoux à la plaine de Limagne (SMVVA, 2015).

Le bassin du Charlet est essentiellement un territoire de plaine, avec quelques zones de coteaux (puys). Le climat du bassin est de type continental, caractérisé par une faible pluviométrie (590 mm/an), avec des précipitations plus abondantes au printemps et en été (SMVVA, 2015). Le réseau hydrographique est peu naturel : le lit du cours d'eau a été recalibré et son cours rectifié, certaines portions sont canalisées, d'autres disparaissent pour ressortir plus en aval. A noter que les cours d'eau (Charlet et ses petits affluents) prennent leur source directement au milieu des parcelles agricoles.

4.2 Contexte agricole

L'agriculture est l'activité prépondérante sur le bassin du Charlet, s'étendant sur 3 227 ha soit 80 % de la surface du territoire. La culture céréalière est prédominante, le blé représentant 58 % de la Surface Agricole Utile. Les cultures du maïs, betteraves et oléagineux sont également bien représentées sur le bassin (Figure 13).

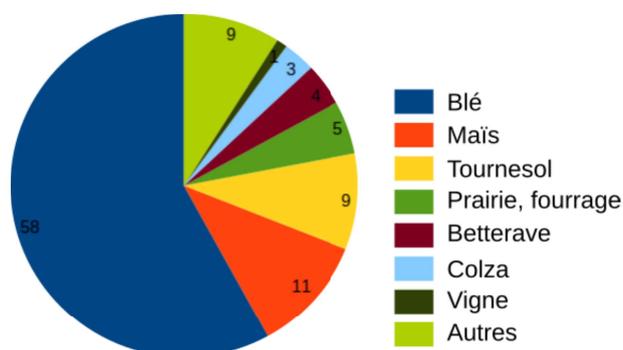


Figure 13 - Occupation de la surface agricole sur le bassin-versant du Charlet (source : SMVVA, RPG 2012).

4.3 Problématique

Les suivis DCE réalisés en aval du Charlet juste avant le confluent avec l'Allier (point RCO) ainsi que divers études réalisées sur le bassin (ONEMA) ont mis en évidence une dégradation de la qualité des eaux (SMVVA, 2015) liée à :

- Des pollutions azotées d'origine agricole constatées dès la partie amont du cours d'eau (nitrates) et des pollutions par les matières phosphorées essentiellement liées à des problèmes d'assainissement.

- Des pollutions par les pesticides : les cumuls de concentrations dépassent dans 75 % des cas le seuil de 0,5 µg/L (Phyt'eauvergne, 2014), les épisodes de contamination survenant généralement en fin d'hiver et au printemps. Les substances actives les plus détectées sont en majorité le glyphosate et son métabolite AMPA, ainsi que des herbicides utilisés sur céréales et maïs (ex : s-métolachlore, bentazone, 2,4 D). Des fongicides sont également quantifiés (ex : tébuconazole). Ces résultats impliquent un risque de non atteinte du bon état écologique des masses d'eau du bassin en 2021, selon le classement de la DCE pour le paramètre « pesticides ».

Intérêt des acteurs de terrain pour les outils intégratifs sur ce site :

Sur ce site, le SMVVA souhaite savoir dans quelle mesure ces outils peuvent contribuer à valider les résultats des suivis ponctuels existants et apporter une information supplémentaire sur la gravité des impacts de la contamination de l'eau sur les organismes aquatiques.

4.4 Choix des stations d'étude

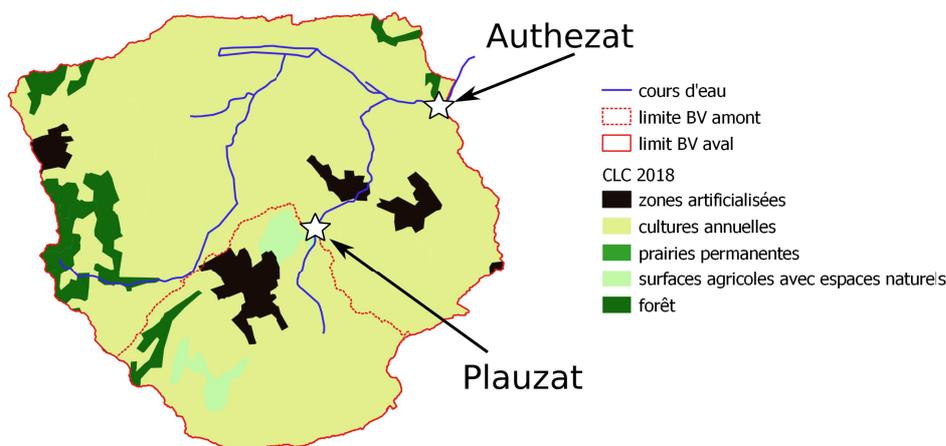


Figure 14 - Bassin du Charlet - Stations de suivi.

Au regard des objectifs et des contraintes opérationnelles inhérentes au déploiement des outils, 2 stations (Figure 14) ont été sélectionnées :

- **Authezat**, qui correspond au point de suivi du RCO, à l'exutoire de la rivière (Coordonnées N 45° 39' 15,2" E 3° 11' 40,8', surface du sous-bassin : 40,4 km²).
- Un point de suivi en amont du Charlet, en aval de la commune de **Plauzat** (Coordonnées N 45°37'46,4" E 3° 9' 45,9", surface du sous-bassin : 11,5 km²) qui correspond à un bassin amont plus pentu et plus sujet au ruissellement que le reste du bassin.

- Les réponses de certains outils (ex : dégradation des litières, PICT) doivent être comparées à une situation de référence (station pas ou peu contaminée par les produits phytosanitaires) afin de rendre compte d'une altération. Aucun site de référence non contaminé par les pesticides n'a pu être identifié sur le bassin du Charlet, où les cours d'eau prennent leur source au sein même de parcelles agricoles. Situé sur la commune de Saint Genès-Champanelle, l'amont de la rivière **Artière** semble répondre aux critères d'une station de référence : c'est une rivière d'un bassin-versant avoisinant (à une quinzaine de km au nord-ouest du bassin du Charlet) et les concentrations en produits phytosanitaires et nutriments y sont faibles (données du projet de recherche EcoBioPest). Les coordonnées géographiques de cette station de référence sont les suivantes : N 45°43'14,3", E 3°01'16,2", et la surface du sous-bassin est de 2,8 km².

Une campagne a été réalisée durant le mois de juin 2017 (du 1 au 29 juin) pour appréhender l'impact des cultures printanières et estivales (maïs notamment).

4.5 Paramètres généraux

Hydrométrie, pluviométrie

En l'absence de stations de mesure de débit sur le Charlet, des capteurs de pression (capteurs Mini DIVER et baroDIVER – Schlumberger - fournisseur SDEC France) ont été disposés en aval sur la station d'étude « Authezat » afin de mesurer les hauteurs d'eau. La Figure 15 présente également les données de précipitations fournies par Météo France (station 63282001 à Plauzat).

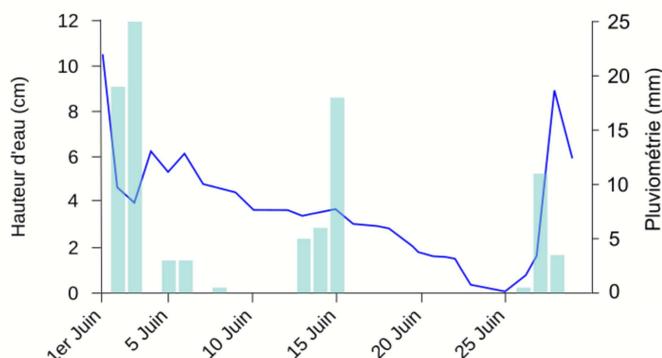


Figure 15 - Hauteurs d'eau sur la station Authezat du Charlet (courbe) et pluviométrie à la station Météo France de Plauzat (juin 2017).

Plusieurs augmentations de hauteur d'eau sont visibles, dont les 3 principales se déroulent les 03, 20 et 27 juin. Ces augmentations de hauteur d'eau sont généralement concomitantes avec des événements pluvieux, indiquant qu'il y a eu transfert rapide (ruissellement, drainage) des eaux pluviales vers le cours d'eau.

Paramètres majeurs

Les concentrations en nitrates sont très élevées sur les 2 stations du Charlet, ce paramètre obtenant un classement de qualité de l'eau par altération (arrêté du 27 juillet 2015) de mauvais (concentrations supérieures à 50 mg de nitrates/L, Figure 16). Les concentrations en nitrates sont plus élevées sur la station de Plauzat : en moyenne 71 mg/L contre 52 mg/L sur Authezat. L'Artière, au contraire, présente des concentrations en nitrates faibles (4 mg/L en moyenne). Les concentrations en phosphates sont plus importantes à Authezat, sans doute le fait de la présence d'une station d'épuration en aval d'Authezat, dont l'impact du rejet a déjà été mis en évidence (SMVVA, 2015).

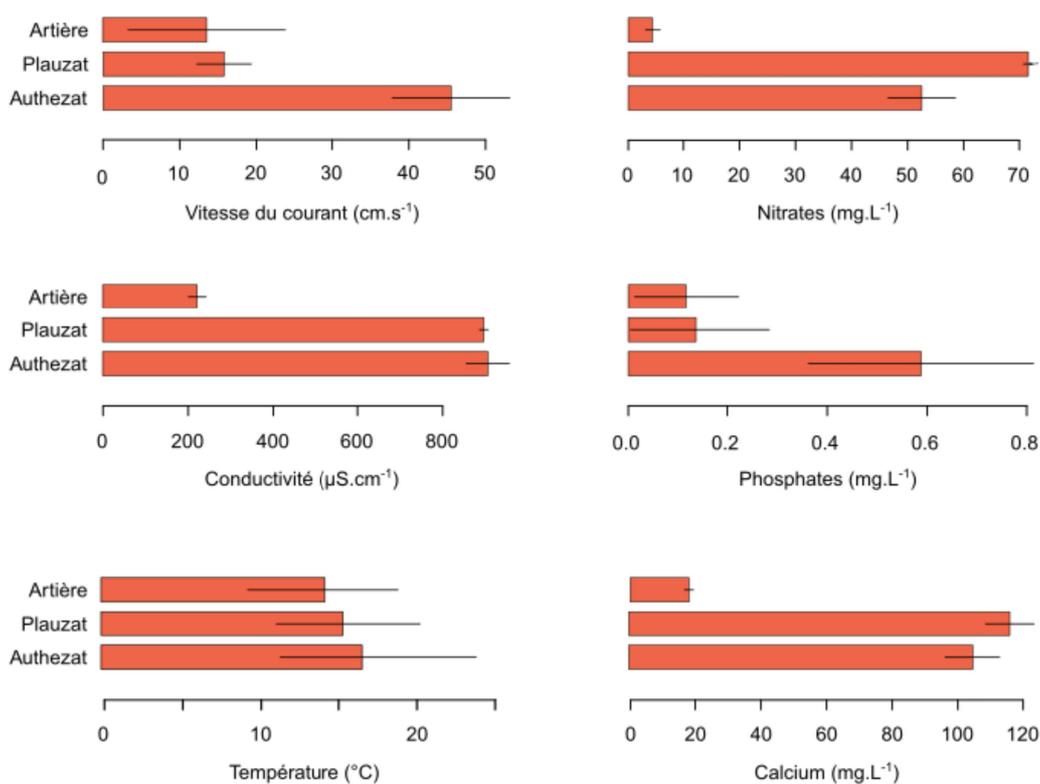


Figure 16 - Valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques mesurés sur le bassin-versant du Charlet ($n=5$ pour les mesures terrain, $n=3$ pour les ions majeurs) en juin 2017. Les barres d'erreur représentent les écart-types, sauf pour la température (amplitude de variation).

L'Artière présente une conductivité bien plus faible que les deux stations situées sur le Charlet (230 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en moyenne contre environ 900 $\mu\text{S}/\text{cm}$ pour Authezat et Plauzat). L'analyse des ions majeurs confirme ce résultat : les concentrations en ions Ca^{2+} , mais aussi Mg^{2+} , HCO_3^- , SO_4^{2-} sont par exemple de 4 à 6 fois moins élevées sur l'Artière que sur le Charlet, ce qui reflète une différence de substrat.

Effectivement, le Charlet est une rivière située en plaine, reposant sur un substrat constitué de roches sédimentaires (alternance de calcaires marneux et dolomitiques), d'où les fortes

concentrations notamment en ions calcium. La station de l'Artière est quant à elle située sur les coteaux, principalement constitués de roches volcaniques granitiques (basalte). Ces deux rivières sont donc différentes du point de vue géologique et pédologique, et donc de la composition chimique générale de l'eau. La température elle aussi varie entre les stations le long du gradient d'altitude, avec les températures les plus basses dans la station de référence (moyenne 14,3 °C) et les plus élevées dans la station aval d'Authezat (moyenne 16,7 °C)

Métaux

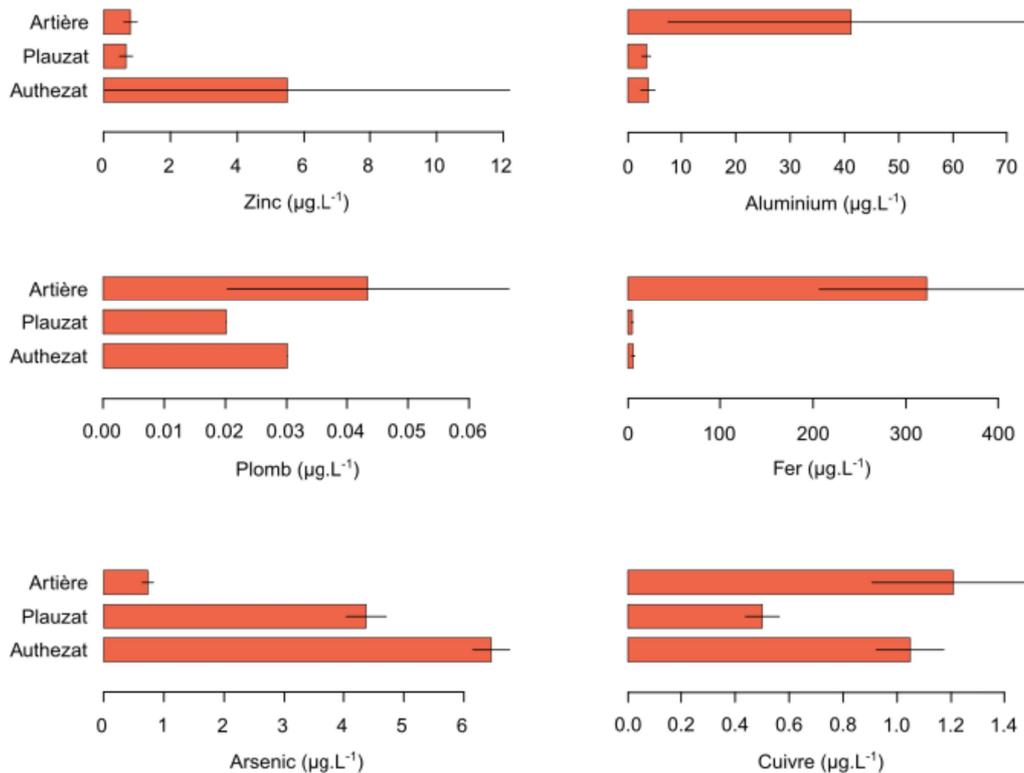


Figure 17 - Valeurs moyennes des concentrations en métaux dissous mesurées sur le bassin-versant du Charlet (n=3) en juin 2017. Les barres d'erreur représentent les écart-types.

Les concentrations moyennes de quelques métaux dissous sont présentées sur la Figure 17. La station de l'Artière présente des concentrations en métaux contrastant avec les 2 stations du Charlet : les concentrations y sont notamment beaucoup plus élevées en fer ou en aluminium (et manganèse) et au contraire plus faibles pour l'arsenic. Comme pour les ions majeurs, la nature de substrats des 3 rivières explique ces différences. A noter que le zinc présente des concentrations plus élevées à Authezat qu'à Plauzat, suite à un pic de contamination lors du premier prélèvement, potentiellement lié à un apport anthropique.

5. Site de la Coise

5.1 Présentation

Situé au nord de Saint-Etienne sur les départements de la Loire et du Rhône, le bassin-versant de la Coise couvre une superficie de 340 km². La Coise est un affluent de la Loire et s'écoule sur un linéaire de 52 km, de sa source à Saint-Romain-en-Jarez jusqu'à son confluent avec la Loire à Montrond-les-Bains. Le réseau hydrographique de ce bassin est relativement dense, avec plus de 200 km de rivières et ruisseaux, drainant de nombreuses vallées des monts du Lyonnais sur la partie amont du bassin.

C'est dans la partie amont du bassin que sont situées les stations d'étude du projet Impact-CE : la Coise y traverse les Monts du Lyonnais caractérisés par un substrat géologique granitique. Le climat du bassin est de type continental tempéré et reçoit en moyenne 800 mm de précipitations par an. La Coise présente un régime hydrologique de type pluvial caractérisé par de hautes eaux hivernales et printanières et un étiage estival.

5.2 Contexte agricole

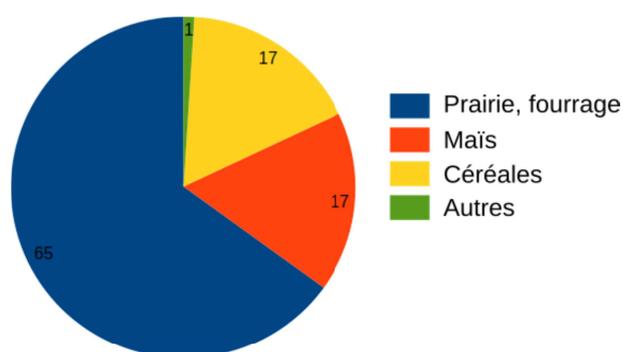


Figure 18 - Occupation de la surface agricole sur le bassin-versant de la Coise (source : SIMA Coise, Diagnostic 2012).

L'agriculture est l'activité prépondérante sur le bassin de la Coise. Principalement dirigée vers l'élevage bovin (production de lait), elle est surtout concentrée sur sa partie amont. La surface agricole représente plus de 80 % de l'occupation du sol (Figure 18), constitué majoritairement de prairies pour l'élevage et de cultures (céréales et maïs).

5.3 Problématique

En 2002, suite à un diagnostic mené à l'échelle régionale, une pollution en produits phytosanitaires des eaux superficielles du bassin-versant de la Coise a été mise en évidence. La Cellule Régionale d'Observation et de Prévention des Pollutions par les Pesticides (CROPPP) a alors décidé de classer le bassin-versant de la Coise en zone d'action très prioritaire.

De 2007 à 2014, le Syndicat Interdépartemental Mixte pour l'Aménagement de la Coise (SIMA Coise) a effectué des prélèvements d'eau brute dans le but de suivre les concentrations de

pesticides. Les prélèvements étaient réalisés mensuellement juste après un épisode pluvieux (au moins 10 mm de précipitations) sur 22 stations réparties sur la Coise et ses principaux affluents.

Deux périodes de contamination majeures ont été identifiées : en été (maïs) et durant la période automne/hiver (désherbants et blé). Les principales molécules retrouvées de 2007 à 2014 et étant les plus problématiques sur le bassin sont le triclopyr (désherbant), le glyphosate et sa première molécule de dégradation l'AMPA (herbicide total foliaire), le 2,4 D, le diuron, le 2,4 MCPA (herbicides sélectifs des graminées), l'isoproturon (herbicide céréales), le s-métolachlore, l'atrazine et ses métabolites (herbicides maïs).

Intérêt des acteurs de terrain pour les outils intégratifs sur ce site :

L'objectif de mise en œuvre des outils avec le SIMA Coise sur ce site était de permettre une comparaison avec les résultats obtenus en 2014 (précédente action) tout en évaluant l'apport de paramètres biologiques supplémentaires. Une station (Gimond) avec une problématique de production d'eau potable a été ajoutée afin d'évaluer l'apport des outils testés pour consolider le diagnostic existant vis-à-vis des substances phytosanitaires.

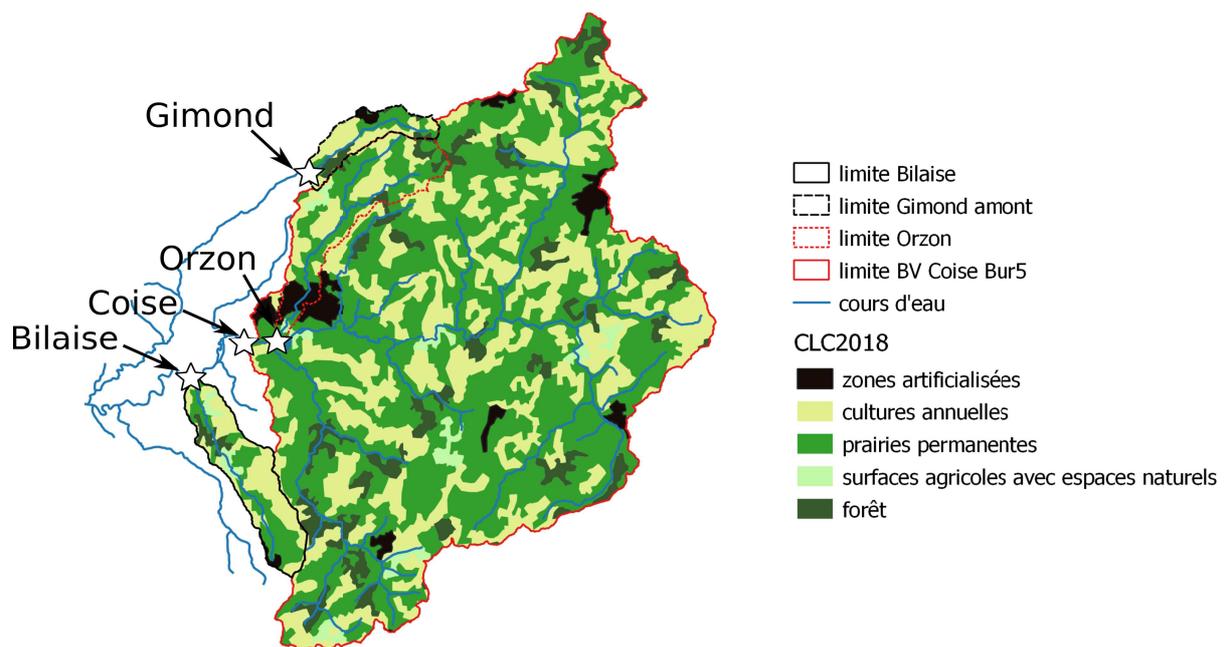


Figure 19 - Bassin-versant de la Coise - Stations de suivi

5.4 Choix des stations d'étude

Lors du premier projet Ecophyto (2014-2015), le choix des stations d'application avait été réalisé en concertation avec le SIMA Coise en se basant sur le bilan des suivis ponctuels de

pesticides réalisés depuis 2007. La partie amont du bassin avait été privilégiée car plus sujette aux transferts de surface (substrat granitique), et donc avec des niveaux de contamination plus importants que sur la partie aval du bassin.

Au regard des contraintes opérationnelles inhérentes au déploiement des outils, 4 stations (Figure 19) ont été sélectionnées :

- **L'Orzon** (station à l'exutoire du sous-bassin) est une station régulièrement contaminée (parmi les 5 plus contaminées en terme de somme des concentrations toutes substances confondues sur la période 2007-2014). Elle présente une agriculture relativement intensive sur son plateau amont. (Coordonnées N 45° 37' 23,6'' ; E 4° 26' 40,0''). A noter qu'elle reçoit également les rejets de la station d'épuration de St-Symphorien-sur-Coise (environ 1 km en amont),
- **Le Bilaise** se révèle en revanche comme la station la moins contaminée, et peut servir de station de référence. (Coordonnées N 45° 36' 52,3'' ; E 4° 24' 48,4''),
- Une station sur **la Coise** a été choisie pour répondre aux objectifs de changement d'échelle. La station sélectionnée apparaît comme le point le plus contaminée sur la Coise. Ce point de suivi draine pour l'essentiel des bassins à dominante agricole, bien qu'il existe des villages répartis en amont (Coordonnées N 45° 37' 23,3'' ; E 4° 25' 57,4''),
- La station de **la Gimond** se situe en amont du barrage de la Gimond. Ce barrage permet une retenue d'eau (plan d'eau) dans lequel est prélevé de l'eau en vue de la consommation de plusieurs villages des alentours. Il s'agit donc d'une station avec un enjeu « captage en eau superficielle ». Le territoire est soumis à une forte pression agricole, et le captage a une forte problématique « contamination en pesticides ». Dans ce cadre, le syndicat local (syndicat mixte du Bonson) va engager dans les années futures des travaux permettant l'atténuation des transferts de pesticides vers la rivière de la Gimond (ex : bandes enherbées, talus, haies). Les déploiements des indicateurs sur cette station permettra donc de réaliser un état initial de la rivière, avant la mise en place des actions (Coordonnées N 45°39'56,5'' ; E 4°27'10,2'').

5.5 Paramètres généraux

Hydrométrie, Pluviométrie

La Figure 20 présente les débits de la Coise et la pluviométrie mesurée sur le site respectivement en mai - juin 2018. Les débits sont mesurés sur la station de Saint-Médard en Forez (DREAL Rhône-Alpes, station K0673310 à 4,8 km en aval de la station située sur la Coise). Un épisode de crue intervient au cours de la période de déploiement des outils, avec les débits les plus importants entre le 8 et le 11 Juin.

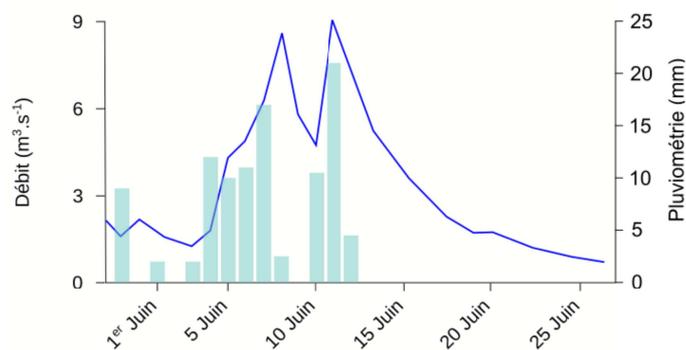


Figure 20 - Débits (courbe) de la Coise (DREAL Rhône-Alpes, station K0673310) et précipitations à la station Météo France de Saint Symphorien sur Coise (histogramme) lors du déploiement des indicateurs.

Paramètres majeurs

La Figure 21 présente quelques paramètres physico-chimiques mesurés sur les stations du site de la Coise. Il apparaît que les cours d'eau sont relativement homogènes en termes de vitesse du courant (à noter la forte variabilité liée à la crue), concentration en nutriments, en ions calcium ainsi qu'en conductivité. Les concentrations en nutriments relativement élevées (nitrates) révèlent une qualité chimique moyenne de l'eau selon le système d'évaluation de la qualité de l'eau par altération (SEQ-Eau). Les températures sont similaires d'un cours d'eau à l'autre, avec la Gimond plus froide d'environ 1 °C que les autres stations.

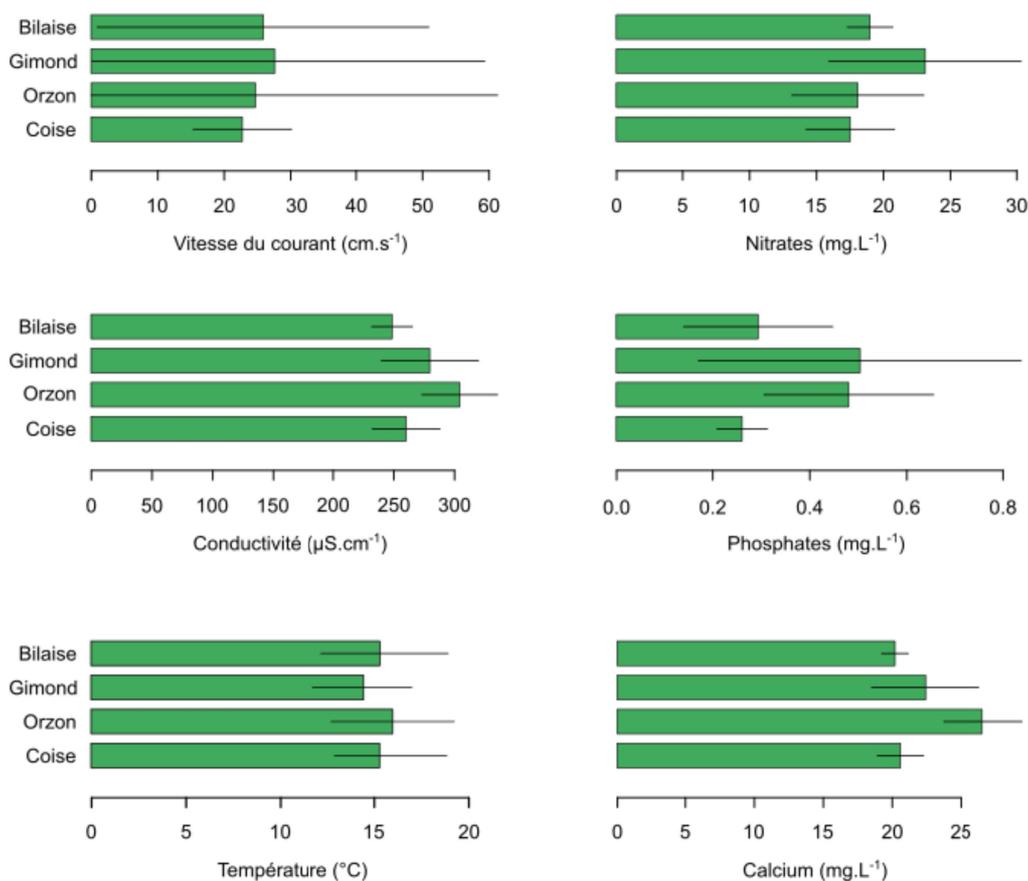


Figure 21 - Valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques mesurés sur le bassin-versant de la Coise ($n=5$ pour les mesures terrain, $n = 3$ pour les ions majeurs) en Juin 2018. Les barres d'erreur représentent les écart-types, sauf pour la température (amplitude de variation).

Métaux

La Figure 22 présente les concentrations en métaux dissous dans l'eau des cours d'eau de la Coise. Le cours d'eau du Bilaise présente des concentrations métalliques globalement plus faible que les autres stations, en particulier pour le zinc, le plomb et le fer. Les autres stations et éléments métalliques mesurés présentent des variations moindres, avec néanmoins une concentration en zinc sensiblement moins importante sur la station Bilaise que sur les autres stations du site. Les fortes variabilités intra-stationnelles sont liées à une concentration systématiquement plus faible lors de la dernière date de prélèvement, alors que le débit des cours d'eau se stabilise à un niveau beaucoup plus bas qu'aux autres dates de prélèvement.

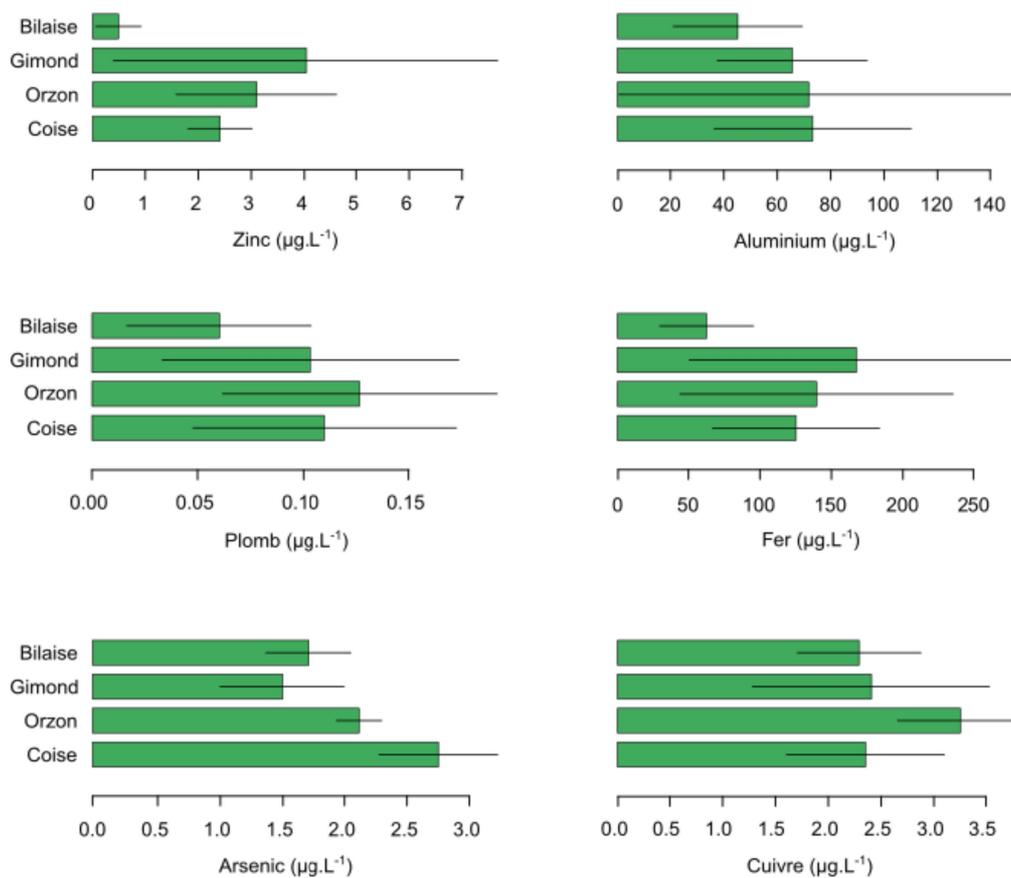


Figure 22 - Valeurs moyennes des concentrations en métaux dissous mesurées sur le bassin-versant de la Coise ($n = 3$) en Juin 2018. Les barres d'erreur représentent les écart-types.

III. PRÉSENTATION DES OUTILS ET DES MODALITÉS DE LEUR MISE EN ŒUVRE SUR CHAQUE SITE

1. Échantillonneurs intégratifs passifs : échantillonnage « au fil de l'eau » de molécules spécifiques dans le milieu

L'échantillonnage passif consiste à introduire dans le milieu aquatique un dispositif contenant une phase réceptrice, protégée ou non par une membrane. Les molécules en présence dans l'eau et présentant une affinité suffisante pour le matériau utilisé diffusent, à travers une couche limite d'eau et à travers une membrane lorsqu'elle est présente, et s'accumulent sur la phase réceptrice selon leur affinité pour cette dernière (Grenier et al., 2014). Seules les substances en phase aqueuse (fraction dissoute) sont piégées par ces systèmes. Les échanges entre l'eau et l'échantillonneur peuvent être décrits par un modèle cinétique (Mazzella et al., 2011). Une étape de calibration réalisée préalablement en laboratoire permet de déterminer pour chaque molécule des constantes cinétiques (taux d'échantillonnage R_s , constante d'équilibre K_{sw}). Ces données de calibration servent à retranscrire la quantité de pesticides accumulée sur la phase réceptrice en une concentration dans le milieu (Martin et al., 2018).

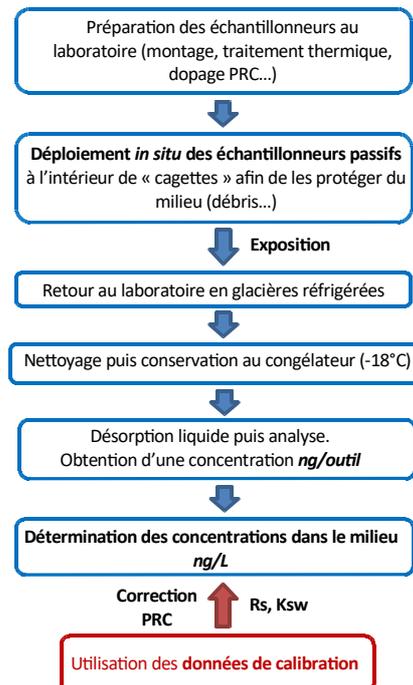


Figure 23 - De la préparation des échantillonneurs passifs à la détermination des concentrations dans l'eau.

Les échantillonneurs passifs permettent un échantillonnage en continu sur leur durée d'immersion dans le milieu récepteur, et permettent ainsi d'obtenir une concentration plus intégrée dans le temps qu'un simple échantillonnage ponctuel, améliorant ainsi la représentativité de la mesure. La Figure 23 présente le synoptique de la méthode employée pour le déploiement *in situ* des échantillonneurs, de leur préparation à la détermination des concentrations dans l'eau (Le Dréau et al., 2018).

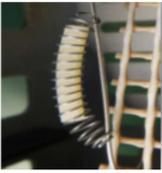
Parallèlement au déploiement *in situ* des échantillonneurs, des blancs « terrain » sont réalisés afin de détecter d'éventuelles contaminations des échantillonneurs liées au transport et/ou à leur manipulation sur le terrain ou au laboratoire : des échantillonneurs sont ainsi préparés puis transportés dans les mêmes conditions que les échantillonneurs *in situ*, mais non exposés sur le terrain.

Les pesticides représentent une large gamme de substances aux propriétés variées (ex : polarité, famille chimique). Pour pouvoir échantillonner un maximum de molécules, différents types d'échantillonneurs complémentaires ont été utilisés (Tableau 2):

- La Tige Silicone Polaire (TSP) a la propriété d'accumuler des composés hydrophobes et hydrophiles. En l'absence de membrane, l'accumulation des molécules y est rapide permettant ainsi de capter des pics fugaces de contaminants, durant toute la durée d'immersion limitée à une semaine. 23 substances ont été analysées sur ce type d'échantillonneur.
- Le POCIS avec une phase réceptrice HLB (Hydrophilic-Lipophilic-Balanced) a la capacité d'adsorber des composés hydrophiles. Une membrane séparant la phase réceptrice du milieu régule l'accumulation des composés et la durée optimale d'exposition est de ce fait comprise entre 2 et 4 semaines (Mazzella et al., 2011). 41 substances ont été analysées sur ce type d'échantillonneur.
- Le POCIS avec une phase réceptrice HLB MAX (Mixed-mode Anion eXchange), permet de capter des pesticides anioniques ainsi que quelques métabolites (acides oxaniliques). 17 substances ont été analysées sur ce type d'échantillonneur.

Tous les types d'échantillonneurs ont été appliqués sur chaque site et chaque station. Pour un type d'échantillonneur donné, les mêmes substances ont été analysées sur chaque site et chaque station. La liste des substances analysées sur chaque type d'échantillonneur est spécifiée en annexe 4. 15 substances ont été analysées en commun sur les TSP et les POCIS.

Tableau 2 - Caractéristiques des échantillonneurs passifs déployés.

Échantillonneur	Phase réceptrice	Membrane	Dispositif	Durée d'exposition <i>in situ</i>	Molécules échantillonnées dans le cadre du projet	Conditions d'extraction	Techniques d'analyse	Références
TSP (Tige Silicone Polaire) 	Matériau composite PACSIR (brevet Irstea FR 3 047 992) Mélange de PDMS (polydiméthyl siloxane) et Oasis HLB Waters (copolymère de N-vinylpyrrolidone-divinylbenzène) Tiges de 20*3*3 mm, 170 mg +/- 2,5 %	Sans membrane	Placé dans un ressort métallique (5 x 30 mm)	1 semaine	22 molécules (12 H + métab., 7 F, 3 I) de moyennement hydrophiles à hydrophobes 1,5 < logK _{ow} < 5,5	200 µL méthanol/acétonitrile 50/50 (v/v)	LC-ESI-MS/MS (chromatographie en phase liquide, ionisation électrospray spectrométrie de masse en tandem)	Margoum et al. (2013) Martin et al. (2016)
POCIS 	Waters Oasis HLB (N-vinylpyrrolidone + divinylbenzène) 200 mg, Ø 60 µm	Polyéther sulfone (Ø de pore 0,1 µm)	Système maintenu par 2 anneaux plats (inox, 5,1 cm de Ø interne)	De 2 à 4 semaines	41 molécules (26 H, 8 F, 7 I), majoritairement hydrophiles 0,09 < logK _{ow} < 4,14	3 mL méthanol + 3 mL méthanol/acétate d'éthyle 75/25 (v/v)	en phase liquide, ionisation électrospray spectrométrie de masse en tandem)	Lissalde et al. (2014)
POCIS MAX 	Waters Oasis MAX (N-vinylpyrrolidone + divinylbenzène + greffages ammonium quaternaire) 200 mg, Ø 60 µm	Polyéther sulfone (Ø de pore 0,1 µm)	Système maintenu par 2 anneaux plats (inox, 5,1 cm de Ø interne)	2 semaines	17 molécules (H et métabolites acides) hydrophiles -1,87 < logK _{ow} < 3,80	5 mL méthanol 50/50 (v/v) + 5 mL méthanol/acide formique 90/10 (v/v)		Fauvelle et Mazzella (2013)

2. Les communautés microbiennes naturelles permettent de cibler des molécules spécifiques

2.1 Étude de la tolérance des communautés microbiennes autochtones (biofilms phototrophes) aux produits phytosanitaires (approche PICT)

Dans les petits cours d'eau, les communautés microbiennes sont principalement formées d'assemblages complexes de micro-organismes présentant un mode de vie benthique suite à la colonisation de supports immergés. Sur des supports inertes (tels que des pierres, cailloux), ces assemblages, qui sont dénommés biofilms périphtiques ou périphton, sont généralement dominés par des micro-organismes phototrophes (algues et cyanobactéries) qui se développent en présence de lumière. En milieu lotique, l'importance relative de ces biofilms est grande et ils assurent un rôle fonctionnel majeur pour l'écosystème. En outre, ils interagissent précocement avec les substances dissoutes présentes dans la colonne d'eau, notamment avec les pesticides, et présentent une forte capacité à répondre rapidement à des changements environnementaux et à s'y adapter, de manière transitoire ou irréversible (Pesce et al., 2008). L'exposition chronique des biofilms microbiens aux pesticides peut notamment entraîner une sélection des espèces les plus résistantes et/ou des phénomènes d'adaptation génétique ou physiologique, engendrant ainsi l'acquisition et le développement de capacités de tolérance, conformément au concept « PICT » (« Pollution Induced Community Tolerance »). L'approche PICT, qui vise à mesurer et comparer le niveau de sensibilité de communautés microbiennes naturelles à un (ou des) toxique(s) donné(s), renseigne donc sur l'historique d'exposition de ces communautés à ce(s) toxique(s) dans le milieu (Tlili et al., 2016).



Figure 24 - Représentation schématique des deux étapes de mise en œuvre de l'outil PICT.

Cette approche est réalisée en collectant des biofilms naturels sur des supports inertes (lames de verre), immergés dans le cours d'eau pendant 1 mois (Figure 24). Des tests de toxicité aiguë sont ensuite réalisés au laboratoire afin de déterminer le niveau de tolérance des communautés

microbiennes à une substance « cible » (i.e. suspectée d'être présente dans le cours d'eau), *via* la mesure du niveau d'activité photosynthétique et/ou d'activités enzymatiques (ex : beta-glucosidase, estérase) en présence de concentrations croissantes de cette substance (Pesce et al., 2010). Ce niveau de tolérance comparé à celui obtenu sur le site témoin permet d'estimer s'il y a eu ou non exposition chronique à la substance cible (ou à des substances ayant un même mode d'action). Bien que ne bénéficiant pas de grilles de référence, cette approche permet une hiérarchisation comparative des sites étudiés (Tlili et al., 2016).

2.2 Potentiel génétique et fonctionnel des communautés microbiennes du sédiment pour la dégradation de pesticides

Les microorganismes possèdent un arsenal enzymatique impressionnant acquis au cours de leur évolution, leur permettant non seulement de détoxifier leur milieu intra-cellulaire mais également leur milieu extra-cellulaire pour pouvoir coloniser différentes niches écologiques. De plus, au-delà de cette versatilité enzymatique, les microorganismes possèdent naturellement une plasticité génétique leur permettant de s'adapter rapidement en réponse à différentes pressions de sélection, dont celles exercées par les xénobiotiques. Ainsi certains microorganismes, suite à des expositions répétées à des pesticides, sont capables d'acquérir les gènes codant les enzymes de dégradation qui catalysent leur minéralisation. Ces populations microbiennes dites 'adaptées à la biodégradation accélérée' peuvent diminuer la persistance des pesticides dans l'environnement. Elles supportent la fonction d'atténuation naturelle des intrants chimiques, contribuant à la fonction écosystémique de 'biofiltration'. Par conséquent, la détection du potentiel dégradant (activité microbienne) et/ou du potentiel génétique dégradant (abondance de microorganismes dégradants) des pesticides peut être considérée à la fois comme un marqueur d'exposition et comme un marqueur de résilience des milieux (Pesce et al., 2017). Les méthodes décrites ci-dessous ont été appliquées sur trois herbicides : deux urées substituées (isoproturon et diuron) et le glyphosate (Figure 25).

Mesure du potentiel dégradant des communautés microbiennes des sédiments

Le principe consiste à mesurer la transformation d'un pesticide marqué au ^{14}C en $^{14}\text{CO}_2$ par les microorganismes des sédiments. Cette mesure s'effectue selon une méthode dérivant du protocole ISO14239 standardisé par l'Agence International de Standardisation (ISO) décrite par Pesce et al. (2009).

Pour chaque échantillon analysé, 20 g de sédiments frais sont disposés dans des flacons en verre stériles et additionnés de 50 mL d'eau minérale. Le flacon en verre est placé dans un radio-respiromètre.

Dans chaque échantillon, un mélange de pesticide ^{12}C et ^{14}C est ajouté pour atteindre une concentration de 10 μg de pesticide par mL d'eau et environ 2 000 dpm de ^{14}C par mL d'eau. Les échantillons sont incubés à 20 °C et à l'obscurité. A intervalle de temps régulier, le piège à soude (dans lequel est piégé le $^{14}\text{CO}_2$ produit par les microorganismes dégradant le ^{14}C) est prélevé et remplacé par un nouveau. La quantité de radioactivité contenue dans le piège à soude est évaluée par comptage à scintillation liquide. La transformation du pesticide marqué au ^{14}C en $^{14}\text{CO}_2$ est exprimée en pourcentage de la quantité initiale apportée sur les sédiments.

Les courbes de minéralisation obtenues peuvent alors être modélisées pour déterminer des paramètres de la cinétique tels que le temps de latence (en jour), la vitesse maximale de minéralisation (en % de $^{14}\text{CO}_2$ produit par jour) et le pourcentage maximal de minéralisation (en % de $^{14}\text{CO}_2$ produit). Les mesures ont été réalisées sur 3 réplicats pour chaque échantillon et chaque pesticide.

Mesure du potentiel génétique dégradant des communautés microbiennes des sédiments

La mesure du potentiel génétique dégradant des communautés microbiennes des sédiments consiste à quantifier le nombre de séquences nucléotidiques d'un gène codant pour une enzyme de dégradation d'un pesticide par un essai de PCR quantitative mené à partir d'un extrait d'ADN présent dans les sédiments. Cette mesure de PCR quantitative s'effectue selon la norme ISO17601 standardisée par l'Agence Internationale de Standardisation (ISO) à partir d'ADN extrait directement des sédiments selon un protocole dérivant du standard ISO 11063 (Petric et al., 2011).

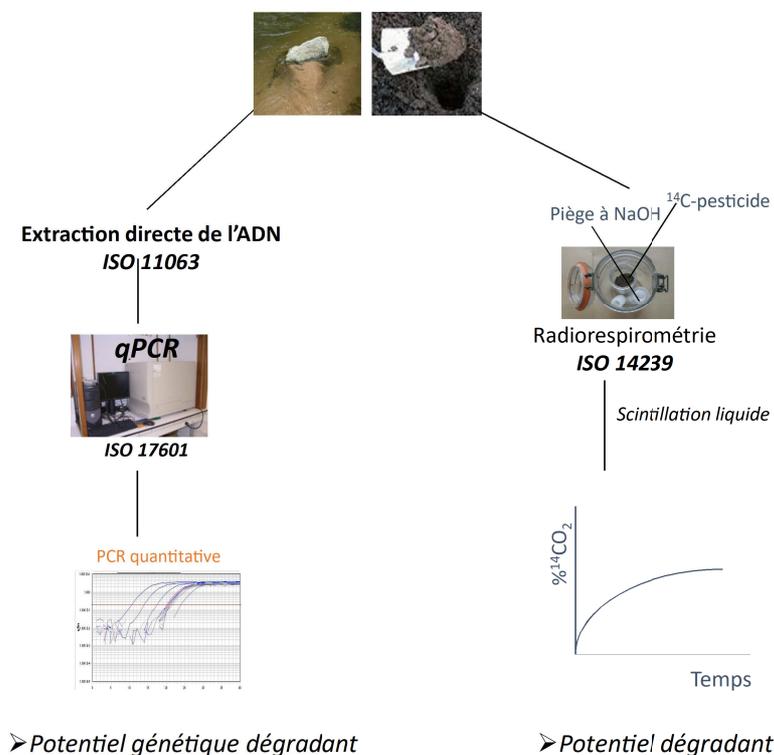


Figure 25 - Représentation schématique des deux méthodes employées pour mesurer le potentiel dégradant et le potentiel génétique dégradant des communautés microbiennes des sédiments.

Pour chaque pesticide étudié nous avons choisi de quantifier l'abondance des séquences codant pour la première enzyme dans la voie de biodégradation : *pdmA* et *pdmB* pour l'isoproturon, *puhA* et *puhB* pour le diuron et *goxA* pour la dégradation du glyphosate. En plus de ces 3 communautés dégradant ces 3 herbicides, nous avons estimé l'abondance de la communauté microbienne *tfdA*

codant pour l'enzyme impliqué dans la première étape de la minéralisation de l'herbicide hormonal 2,4-D. Les résultats sont exprimés en nombre de séquences par ng d'ADN extrait des sédiments. Pour chaque pesticide, les mesures ont été réalisées sur 5 réplicats pour chaque échantillon.

3. Le biomonitoring actif par encagement de gammares

3.1 Principe

Le biomonitoring actif consiste à encager dans le milieu d'étude des organismes d'origine contrôlée et calibrés vis-à-vis de différentes caractéristiques biologiques (sexe, taille, stade de développement), ceci durant une période d'exposition contrôlée (Besse et al., 2013). Le principe est de les utiliser comme sonde de la qualité toxique du milieu en mesurant différents paramètres biologiques (marqueurs de toxicité) suite à cette exposition. Cette approche, qui contrôle l'exposition (ex : organismes, taille et genre des organismes, durée, source de nourriture) et qui utilise une population de référence pour laquelle l'influence des facteurs environnementaux non contrôlés (ex : température, dureté) sur la réponse des marqueurs de toxicité est connue et maîtrisée, permet d'attribuer les effets observés à l'impact de contaminants lors de l'exposition.

L'organisme utilisé ici est l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*. C'est un crustacé largement distribué en Europe qui joue un rôle central dans le fonctionnement des écosystèmes (ex : source de nourriture, décomposeur) et qui est connu pour être sensible à de nombreux micropolluants. Ces particularités en font une espèce sentinelle pour étudier l'impact toxique des substances chimiques dans les milieux (Kunz et al., 2010, Chaumot et al., 2015). Les marqueurs choisis ici dans le cadre des biotests mis en place *in situ* sont l'activité acétylcholinestérase AChE (AFNOR XP T90-722-1:2020 ; Xuereb et al., 2009a), le taux d'alimentation ou « feeding rate » (AFNOR XP T90-722-3:2020 ; Coulaud et al., 2011) et la reproduction (cycle de mue, nombre d'ovocytes et d'embryons) (AFNOR XP T90-722-2:2020 ; Geffard et al., 2010, Chaumot et al., 2020, Lopes et al., 2020), venant compléter une norme 2019 sur le procédé d'encagement (AFNOR XP T90-721:2019).

D'autres marqueurs biochimiques (activités carboxylestérase CbE, glutathion-s-transférase GST, et phénoloxydase PO), en cours de développement, ont également été utilisés dans le cadre de ce projet dans une optique exploratoire pour la compréhension de la variabilité de réponse de ces biomarqueurs. De même, une méthode innovante en protéomique par spectrométrie de masse récemment développée chez le gammare (Gouveia et al., 2017) a été complétée et testée dans cette étude pour permettre la mesure multiplexée directe et spécifique de plus d'une centaine de marqueurs protéiques potentiels biomarqueurs (Faugère et al., 2020).

3.2 Méthode

Origine, maintenance, sélection et exposition des organismes

Les organismes *Gammarus fossarum* ont été prélevés au filet troubleau sur le site d'élevage du laboratoire d'écotoxicologie INRAE (cressiculture non exploitée située à Saint-Maurice-de-Rémans, Ain), tamisés et apportés au laboratoire dans des glacières. Ils ont ensuite été stabulés 2

semaines en conditions contrôlées (i.e. nourriture, température, photopériode, qualité d'eau), afin d'éliminer les individus affaiblis et garantir un même état physiologique au départ de chaque test.

Le déploiement des organismes est dépendant du type de biomarqueur étudié et est illustré dans la Figure 26.

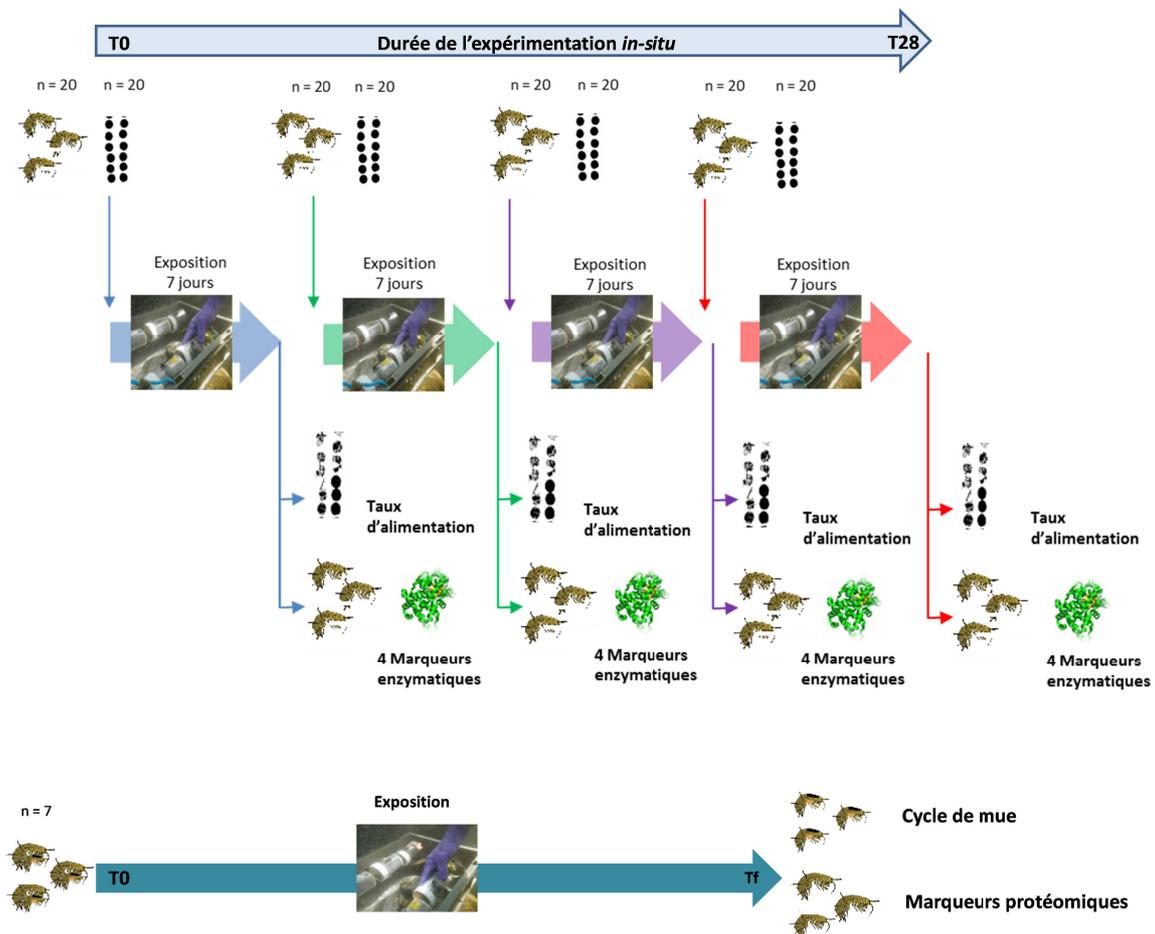


Figure 26 - Schéma expérimental des expositions et biotests réalisés à partir de *Gammarus fossarum*.

Pour les marqueurs de l'inhibition alimentaire et les biomarqueurs enzymatiques (AChE, CE, GST, PO), le déploiement a été réalisé pour chaque site et campagne d'étude sous la forme d'une séquence de 4 tests consécutifs et indépendants d'une semaine. 20 organismes mâles de taille homogène ont été placés dans 4 chambres d'exposition pendant une semaine, dans lesquelles ont été insérés 20 disques de feuilles d'aulne calibrés (*Alnus glutinosa*). Le contrôle des conditions d'exposition (durée d'exposition, accès à la ressource alimentaire) et de certains facteurs biotiques (origine de la population exposée, genre, taille) permet la reproductibilité des biotests.

En parallèle, pour déterminer les paramètres de reproduction, l'encagement de couples en début de cycle reproducteur au démarrage de l'exposition a été réalisé sur une période de 3 semaines à 1 mois, selon la température et en fonction d'un modèle mathématique permettant de prédire la durée

d'exposition autorisant le déroulement des 3/4 du cycle de reproduction (stade de mue C2/D1) en condition référence (Lopes et al., 2020). Quatre réplicats de 7 couples de gammares ont été utilisés. Les paramètres de reproduction sont lus sur les femelles vivantes. Les mâles ont été congelés individuellement puis stockés à -80 °C pour les mesures protéomiques.

Marqueurs étudiés

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme qui joue un rôle clef dans le fonctionnement neuronal en régulant la concentration du neurotransmetteur acétylcholine au niveau des fentes synaptiques. Le mode d'action des insecticides de type organophosphorés et carbamates consiste à inhiber l'activité de l'enzyme AChE. La perturbation de l'activité AChE entraîne une accumulation d'acétylcholine et donc une sur-stimulation du système nerveux, pouvant aller jusqu'à la mort de l'organisme (Figure 27). La mesure de l'acétylcholine est effectuée selon la méthode décrite par Xuereb et al. (2009a, 2009b) et s'exprime en $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$. L'inhibition de l'activité AChE observée chez le gammare en milieu naturel peut être reliée directement à l'exposition aux insecticides type organophosphorés ou carbamates. Sa mesure permet ainsi de révéler la présence et de réaliser une évaluation quantitative de l'impact de ce type de polluants. L'inhibition de l'AChE est « dite » spécifique de ce type d'insecticides.

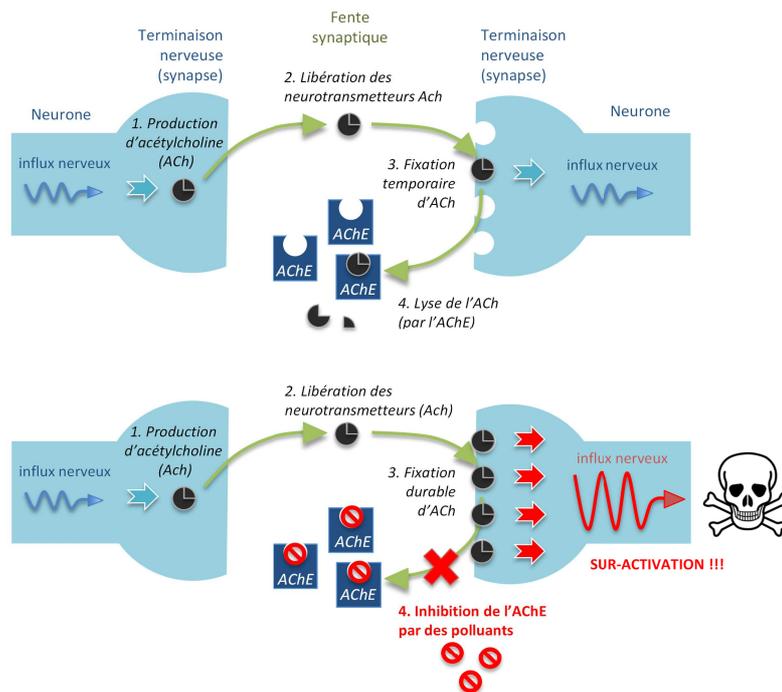


Figure 27 - Représentation schématique de l'inhibition de l'AChE.

La mesure d'activité alimentaire (Figure 28) correspond ici à une mesure de surface de feuilles consommée en une semaine. Le taux d'alimentation est obtenu par différence entre la surface initiale proposée et celle restante, en tenant compte de la dégradation naturelle par les micro-organismes présents dans le milieu testé *via* le déploiement *in situ* de systèmes témoins (i.e. sans gammares). Il s'exprime en mm^2 de feuille d'aulne consommés par gammare et par jour (Coulaud et al., 2011).

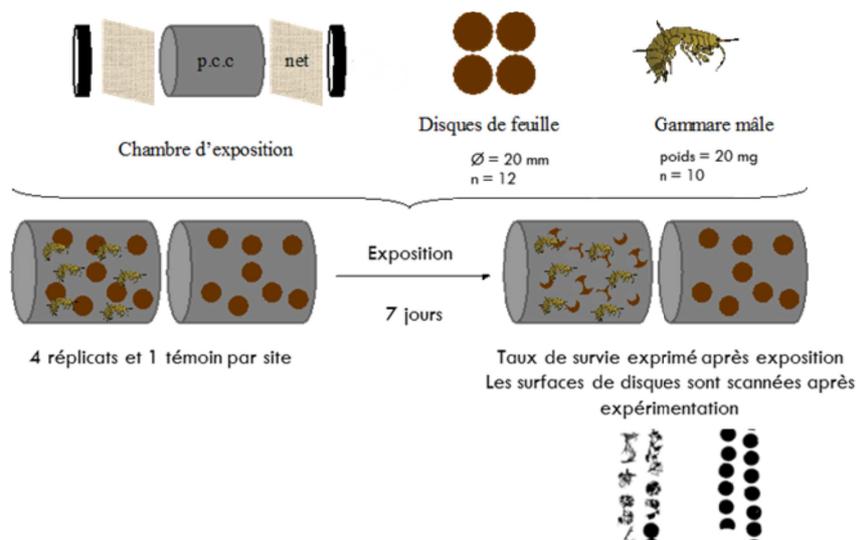


Figure 28 - Méthode utilisée pour la mesure du taux d'alimentation lors de l'expérimentation *in situ*.

L'activité alimentaire des gammarides, ici mesurée via le comportement de déchetteur du substrat végétal, est sensible aux produits phytosanitaires, mais également à d'autres types de contaminants comme les métaux lourds, les médicaments. L'inhibition de l'activité alimentaire est une réponse précoce, sensible, marqueur de toxicité globale de cocktail de contaminants rencontrés lors de l'exposition (Maltby et al., 2002 ; Coulaud et al., 2011).

Le cycle de mue du gammaride, décrit par Geffard et al. (2010), est parfaitement synchronisée avec le développement embryonnaire et la croissance des ovocytes (vitellogénèse). Il se divise en 5 stades, identifiables par observation transtégumentaire des 3^{ème} et 4^{ème} paires de périopodes (Figure 29). A chaque stade de mue correspondent une surface ovocytaire moyenne et un stade de développement embryonnaire (Figure 29).

Après avoir libéré les juvéniles du marsupium (fin de stade D2), la femelle mue et pond un lot d'ovocytes dans sa poche marsupiale, qui sont alors immédiatement fécondés par le mâle. La femelle est alors en stade de mue A et le développement embryonnaire commence dans le marsupium jusqu'à la prochaine mue (35 jours plus tard à 12 °C), en passant par 5 stades embryonnaires successifs (Figure 29). Parallèlement, un nouveau lot d'ovocytes primaires entre en maturation dans les gonades femelles. Les stades C1 et C2 correspondent aux stades d'inter-mue. Au stade C2, la vitellogénèse secondaire se met en place et une forte croissance de la surface ovocytaire moyenne est observée.

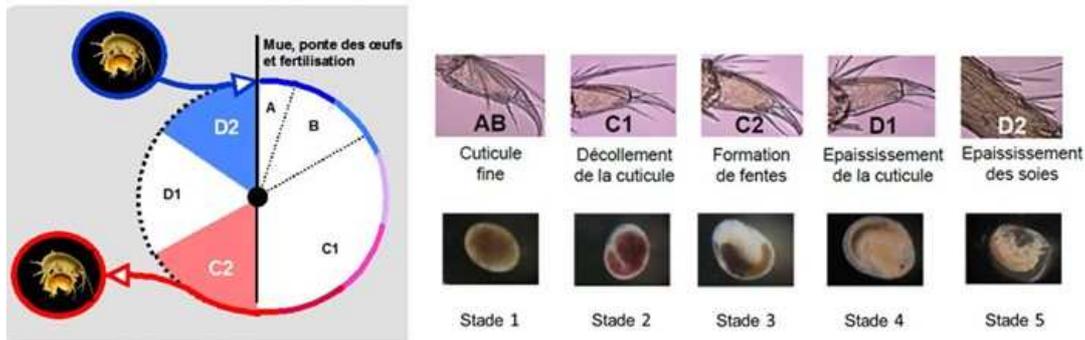


Figure 29 - Déroulement du cycle de mue, principe méthodologique du test de reproduction et critères d'identification des stades de mue et embryonnaires.

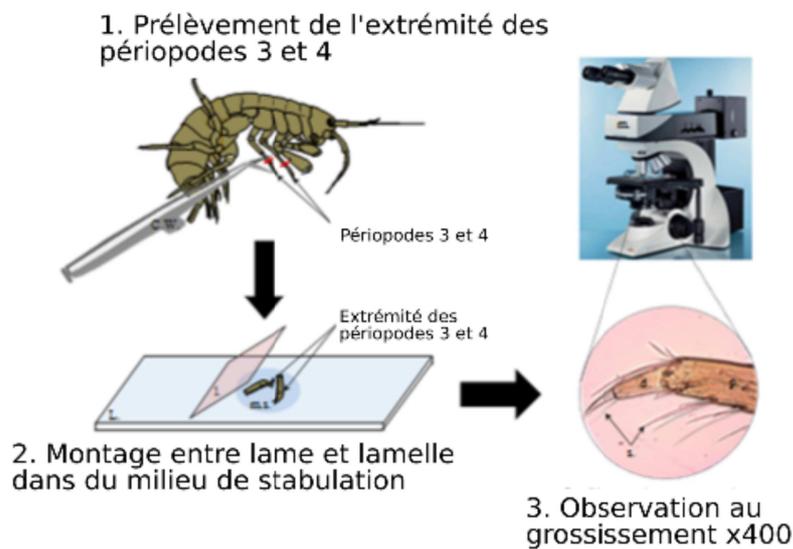


Figure 30 - Schéma de la procédure utilisée pour déterminer le stade de mue des organismes. c.w. : ciseaux de Wecker ; d. : dactilopodite ; L. : lame ; l. : lamelle ; m. : microscope ; m.s. : milieu de stabulation ; p. : protopodite ; s. : soie.

En présence de contamination chimique, le déroulement du cycle de mue peut être perturbé et un retard de la mue de l'individu adulte est observé par rapport au développement des embryons. Dans le test de reprotoxicité déployé, la durée du test est dépendante de la température du milieu et correspond au temps nécessaire au déroulement du cycle de mue de la femelle jusqu'au stade C2, en condition non contaminée (Chaumot et al., 2020 ; Lopes et al., 2020). Après exposition, les stades de mue et embryonnaires ainsi que les nombres d'embryons et d'ovocytes sont déterminés selon la méthode décrite par Geffard et al. (2010) (Figures 30 et 31). On compare alors les niveaux enregistrés (en termes de pourcentage de femelles ayant atteint le stade C2, de nombre d'ovocytes et de nombre d'embryons par femelle corrigés par la taille) à des valeurs de référence. Par ailleurs, le retard de stade de mue (décalage observé entre la mue de la femelle et le développement des

embryons dans son marsupium) est une réponse spécifique d'une perturbation endocrinienne chez ce crustacé, ce qui correspond notamment à l'action possible de certains phytosanitaires.

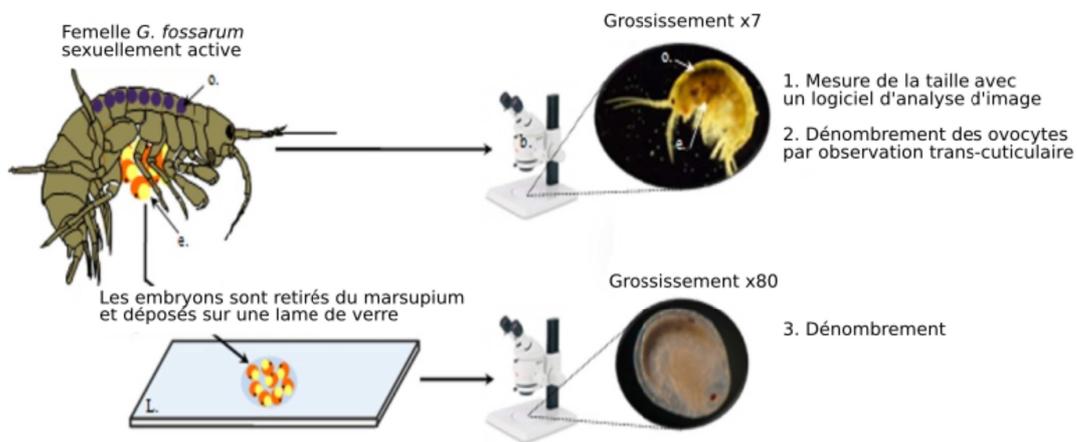


Figure 31 - Schéma de la démarche utilisée pour mesurer les paramètres biologiques de reproduction. b. : loupe binoculaire ; e. : embryons contenus dans la poche incubatrice ; L. : lame ; m. : microscope ; o. : ovocytes secondaires visibles au travers de la cuticule. Adapté de Xuereb (2009a).

Les résultats des marqueurs (niveaux d'activité acétylcholinestérase, d'activité alimentaire, des marqueurs de mue et reproduction), sont comparés à des valeurs de référence, correspondant aux niveaux attendus en l'absence d'impact toxique. Ces valeurs de référence ont été obtenues suite aux travaux réalisés par le laboratoire d'écotoxicologie de Lyon, à l'aide d'expositions à grande échelle, d'expérimentations au laboratoire et de travaux de modélisation intégrant la variabilité environnementale naturelle et l'impact de facteurs de confusion tels que la taille, le poids, la température, la dureté et la saison (Coulaud et al., 2011 ; Xuereb et al., 2009a ; Geffard et al., 2010, Chaumot et al., 2020, Lopes et al., 2020).

La comparaison des résultats aux valeurs de référence permet une interprétation des valeurs obtenues en offrant la possibilité de comparer les valeurs entre elles, aussi bien d'un point de vue temporel que spatial, tout en s'affranchissant de la nécessité d'une référence locale (Coulaud et al., 2011, Lopes et al., 2020).

Autres marqueurs en cours de développement appliqués lors du projet

Trois autres marqueurs biochimiques enzymatiques ont été mesurés sur les organismes exposés dans les 4 tests d'une semaine, à partir de 5 replicats de 5 gammares. Il s'agit des activités carboxylestérase CbE, glutathion-s-transférase GST et phénoloxydase PO. Les travaux menés aujourd'hui sur ces biomarqueurs au laboratoire d'écotoxicologie d'INRAE visent l'acquisition de données à large échelle. La compréhension des interactions avec les facteurs de confusion pour définir des valeurs de référence et interpréter les altérations des activités comme des effets toxiques est prévue prochainement.

La carboxylesterase (CbE) appartient à une famille d'enzymes qui dégrade les groupements ester en alcool puis en acide. Elle intervient, de ce fait, dans la métabolisation des trois grands groupes d'insecticides ; carbamates, organophosphorés et pyréthrinoides de synthèse. Cette particularité lui confère un intérêt comme marqueur en bio-surveillance de l'environnement. Face à une intoxication aux pesticides, le pouvoir de métabolisation agit précocement comme premier rempart, afin de limiter l'apparition d'une inhibition de l'acétylcholinestérase AChE. La méthode de mesure de l'activité est adaptée de Ljungquist et al. (1971). Elle s'exprime en $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de masse fraîche.

La glutathion-s-transférase (GST) est une enzyme non spécifique de conjugaison qui joue un rôle dans le processus de détoxification des xénobiotiques hydrophobes (HAP, pesticides, PCB). L'implication du glutathion relie aussi ce marqueur aux paramètres descripteurs d'état de stress oxydant. Marqueur d'une exposition aux contaminants, l'activité GST est généralement induite. Néanmoins, elle peut aussi être inhibée en cas d'effet toxique prononcé de ces substances. La mesure a été réalisée ici selon une méthodologie adaptée de Pabst et al. (1974) et s'exprime également en $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de masse fraîche.

La phénoloxydase (PO) est une enzyme impliquée dans la réponse du système immunitaire chez les invertébrés. Son activité est un bon indicateur de l'immunocompétence des invertébrés (Cornet et al., 2009). Elle est révélatrice d'une activité de défense cellulaire qui conduit, par une cascade de réactions protéiques, à la synthèse de mélanine qui encapsule notamment les agents pathogènes et facilite ainsi leur élimination. L'activité de ce biomarqueur peut ainsi être induite ou inhibée chez le gammare en cas d'infestation parasitaire. En outre, sans que le mode d'action soit à ce jour expliqué, des inductions suite à l'exposition à différentes contaminations chimiques chez les insectes ont déjà été mesurées (chironome, libellule). Le protocole de mesure a été adapté de Janssens et Stoks (2014) et l'activité s'exprime en $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de masse fraîche.

Marqueurs moléculaires protéomiques – étude multi-biomarqueurs

Cette nouvelle méthodologie de dosage par spectrométrie de masse résulte des travaux de thèse de Judith Trapp (2011-2014), Duarte Gouveia (2014-2017) et Julien Faugère (2018-2021). Elle offre la possibilité de réaliser des mesures directes des teneurs en protéines, pour une trentaine de protéines sur un seul organisme et en une seule analyse (Gouveia et al., 2017). Cette nouvelle méthode extrêmement économe en temps et en matériel biologique permet ainsi de mesurer la sur- ou sous-expression de nombreuses protéines d'intérêt, impliquées dans des mécanismes physiologiques essentiels comme la reproduction, l'immunité, l'homéostasie et la détoxification. Dans le cadre de ce projet, ces développements ont été prolongés pour permettre la mesure simultanée des niveaux de 157 protéines (via le suivi de 277 peptides rapporteurs) choisies parmi différentes fonctions et explorer, sur l'une des campagnes de l'étude (AAC de Lons-le-Saunier), la modulation de leur teneur dans ce contexte de contamination par les phytosanitaires.

4. La décomposition des litières et ses communautés microbiennes

4.1 Perte de masse des litières

La décomposition de litières végétales dans les cours d'eau de tête de bassin représente un processus écosystémique majeur puisque les apports sous forme de litière constituent la principale source de carbone disponible à la base de ces réseaux trophiques (Wallace et al., 1997). Dans ces milieux, les principaux décomposeurs des litières végétales sont les invertébrés déchetiers (larves d'insectes et crustacés) et les communautés microbiennes hétérotrophes (champignons et bactéries). Ainsi, toute perturbation affectant la densité, diversité ou activité de l'un ou l'autre de ces types de décomposeurs se répercute sur le processus de décomposition. Ce dernier répond en effet de manière significative à un large panel de pressions, incluant les altérations hydromorphologiques des cours d'eau (Colas et al., 2017), la concentration en nutriments (Ferreira et al., 2015), et les contaminations par les métaux (Ferreira et al., 2016) ou les pesticides (Schäfer et al., 2007). Par exemple, plusieurs études ont déjà mis en évidence une inhibition significative de la vitesse de décomposition des litières dans des rivières soumises à une pollution diffuse découlant des activités agricoles (Rasmussen et al., 2012 ; Brosed et al., 2016), soulignant ainsi le potentiel de ce type d'approche pour évaluer l'impact des produits phytosanitaires sur la qualité écologique des cours d'eau.

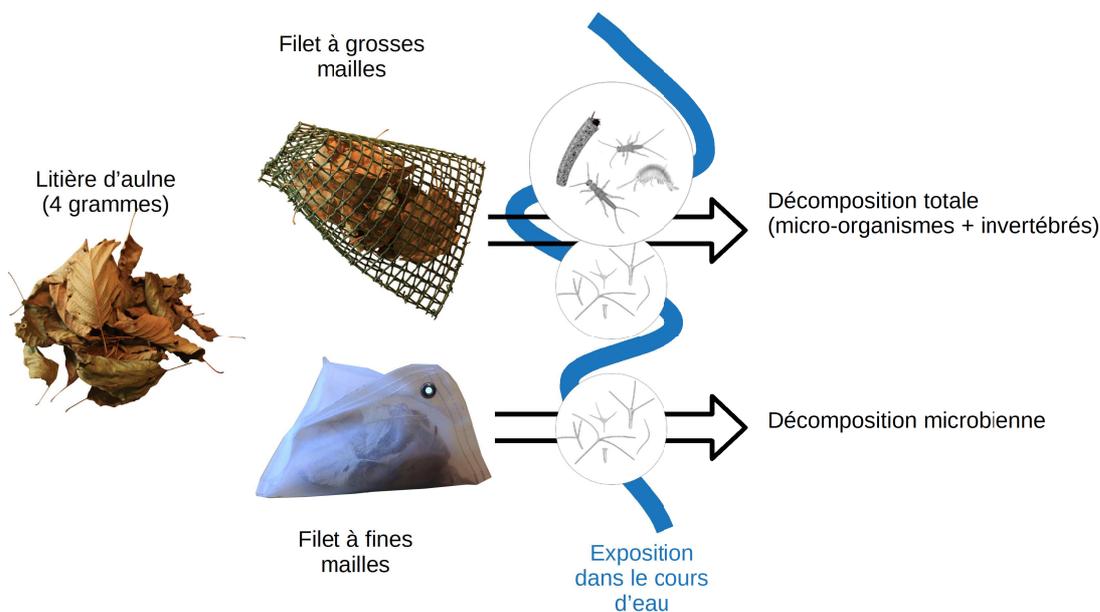


Figure 32 - Principe de la mesure des taux de décomposition par la méthode des sacs à litière.

La mesure du taux de décomposition des litières est par ailleurs très facile à mettre en œuvre et nécessite peu de moyens matériels (Bärlocher, 2005a). Le principe de la mesure présenté en Figure 32 est d'introduire une masse connue (4 g) de feuilles mortes (litières) d'aulne (*Alnus glutinosa*), récoltées à la chute automnale des feuilles, dans différents types de filets (dimensions 15 × 20 cm). Des filets à mailles fines (0,5 mm) empêchent l'accès des litières aux invertébrés et permettent de quantifier la décomposition liée à l'activité des micro-organismes. Des filets à mailles grossières

(10 mm) mesurent la décomposition totale, liée à l'action combinée des micro-organismes et des invertébrés (Figure 32). Les sacs sont ensuite exposés dans les cours d'eau et récupérés après deux intervalles de temps (14 et 28 jours). Sur chaque station sont déployés 2 (date de prélèvement) × 2 (type de maille) × 5 (répliques) = 20 sacs à litière. La masse restante de litière est déterminée par pesée (au 0,01 g près) après nettoyage et séchage des litières à 60 °C pendant 48 h. Le taux de décomposition peut alors être calculé selon une relation exponentielle entre le temps d'exposition dans le cours d'eau et la masse restante de litière.

$$M_T = M_0 \cdot e^{-kT}$$

où M_T est la masse (en g) de litière au temps T (en jours), M_0 la masse (en g) initiale, et k le taux de décomposition (en jour⁻¹) qui représente la proportion de masse de litière dégradée chaque jour. Afin de tenir compte des variations de température entre les sites et les saisons, le taux de décomposition peut être exprimé en degré-jours⁻¹. Il s'agit pour cela de remplacer le terme T par le produit entre T et la température moyenne (°C) mesurée sur le temps d'exposition. Dans un contexte idéal, les taux de décomposition sont alors comparés à une situation de référence, c'est à dire aux taux de décomposition mesurés dans une station exempte de contamination.

Avant le séchage des litières issues des sacs à fines mailles, des fragments de feuilles ont été prélevés afin de mener des analyses complémentaires portant sur les communautés microbiennes (voir ci-dessous). Les masses finales de litière ont dû être corrigées en ajoutant la masse de ces fragments pesés après chacune des analyses, sauf pour la DGGE, analyse destructive pour laquelle la masse sèche des fragments de litière a été estimée d'après leur masse fraîche.

4.2 Communautés et activités microbiennes associées aux litières

La litière sert de substrat et de ressource à un grand nombre de micro-organismes, dont certains vont participer à sa décomposition. Parmi eux, les hyphomycètes aquatiques sont un groupe polyphylétique de champignons (la plupart des ascomycètes) qui dominent généralement les communautés microbiennes associées aux litières dans les cours d'eau (Hieber et Gessner, 2002). Chez ces champignons, la reproduction est dominée par une forme asexuée assurée par la production de conidies, qui présentent des formes variées qui favorisent leur dispersion par le courant et leur capacité à adhérer à la surface des litières (Dang et al., 2007). Dans la mesure où la forme de la conidie est généralement propre à chaque espèce (Figure 33; Ingold, 1942), l'examen des conidies au microscope permet d'établir l'identité des espèces actives au sein de la communauté, tandis que la quantité de spores produites renseigne sur le niveau d'activité de ces micro-organismes.

Un autre biais par lequel ces communautés fongiques peuvent être caractérisées est le dosage de l'ergostérol. Il s'agit d'un stérol spécifique des champignons et présent notamment dans les membranes cellulaires, au même titre que le cholestérol des cellules animales. La quantité moyenne d'ergostérol par unité de biomasse fongique ayant été établie pour les hyphomycètes aquatiques (Gessner et Chauvet, 1993), il est possible d'estimer la biomasse de champignons associée aux litières en décomposition.

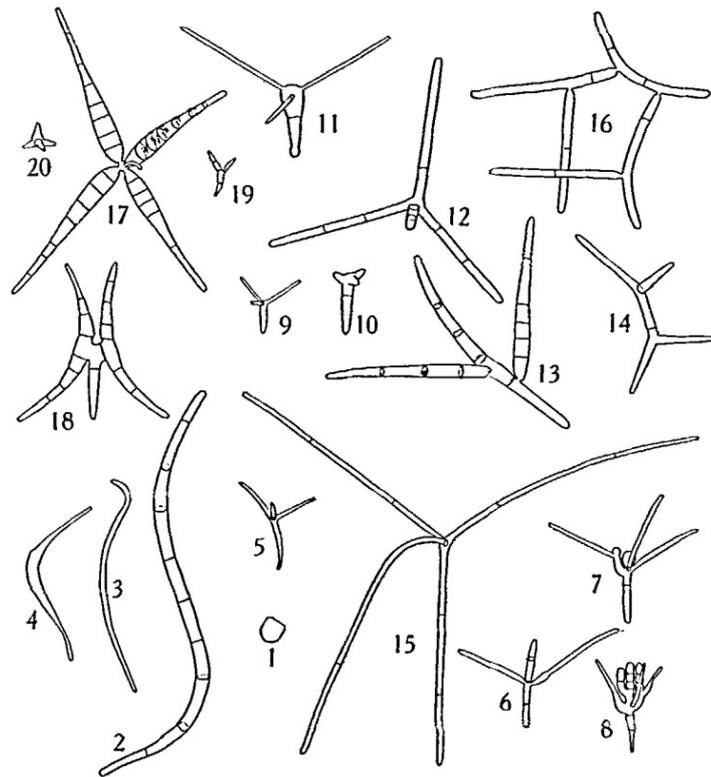


Figure 33 - Conidies de différentes espèces d'hyphomycètes aquatiques. Grossissement $\times 280$. Tiré de Ingold (1942).

De nombreuses bactéries contribuent également à la décomposition des litières. Contrairement aux hyphomycètes aquatiques, les bactéries ne produisent pas de structures identifiables au microscope et l'utilisation d'outils moléculaires est nécessaire à la caractérisation des communautés (diversité, composition des communautés). Bien que moins représentées que les champignons sur les litières des cours d'eau en termes de biomasse, leur production peut atteindre des niveaux importants (32 % de la production microbienne) en particulier lors des stades de décomposition avancée (Baldy et al., 2002). Les bactéries seraient notamment impliquées dans la dégradation de molécules relativement simples (en partie libérées par l'activité fongique) alors que les polymères complexes (lignine, cellulose) sont plus spécifiquement dégradés par les champignons (Romaní et al., 2006). Ces spécificités résultent de l'utilisation d'un complexe enzymatique différent par les champignons et les bactéries. L'analyse de l'activité de ces enzymes impliquées dans la dégradation de la matière organique végétale constitue une manière d'évaluer l'activité microbienne (incluant les enzymes bactériennes et fongiques), et de fournir des interprétations des mécanismes impliqués dans les variations de la vitesse de décomposition microbienne des litières.

Il est bien établi que les conditions environnementales peuvent sensiblement influencer la composition, la diversité et/ou l'activité des communautés microbiennes associées aux litières. Un grand nombre d'altérations d'origine anthropique (acidification, pollution domestique ou métallique) entraînent des altérations significatives dans l'activité (production de conidies) ou la

composition et la diversité de ces communautés (Pascoal et al., 2005 ; Duarte et al., 2007 ; Baudoin et al., 2008). Par ailleurs, il a été montré que l'effet de fongicides (qui visent spécifiquement à inhiber les activités fongiques) sur les communautés d'hyphomycètes aquatiques se répercutait sur la qualité nutritionnelle des litières pour le gammare (un détritivore important des cours d'eau tempérés, cf. ci-dessus) (Bundschuh et al., 2011). Du fait de leur sensibilité à de nombreuses pressions et de leur position clé dans le fonctionnement de l'écosystème, il a été suggéré que les hyphomycètes aquatiques pourraient constituer des bio-indicateurs pertinents de l'état écologique des cours d'eau (Solé et al., 2008)

Taux de sporulation et communautés fongiques

Les fragments de feuille ont été placés sous agitation dans 20 mL d'eau déminéralisée à 10 °C pendant 48 h. La suspension résultante a ensuite été fixée au formol pour une concentration finale de 2 %. Un aliquot de chaque échantillon est ensuite filtré sur une membrane de nitrocellulose (porosité 5 µm) et colorée au bleu Trypan. Les conidies sont alors dénombrées et identifiées au microscope à $\times 200$ à l'aide d'une clé d'identification (Gulis et al., 2005). Le matériel foliaire est quant à lui séché et pesé. Un taux de sporulation (nombre de conidies produites par unité de masse foliaire et de temps) peut alors être calculé et la richesse taxonomique de ces champignons peut être mesurée (Bärlocher, 2005b).

Biomasse fongique

La biomasse fongique est déterminée d'après des fragments de litière conservés au congélateur (-20 °C). Les échantillons sont alors lyophilisés et pesés. La concentration en ergostérol est mesurée par HPLC après traitement des échantillons (extraction dans le méthanol-KOH, saponification et élution) (Gessner, 2005). La biomasse fongique peut alors être estimée connaissant la teneur moyenne en ergostérol de la biomasse des hyphomycètes aquatiques (5,5 mg d'ergostérol par g de mycelium) (Gessner et Chauvet, 1993). Elle est alors exprimée en mg par g de litière.

Activités enzymatiques

L'activité potentielle de trois enzymes hydrolytiques (β -D-Glucosidase, EC 3.2.1.21 ; β -D-xylosidase, EC 3.2.1.37 ; Cellobiohydrolase EC 3.2.1.91) et deux enzymes oxydatives (Phenol oxidase, EC 1.14.18.1 ; Laccase, EC 1.10.3.2) impliquées dans la dégradation des composés carbonés présents dans les litières de feuilles (cellulose, hémicellulose et lignine) a été analysée séparément sur des fragments de feuille prélevés sur les litières provenant des sacs à fines mailles pour l'ensemble des sites et saisons. Les activités β -glucosidase, β -xylosidase, et cellobiohydrolase ont été respectivement mesurées avec des substrats fluorescents methylumbelliferyl (MUF) tandis que les activités phenol-oxidase et laccase ont été mesurées avec les substrats 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA) et 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). Les incubations des fragments de feuille en présence des substrats enzymatiques ont été réalisées pendant 1 h à 20 °C sous agitation, dans le noir et en conditions de saturation par le substrat. Après incubation, les taux d'activité ont été mesurés par fluorométrie pour les substrats MUF (excitation 365 nm/ émission 455 nm) et/ou par spectrophotométrie pour les substrats L-DOPA et ABTS (460 nm), puis exprimés en g de litière et par heure.

Structure des communautés bactériennes

L'analyse moléculaire des communautés bactériennes associées aux litières contenues dans les sacs à mailles fines a été réalisée par DGGE. L'analyse moléculaire des communautés fongiques a été abandonnée compte tenu de l'information déjà reportée par l'analyse des communautés des hyphomycètes aquatiques sur les litières. Pour les bactéries, le matériel foliaire a été conservé à -80 °C avant extraction de l'ADN. L'ADN a été extrait en utilisant le kit FastDNA SPIN kit for soil (MP Biomedicals, CA). L'ADN bactérien a ensuite été amplifié par PCR avec les amorces GC-968F/1401R suivant les conditions décrites dans Crouzet et al. (2010). Après adjonction d'un agent intercalant fluorescent, les fragments d'ADN ainsi obtenus sont déposés sur un gel à gradient dénaturant d'urée et séparés par électrophorèse (selon leur taille et composition en nucléotides). A la révélation sous UVs, le nombre de bandes (Unités Taxonomiques Opérationnelles, OTUs) est considéré comme un indicateur de la richesse spécifique. De même, le profil d'OTUs est considéré comme un indicateur de la structure de la communauté bactérienne.

5. Une alternative aux litières naturelles : la décomposition de substrats artificiels

5.1 Perte de résistance des bandes de coton

Si la mise en œuvre de la méthode des sacs de litière est simple, son application à large échelle comme indicateur fonctionnel de « décomposition de la matière organique » présente quelques limites :

- L'effet de la qualité physico-chimique des litières influence les taux de décomposition. Ainsi, afin de comparer spatialement et temporellement des taux de décomposition, il est impératif de disposer d'un lot de litières le plus homogène possible (provenant de la même espèce et si possible d'un même site).
- La récolte et le séchage des litières peuvent s'avérer fastidieux si les quantités de litière requises sont conséquentes.

Le recours à un substrat manufacturé (homogène et facile à se procurer) pourrait permettre une mesure standardisée de la dégradation de la matière organique (Colas et al., 2019). Au cours de ce projet, nous avons utilisé un tissu en coton (sous forme de bandes rectangulaires de 8 × 2,5 cm) (Figure 34). D'origine végétale, la fibre de coton est constituée principalement de cellulose, un composé largement représenté dans les parois des cellules végétales (environ 10 à 30 % de la masse des litières). Elle est donc supposée être dégradée par les communautés microbiennes aquatiques autochtones au même titre que de la litière végétale. La dégradation du tissu dans le cours d'eau par les organismes décomposeurs entraîne une diminution de sa résistance mécanique que l'on peut mesurer précisément à l'aide d'un testeur de force.

Dix bandes de coton sont déployées sur chaque station et récupérées à 2 dates différentes (5 réplicats par site et par date), soit après 14 et 28 jours d'exposition dans les cours d'eau. Les bandes de coton sont nettoyées à l'éthanol afin de stopper toute activité biologique, transportées au laboratoire et séchées à l'étuve à 60 °C pendant 48 h. Un test de traction, réalisé à l'aide d'un

testeur de force (Chatillon CS225 Series Digital Force Tester) permet alors de mesurer la résistance des bandes de coton au déchirement, qui reflète son état de dégradation (Tiegs et al., 2007). Les valeurs obtenues sont comparées à une valeur initiale déterminée sur un lot de bandes de coton non exposées, mais nettoyées à l'éthanol et séchées de la même manière que les bandes de coton exposées.



Figure 34 - Bandes de coton déployées dans un cours d'eau.

5.2 Décomposition des tablettes

Cet outil est inspiré du suivi de la décomposition des litières, en utilisant des substrats artificiels afin de faciliter sa standardisation et son transfert opérationnel. Son utilisation dans les sédiments a été récemment validée lors d'une expérience en microcosmes (Pesce et al., 2020). Dans le cadre du projet, nous l'avons utilisé dans la colonne d'eau et dans les sédiments afin d'évaluer le potentiel de cet outil pour appréhender l'impact fonctionnel des pesticides sur les activités de décomposition de matière organique par les communautés microbiennes présentes dans ces deux compartiments.



Figure 35 - Substrats artificiels pour mesurer la décomposition microbienne.

Les substrats utilisés, qui se présentent sous forme de tablettes, ont été développés par l'équipe Ecotoxicologie Microbienne Aquatique de l'UR Riverly (INRAE), en s'inspirant de deux outils

existants mais peu adaptés au suivi de la décomposition microbienne, à savoir (i) l'approche Bait Lamina (Kratz, 1998 ; Törne, 1990) mise en œuvre pour évaluer la qualité des sols (ISO 18311, 2016) et (ii) l'approche DECOTAB proposée initialement par (Kampfraath et al., 2012).

Comme les DECOTABs, ces substrats artificiels sont constituées d'un mélange d'agar, d'eau déminéralisée et de cellulose auquel nous avons ajouté du charbon actif et du son de blé (en nous inspirant des appâts de type « bait-lamina » ; ISO 18311, 2016). La pertinence de ce type d'outil pour évaluer l'impact fonctionnel des contaminants sur les communautés microbiennes du sédiment de surface a été préalablement testée et confirmée dans une approche en canaux artificiels de laboratoire et un contexte de contamination au cuivre (Pesce et al., 2020). Cependant, comme cela a été mentionné concernant la décomposition des litières, les processus de décomposition microbienne dans le milieu naturel sont conditionnés par de nombreux facteurs environnementaux et l'approche mise en œuvre doit être vue comme un outil pouvant renseigner sur l'état fonctionnel des cours d'eau dans un contexte de pollution par les pesticides. Un des objectifs du projet était notamment de comparer les résultats obtenus avec les différentes approches déployées pour évaluer l'impact des pesticides sur les processus de décomposition dans la colonne d'eau (i.e. litières, bandes de coton et tablettes). D'autre part, les substrats artificiels présentent l'avantage de pouvoir être facilement enfouis dans le sédiment, offrant ainsi des perspectives intéressantes pour développer un indicateur des impacts fonctionnels des pesticides dans ce compartiment.

Dans le présent projet, les substrats artificiels (3 lots de 5 par station de prélèvement et par compartiment) ont été placés dans des sacs à maille fine (0,25 mm) ou à maille plus large (5 mm) (Figure 35) et immergés dans l'eau ou enfouis dans le sédiment de surface (3 premiers cm) durant toute la durée de chacun des suivis (environ 1 mois). Le suivi de la décomposition des substrats par les communautés microbiennes naturelles est réalisé en mesurant la perte de masse à l'intérieur des sacs. A partir de cette perte de masse est calculé un coefficient de dégradation s'exprimant par degré-jour (kd) afin de prendre en compte l'influence de la température et de faciliter la comparaison avec les autres outils estimant la décomposition microbienne.

6. Communautés et traits fonctionnels des invertébrés benthiques : I₂M₂ et Outil de Diagnostic Invertébrés (ODI)

L'Indice Invertébrés Multi-Métrique (I₂M₂) est un indice biocénotique normalisé basé sur les peuplements de macro-invertébrés benthiques dans le cours d'eau. C'est l'outil réglementaire DCE pour le suivi de la qualité biologique des cours d'eau pour le compartiment « invertébrés ». Ces communautés constituent de très bons bio-indicateurs permettant une mesure intégrée de la qualité des cours d'eau. Les invertébrés benthiques sont en effet à la fois abondants et faciles à collecter. Ils répondent à des perturbations de diverses natures (pollution chimique, perturbation hydromorphologique) et fournissent, du fait de leur longévité, un enregistrement des perturbations passées (Archambault et Dumont, 2010). Cet indice repose sur l'échantillonnage du benthos, réalisé à l'aide d'un filet standardisé (Surber) sur différents substrats du cours d'eau et dans différentes situations d'écoulement de l'eau (Figure 36). L'I₂M₂ est basé sur la technique d'échantillonnage décrite dans la norme AFNOR NF T90-333 (2016), qui repose sur 3 phases

d'échantillonnage du benthos (Figure 37). Les organismes prélevés sont alors fixés à l'éthanol, dénombrés et identifiés au genre (pour la plupart des groupes taxonomiques) (voir norme AFNOR XP T90-388 (2010)) à l'aide de clés (Nilsson, 2005 ; Tachet et al., 2010 ; Wäringier et Graf, 2011).

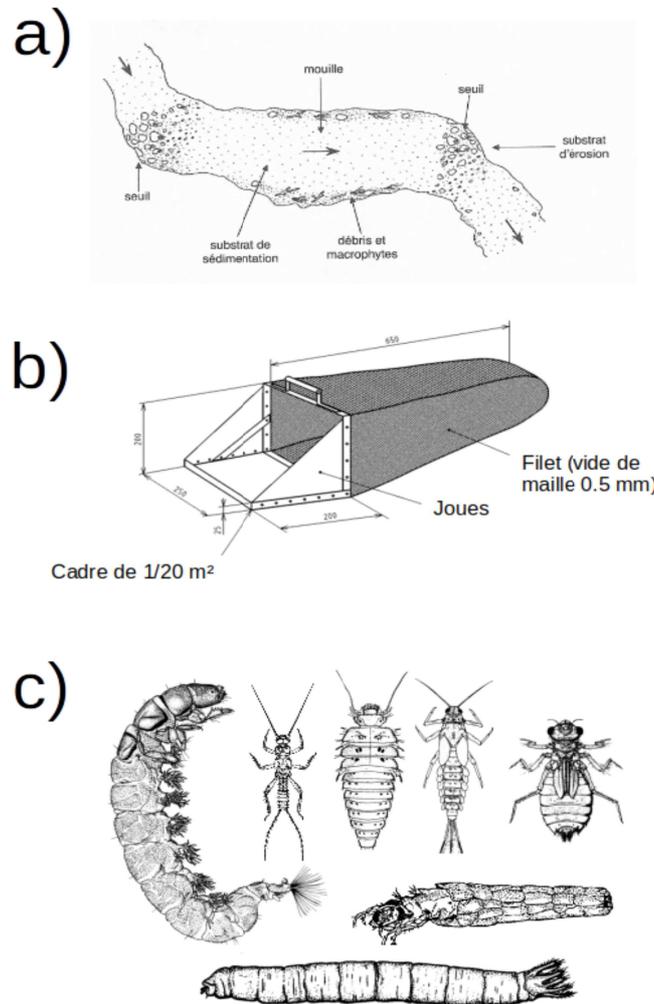
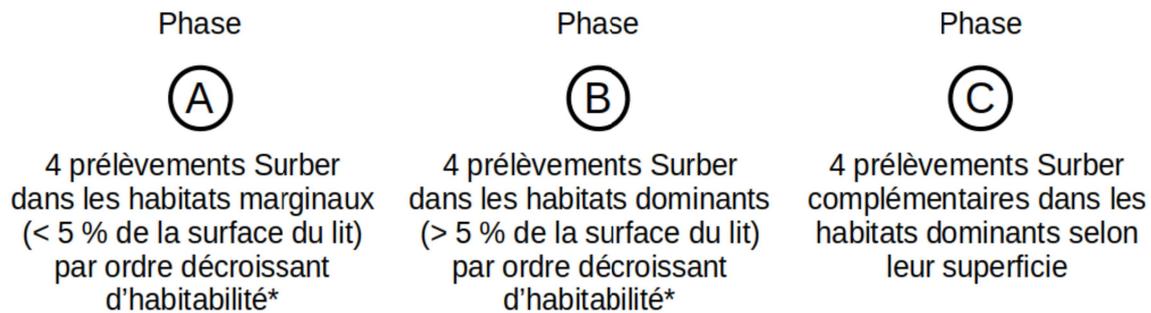


Figure 36 - a) Illustration d'un cours d'eau présentant différents habitats benthiques et faciès d'écoulement (Tachet et al., 2010), b) filet Surber (norme AFNOR XP T90-333) et c) illustration de différents insectes benthiques (Nilsson, 2005).

Le calcul de l'indice repose sur 5 métriques basées sur des caractéristiques taxonomiques ou fonctionnelles des communautés de macroinvertébrés (indice de diversité de Shannon-Weaver, valeur de l'ASPT [Average Score Per Taxon], fréquence relative des espèces polyvoltines dans l'assemblage faunistique, fréquence relative des espèces ovovivipares, richesse taxonomique totale) (Mondy et al., 2012). Au final, l'indice I₂M₂ apparaît comme beaucoup plus sensible que l'IBGN (auquel il succède comme indicateur réglementaire) aux perturbations anthropiques et présente une efficacité de discrimination des situations perturbées beaucoup plus importante.



*Ordre d'habitabilité des substrats : Bryophytes > Spermaphytes immergés > Débris organiques grossiers > supports ligneux > sédiments minéraux de grande taille > blocs > granulats grossiers > spermaphytes émergents > vase > sable et limon > algues > surfaces naturelles et artificielles

Figure 37 - Règle simplifiée de l'échantillonnage en 3 phases A, B et C pour le calcul du score I_2M_2 .

En parallèle a été développé un outil de diagnostic permettant une identification plus précise des pressions anthropiques à l'origine des altérations de la qualité écologique détectées par l' I_2M_2 (Mondy et Usseglio-Polatera, 2013). Cet outil se base sur l'analyse des modifications des traits biologiques sélectionnés et des stratégies écologiques utilisées par les communautés d'invertébrés benthiques en réponse aux caractéristiques de leur habitat. Un modèle a été construit pour 14 types de pressions liées à la qualité de l'eau (la contamination par les matières organiques et oxydables, les matières azotées hors nitrates, les nitrates, les matières phosphorées, les matières en suspension, les micro-polluants minéraux, les pesticides, les HAP ou les autres micro-polluants organiques, de même qu'un risque d'acidification) et des pressions liées à une dégradation physique de l'habitat (liées aux voies de communication dans le lit majeur, l'altération de la ripisylve, l'urbanisation dans le corridor fluvial, à un risque de colmatage ou d'instabilité hydrologique ou une rectification). Chaque modèle calcule une « probabilité d'impact significatif » de la communauté macrobenthique par le type de pression considéré.

De plus, les organismes issus de ces mêmes prélèvements ont été classés en groupes fonctionnels d'après leur mode de nutrition et leurs ressources alimentaires selon la matrice de traits fonctionnels présentée dans Tachet et al. (2010). En particulier, la communauté d'invertébrés détritivores, impliquée dans le processus de décomposition des litières, a pu être analysée et mise en relation avec la contamination par les pesticides, d'une part, et les taux de décomposition des litières, d'autre part.

IV. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS PAR OUTIL

1. Échantillonneurs passifs

1.1 Spécificité vis-à-vis de la nature des substances piégées.

On rappelle que dans cette étude les échantillonneurs passifs mis en œuvre sont les TSP, POCIS et POCIS-MAX (voir Tableau 2). Ces différents supports avaient pour objectif de suivre une gamme de substances aux propriétés physicochimiques diversifiées (a priori plus hydrophobes sur les TSP, plus hydrophiles sur les POCIS-MAX et intermédiaires sur les POCIS). Le nombre de molécules suivies sur chaque échantillonneur est rappelé dans le Tableau 3 (et leur nature en Annexe 4). Quinze substances actives ont été suivies à la fois sur les TSP et les POCIS. Les résultats d'analyse sont présentés dans leur intégralité (pour chaque site/station et type

Tableau 3 - Nature des substances actives quantifiées au moins une fois sur chaque site et par échantillonneur.

Paramètre	Site	TSP (23 SA suivies)	POCIS (41 SA suivies)	POCIS-MAX (17 SA suivies)
Substances actives (SA) quantifiée au moins 1 fois sur la campagne	Sources de la Vigne (16 SA)	acétochlore, atrazine, boscalide, chlortoluron, DCA, diflufénicanil, diuron, isoproturon, métolachlore, procymidone, tébuconazole	chlortoluron, DCPU, hexazinone, imidaclopride	métolachlore OA
	Coise (23 SA)	atrazine, azoxystrobine, chlortoluron, DCA, diflufénicanil, diméthomorphe, diuron, isoproturon, linuron, métolachlore, norflurazon, spiroxamine	DET, diméthanamide, imidachlopride, isoproturon, métolachlore, terbuthylazine	2,4-D, bentazone, MCPA, mécoprop, mésotrione, métolachlore OA, nicosulfuron
	Charlet (30 SA)	acétochlore, atrazine, azoxystrobine, boscalide, carbendazime, chlortoluron, DCA, diflufénicanil, DCPMU, diméthomorphe, diuron, linuron, métolachlore, procymidone, simazine, spiroxamine, tébuconazole	atrazine, azoxystrobine, chlortoluron, cyproconazole, DCPMU, DCPU, diméthomorphe, diméthoate, diuron, époxiconazole, imidachlopride, linuron, métolachlore, simazine, tébuconazole	2,4-D, acétochlore OA, bentazone, dichlorprop, MCPA, mécoprop, mésotrione, métolachlore OA
	Lons-le-Saunier (juin) (21 SA)	acétochlore, atrazine, azoxystrobine, boscalide, chlortoluron, diflufénicanil, diméthomorphe, diuron, isoproturon, métolachlore, simazine, spiroxamine, tébuconazole	chlortoluron, DCPU, imidaclopride, métolachlore, tébuconazole	2,4-D, bentazone, dichlorprop, MCPA, mésotrione, métolachlore OA
	Lons-le-Saunier (octobre) (19 SA)	atrazine, azoxystrobine, boscalide, chlortoluron, DCA, DCPMU, diflufénicanil, diuron, isoproturon, linuron, métolachlore, simazine, tébuconazole	chlortoluron, diuron, imidaclopride, métolachlore, tébuconazole	2,4-D, bentazone, dichlorprop, MCPA, métolachlore OA

d'échantillonneur) en Annexe 5. On note que les molécules quantifiées présentes dans le Tableau 3 mais non affichées sur les figures de l'Annexe 5 sont retrouvées à de très faibles concentrations, proches de leur limites de quantification de l'ordre de quelques ng/L.

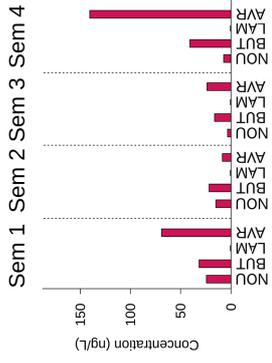
Des analyses plus complètes (plus de 300 molécules) réalisées au laboratoire de la Drôme sur des extraits de POCIS ont montré que la liste des molécules recherchées, bien que limitée à 66, permettent de rendre compte des principales substances présentes dans le milieu.

Quel que soit le site, les résultats ont montré que, pour les molécules recherchées en commun sur les TSP et les POCIS, toutes les substances retrouvées sur les POCIS l'ont aussi été sur les TSP, ce qui n'était pas réciproque. Par ailleurs pour les molécules quantifiées avec les deux outils, les concentrations estimées étaient très souvent plus faibles avec les POCIS. Ce point est discuté en détail dans le chapitre V. Le Tableau 3 récapitule les principales substances quantifiées avec chaque outil sur chaque site. Le POCIS-MAX a mis en évidence sa capacité à piéger des substances plus polaires, dont certains produits de dégradation.

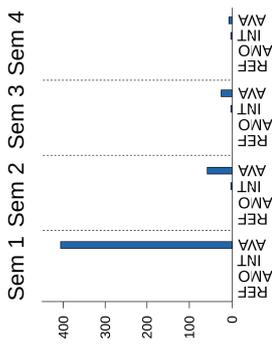
1.2 Capacité à rendre compte des épisodes de transfert

On rappelle que les TSP ont été exposés 4 fois 1 semaine sur le mois alors que les POCIS et POCIS-MAX ont été exposés 2 fois 15 jours en raison de leurs différentes cinétiques d'accumulation. Les réponses de tous ces outils ont été influencées par les épisodes pluvieux. Les TSP fournissant des réponses hebdomadaires, elles permettent de mieux rendre compte de la variabilité des concentrations à cette échelle temporelle, en lien avec les épisodes de pluie, souvent relativement rapides. Ces variations sont illustrées pour la molécule retrouvée à la plus forte concentration sur chaque site (Figure 38).

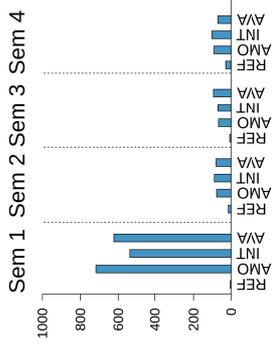
Vigne, Février 2017
Chlortoluron



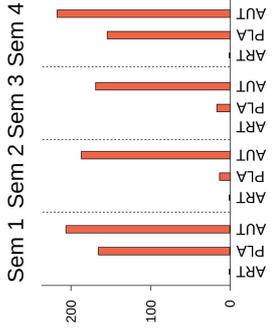
Lons, Octobre 2017
Chlortoluron



Lons, Juin 2017
Métolachlore



Charlet, Juin 2017
Métolachlore



Coise, Juin 2018
Métolachlore

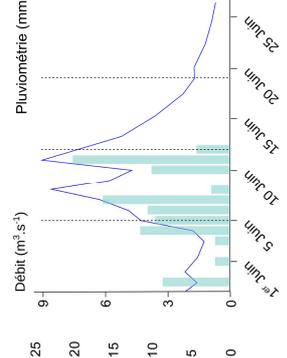
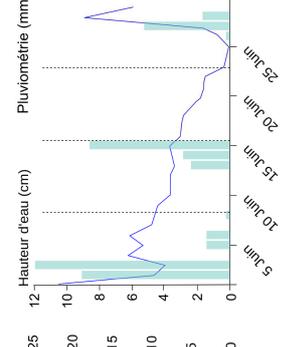
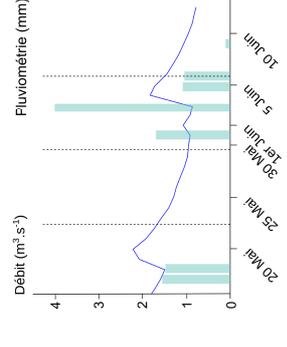
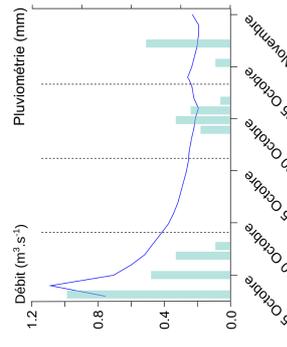
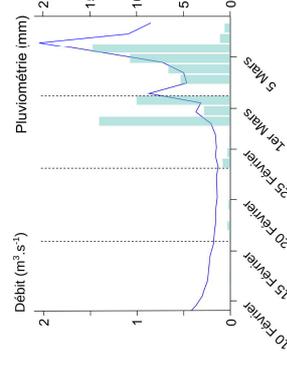
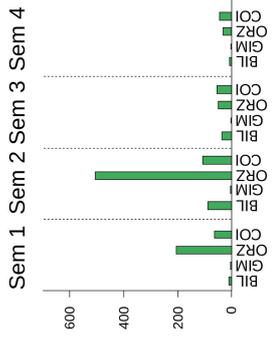


Figure 38 - Mise en correspondance des évolutions temporelles des concentrations moyennes en métolachlore (ou chlortoluron sur la Vigne et la campagne d'automne sur Lons-le-Saunier) estimées via les TSP sur chaque site et station avec l'évolution de la pluviométrie et des débits (ou hauteur d'eau sur le Charlet) au cours des semaines de suivi.

1.3 Capacité à rendre compte d'évolutions d'usages dans l'espace et dans le temps

En lien avec une occupation du sol et des cultures différenciées

Sur tous les sites, on a mis en évidence une bonne cohérence entre les substances retrouvées et les cultures dominantes. De manière générale, le métolachlore puis le chlortoluron apparaissent comme les molécules les plus présentes, à la fois en termes d'occurrence et de niveau de concentration. On note, par ailleurs, qu'il a été difficile de trouver des stations de référence non contaminées au sein des territoires fortement agricoles choisis.

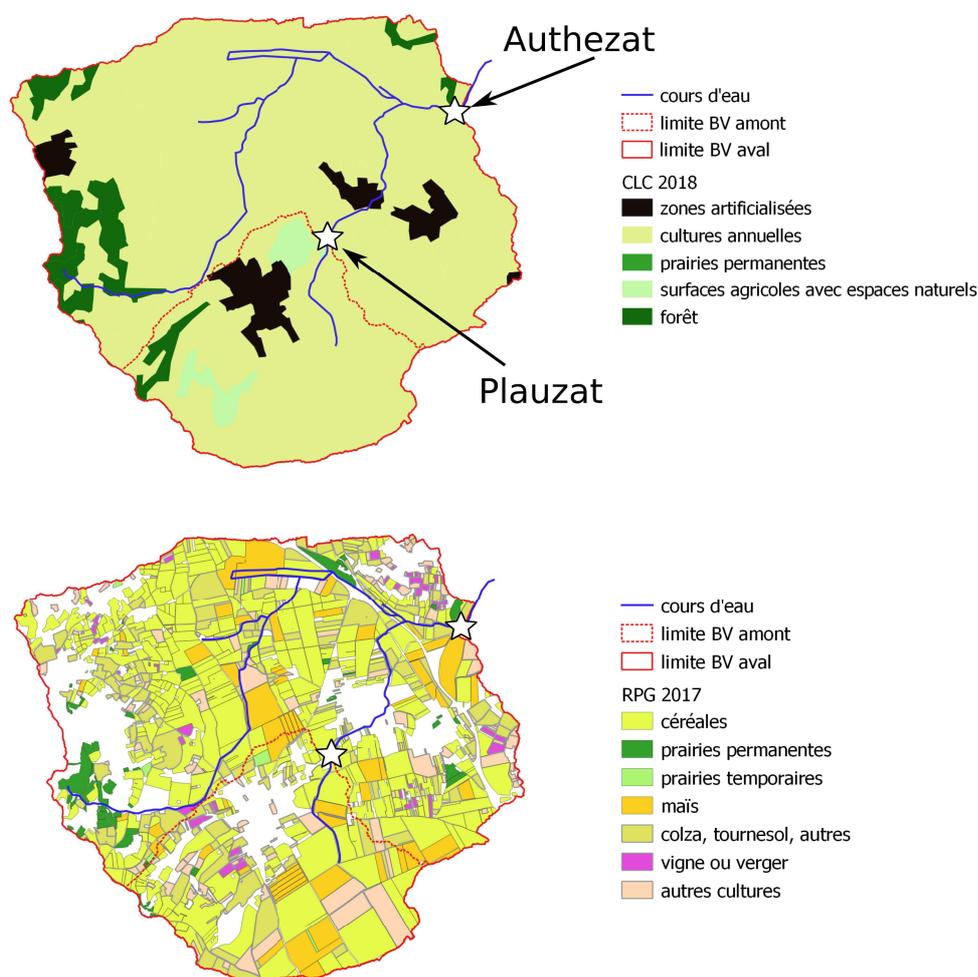


Figure 39 - Cartes d'occupation du sol du bassin du Charlet : en haut : Corine Land Cover 2018, en bas : cultures recensées dans le Registre Parcellaire Graphique 2017.

Sur le **bassin du Charlet** (Figure 39), les résultats ont montré la présence d'un grand nombre de substances différentes (Annexe 5) en cohérence avec les cahiers des charges visant un niveau de

protection phytosanitaire élevé (agro-alimentaire). La station Authezat est plus fortement contaminée et de façon assez continue alors que la station Plauzat est plutôt contaminée de façon épisodique pendant les crues.

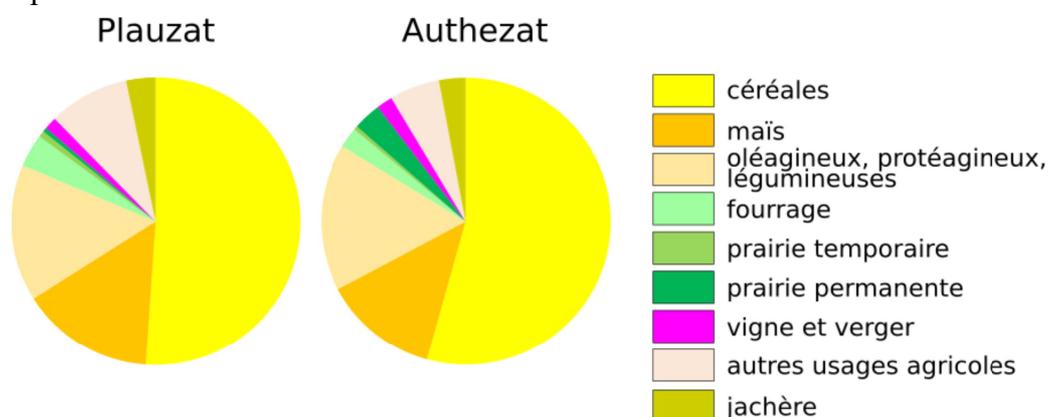


Figure 40 - Répartition des cultures dans les bassins en amont des deux stations d'étude du Charlet (surface de culture du RPG 2017 ramenée à la surface totale de chaque bassin).

Dans les deux cas, la contamination est essentiellement liée aux herbicides du maïs et aux fongicides des céréales. Le métolachlore appliqué sur le maïs et son principal métabolite (le métolachlore OA) sont retrouvés en plus fortes concentrations que les autres molécules. Sur la station Authezat, on trouve quelques traces de substances vigne et de l'imidaclopride. Une analyse plus complète d'un POCIS a également montré la présence de substances médicamenteuses (anti-inflammatoires et analgésique) probablement à mettre en lien avec la présence en amont de la station d'épuration de La Sauvetat. On note la faible présence de prairies permanentes ou espaces naturels (Figure 40) pouvant servir de zone tampon sur ce bassin, ce qui contribue probablement aux plus forts transferts observés sur ce site.

Sur le site de Lons-le-Saunier (Figure 41), on retrouve une dominante de substances utilisées sur maïs et céréales avec une différenciation spatiale et temporelle (Annexe 5) :

- Au printemps (juin 2017), ce sont les substances appliquées sur maïs qui sont le plus mesurées avec de fortes concentrations en métolachlore et en son métabolite métolachlor OA sur les trois stations du site de Lons-le-Saunier ce qui suggère la présence de cette culture dès l'amont du bassin. On observe également de la bentazone sur la station Intermédiaire et du chlortoluron uniquement en aval. Du tébuconazole est observé aux trois stations avec un léger gradient amont-aval. Peu de molécules utilisées spécifiquement sur la vigne ont été quantifiées. La station Aval est en général plus contaminée que les deux autres.

- A l'automne (octobre 2017), les concentrations en chlortoluron sont près de 10 fois supérieures à celles de juin et essentiellement observées à l'aval du bassin, ce qui est plutôt cohérent avec la localisation des cultures de céréales principalement dans la plaine. Le métolachlore et son produit de dégradation ainsi que la bentazone sont présents sur les trois stations mais en concentrations moindres que celles observées en juin. On observe la présence de diuron uniquement sur la station Aval et de manière plus marquée qu'au printemps (usages biocides ?).

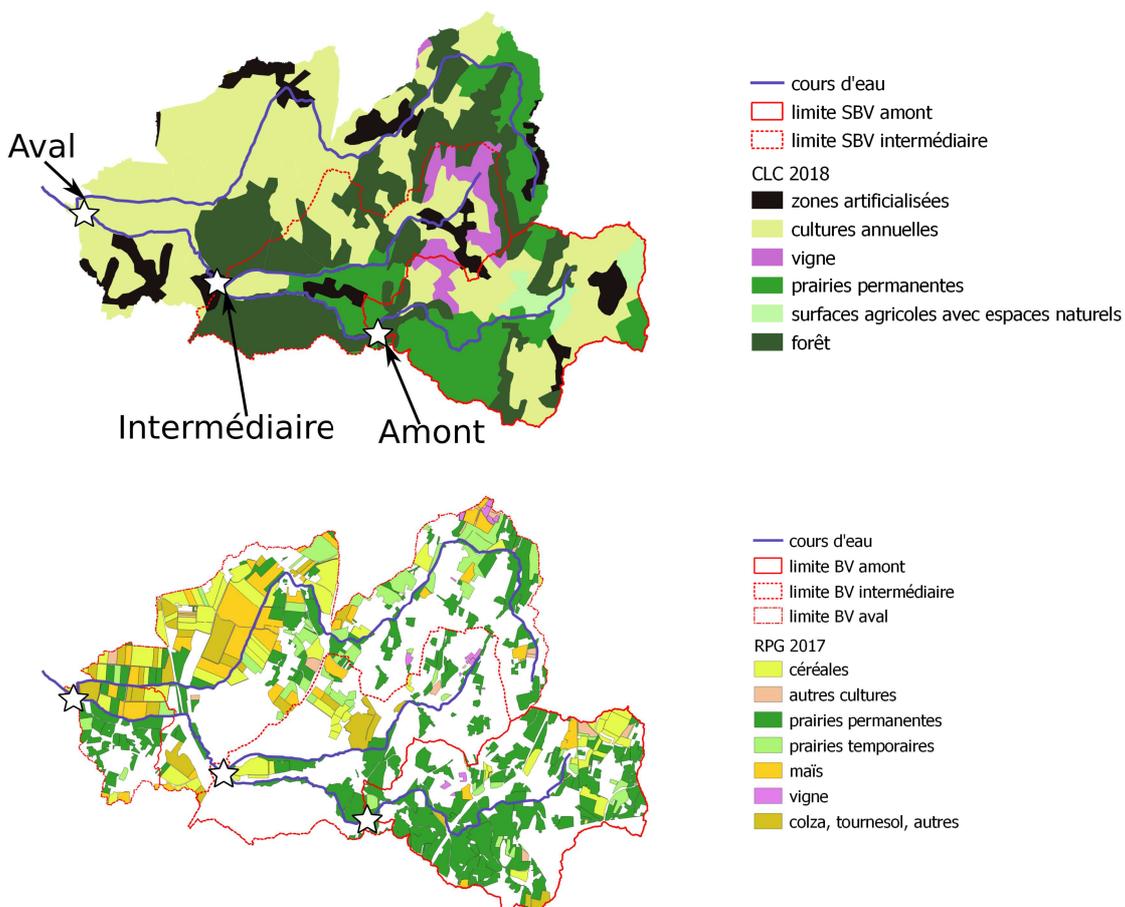


Figure 41 - Cartes d'occupation du sol du bassin de la Madeleine (site de Lons-le-Saunier) : en haut : Corine Land Cover 2018, en bas : cultures recensées dans le Registre Parcellaire Graphique 2017.

Le RPG sur ce bassin ne permet pas de rendre compte de toutes les cultures présentes sur ce site (y compris hors cultures pérennes) ce qui limite la portée de la comparaison des occupations d'amont en aval (Figure 41 en bas). Si l'on s'en tient aux seules parcelles répertoriées dans le RPG, le blé occupe 14 % de la surface totale du bassin Aval, contre 6 % du bassin amont et 9 % du bassin Intermédiaire. Si on ajoute les autres céréales (orge notamment), on obtient une répartition plus homogène de l'amont vers l'aval (11 % dans le bassin Amont, 12 % dans le bassin Intermédiaire et 17,5 % dans le bassin Aval). Il semble toutefois que le bassin Aval soit plus occupé par les céréales que l'Amont, mais cette seule information ne suffit pas à expliquer que le chlortoluron ait été uniquement observé à la station Aval. Une enquête plus fine sur les usages serait nécessaire pour vérifier si cette substance est effectivement plutôt appliquée sur la partie aval du bassin-versant. On note bien la présence de cultures de maïs dès l'amont du bassin, en cohérence avec les mesures en métolachlore aux trois stations, avec toutefois une plus forte occupation dans le bassin Aval (3 % de la surface totale en amont, 3 % en Intermédiaire et 11,5 % en Aval). Les surfaces non négligeables en prairies permanentes, atteignant respectivement 15, 21 et 30 % de la surface totale de chaque

bassin Aval, Intermédiaire et Amont, ne semblent pas suffire à limiter les fortes concentrations des principales substances retrouvées.

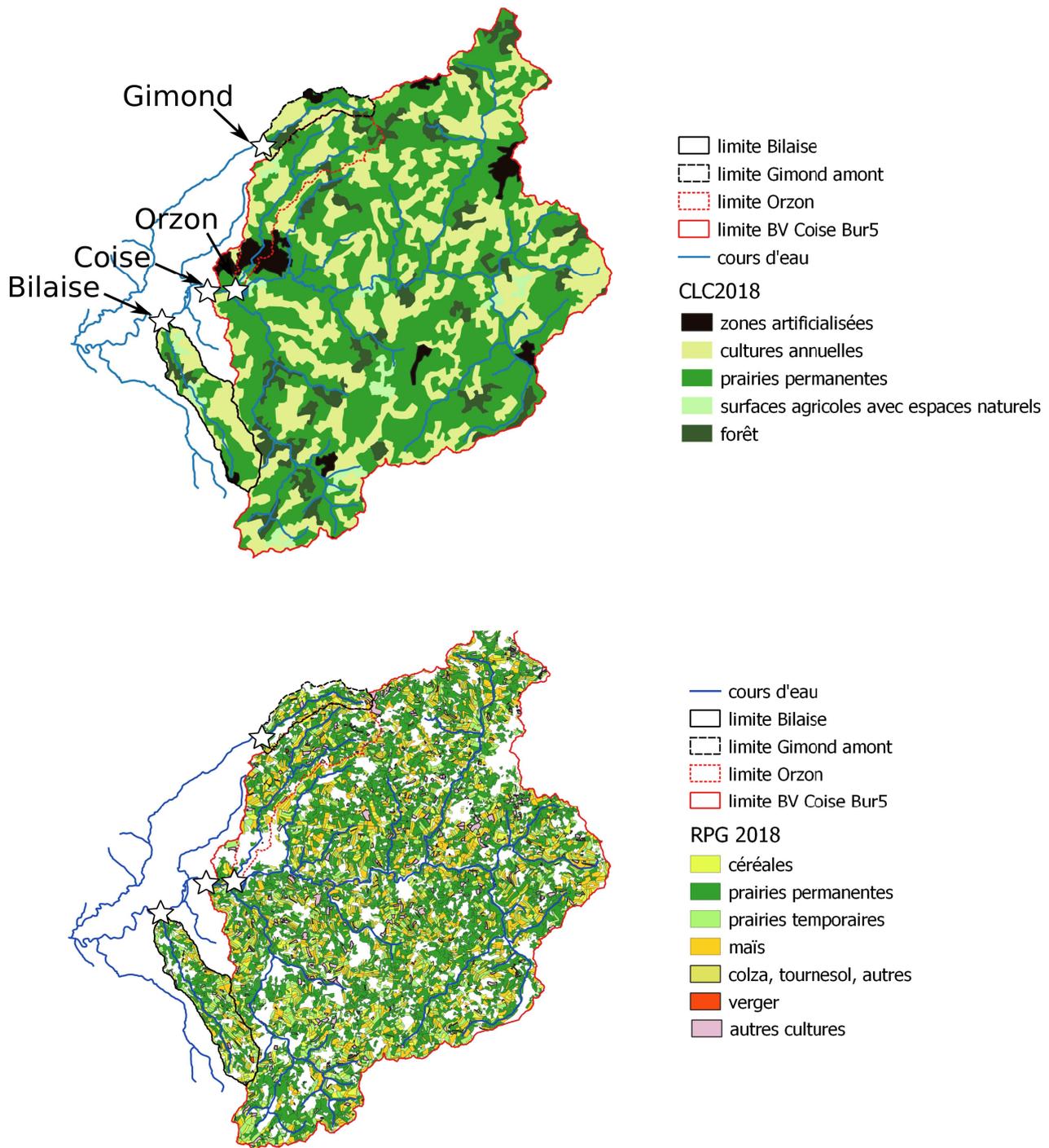


Figure 42 - Cartes d'occupation du sol du bassin de la Coise : en haut : Corine Land Cover 2018, en bas : cultures recensées dans le Registre Parcellaire Graphique 2018.

Sur le **bassin de la Coise** (Figure 42) les concentrations sont moindres que sur les deux sites cités plus haut sauf pour certaines molécules comme le métolachlore qui est également retrouvé en

fortes concentrations. Les stations étudiées se différencient fortement par les concentrations en produits phytosanitaires mesurées (Annexe 5).

- La station de la Gimond apparaît comme la station la moins contaminée des trois, vis-à-vis des produits phytosanitaires.

- Le Bilaise présente une contamination intermédiaire au produits phytosanitaires même si on détecte la présence de métolachlore et d'isoproturon, MCPA, mésotrione et nicosulfuron en première partie de campagne.

- l'Orzon est soumis à de forts pics de concentrations et surtout pour des substances du maïs (notamment le métolachlore, puis nicosulfuron, mésotrione et terbuthylazine).

- La station sur la Coise présente le plus grand nombre de molécules retrouvées même si les concentrations semblent atténuées par rapport à l'Orzon (pas de pics intenses de concentration), probablement en raison d'un effet de dilution lié au gabarit du cours d'eau. On retrouve essentiellement des herbicides du maïs (métolachlore, diméthanamide, terbuthylazine nicosulfuron, mésotrione) et des céréales (mecoprop, MCPA).

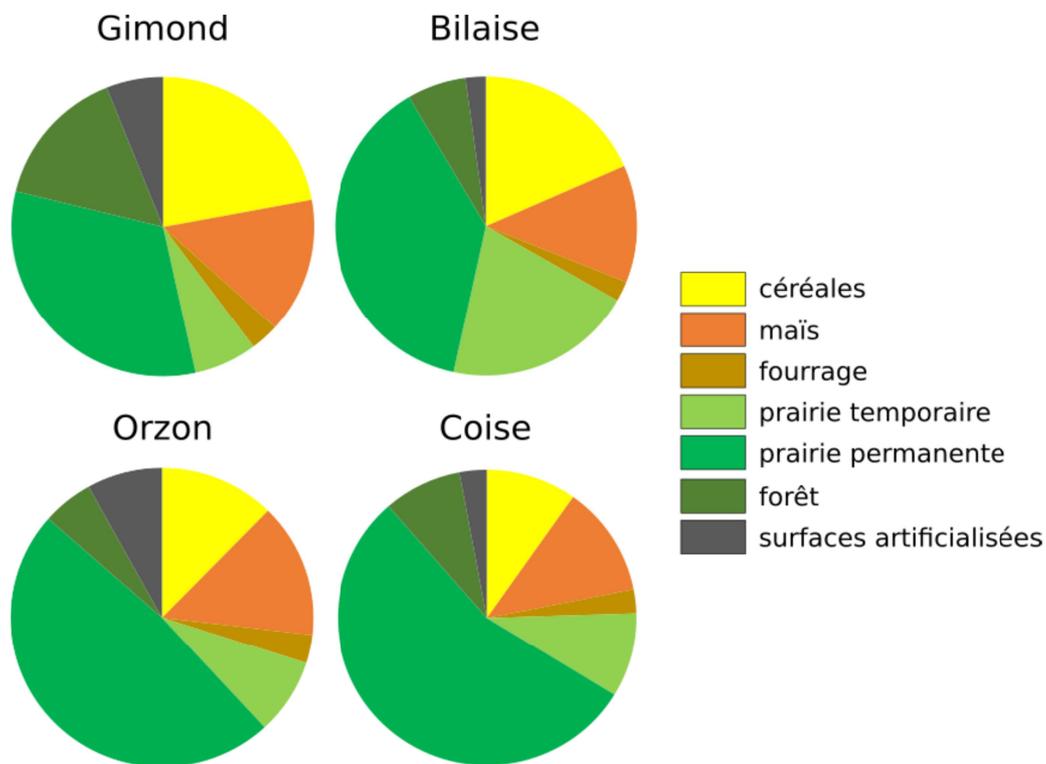


Figure 43 - Répartition des cultures dans les bassins en amont des quatre stations d'étude de la Coise (surface de culture du RPG 2018 ramenée à la surface totale de chaque bassin).

Les Figures 42 et 43 permettent de confronter ces résultats aux pressions agricoles à travers les données d'occupation du sol (Corinne Land Cover et RPG 2018). On note que le bassin en amont de la station Gimond est celui présentant la plus forte proportion de parcelles cultivées en céréales et maïs. Il est donc surprenant que l'on mesure une contamination moindre par rapport aux trois

autres stations. Il faut cependant noter que cette station se situe en aval de l'aire d'alimentation du captage de la Gimond. On peut faire l'hypothèse, non vérifiée, que les pratiques sur ce secteur font l'objet de plans d'actions spécifiques visant à limiter l'usage de produits phytosanitaires.

La proportion de surfaces cultivées paraît également plus élevée sur le bassin du Bilaise que sur le bassin de l'Orzon et celui en amont de la station sur la Coise. Cependant on note que les cultures sur le Bilaise sont plutôt localisées en haut de versant alors que les fonds de vallée sont occupés par des zones boisées et les prairies permanentes. On peut donc faire l'hypothèse que ce « gainage » du cours d'eau contribue à en atténuer la contamination.

Sur le bassin de l'Orzon, au contraire, les cultures sont plutôt situées à proximité du cours d'eau. Quant au bassin en amont de la station sur la Coise, on constate en que la proportion de surfaces cultivées est plus faible que sur les autres bassins et la part de prairies permanentes plus élevée (54 % de la surface totale du bassin amont), ce qui peut contribuer à expliquer les moindres concentrations retrouvées.

Les Sources de la Vigne présentent également de plus faibles concentrations que les deux premiers (Annexe 5). On retrouve essentiellement des herbicides céréales (chlortoluron, isoproturon, métolachlore). Le métolachlore OA est le plus retrouvé sur l'Avre et la source du Nouvet. De manière plus générale, on observe une contamination plus élevée sur l'Avre puis sur le Lamblore et enfin le Buternay. A noter que l'on retrouve systématiquement du diuron à la station du Lamblore (usages anciens ?). En revanche, on ne retrouve pas de chlortoluron sur cette station.

La Figure 44 donne une indication de la pression agricole sur ce site. Comme pour le site de Lons-le-Saunier, on note que le RPG ne permet pas de caractériser correctement les parcelles cultivées en amont de chaque station. CLC 2018 indique un pourcentage de surface cultivée relativement à la surface en amont presque équivalent pour les bassins de l'Avre et du Lamblore (respectivement 43 et 47 %), alors qu'il est seulement de 20 % pour le Buternay. Les proportions de surfaces en prairies permanentes sont plus faibles (moins de 15 %) que sur le bassin de la Coise mais elles sont bien réparties en « gainage » le long des cours d'eau (notamment l'Avre), ce qui peut contribuer, en complément des actions spécifiques sur les pratiques agricoles menées sur cette AAC, à expliquer la moindre contamination des cours d'eau de ce site comparativement aux sites du Charlet et de Lons-le-Saunier.

Pour ce qui est de la source du Nouvet, les suivis n'ont pas mis en évidence de pic de concentrations comme au sein des cours d'eau et le profil de contamination ressemblait plus à celui du Buternay ou de l'Arvre hors crue. Ces résultats mériteraient toutefois d'être confirmés par un suivi plus long pour mieux rendre compte de la dynamique de contamination dans la nappe qui semble plus atténuée que celles des trois cours d'eau suivis.

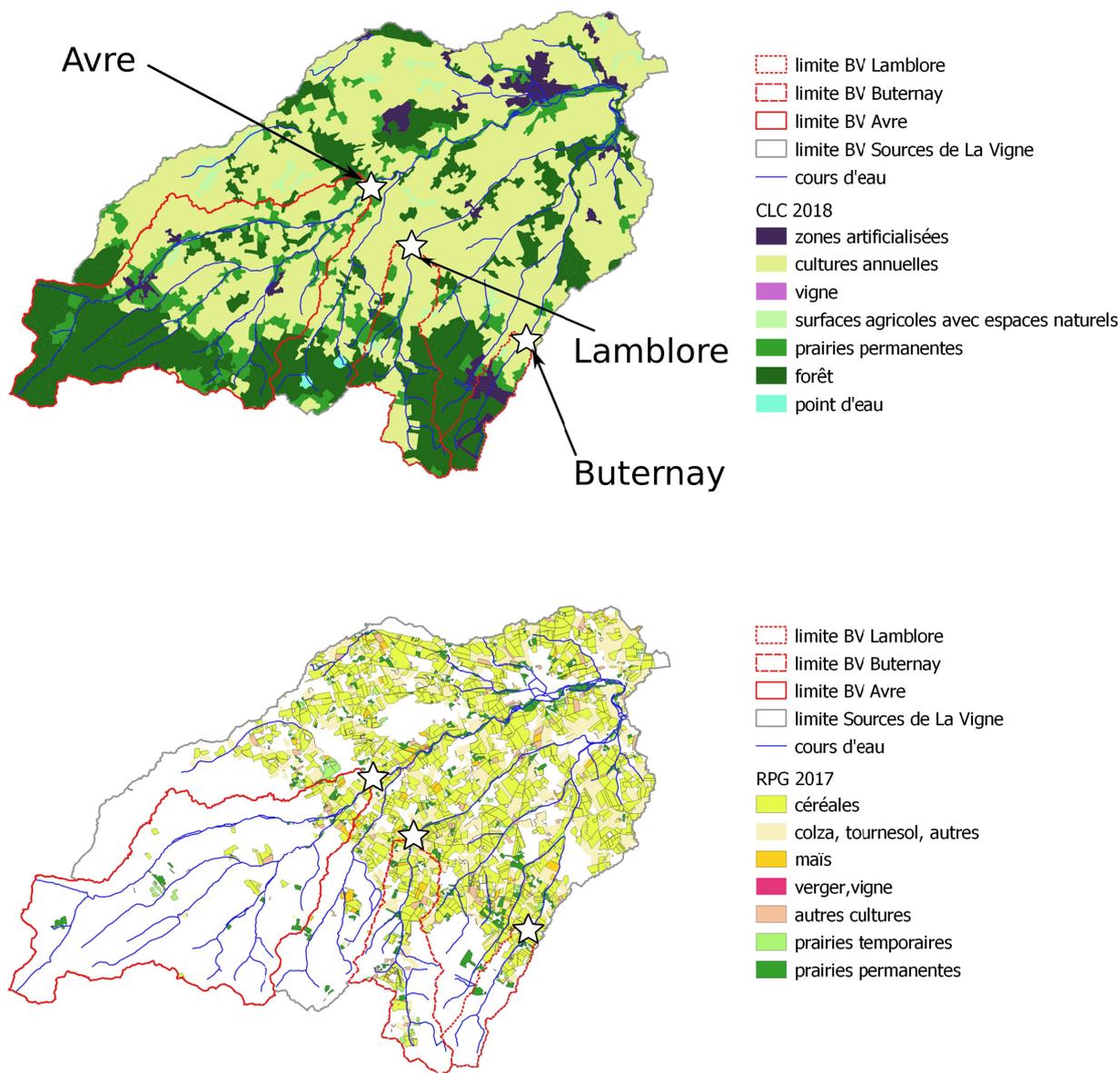


Figure 44 - Cartes d'occupation du sol du bassin des Sources de la Vigne : en haut : Corine Land Cover 2018, en bas : cultures recensées dans le Registre Parcellaire Graphique 2017.

En lien avec une évolution des usages à plus large échelle temporelle

Pour le bassin de la Coise, déjà suivi en 2014, on a tenté d'évaluer si la contamination avait évolué en 2018. Cela a été réalisé à partir des résultats des échantillonneurs passifs (TSP et POCIS), déployés aux stations de la Coise, Orzon et Bilaise en juin 2014 et juin 2018.

Un tel exercice présente toutefois un certain nombre de limites résumées dans l'encadré ci-dessous.

Pour la comparaison des usages et des contaminations observées aux stations Coise, Bilaize et Orzon en 2014 et en 2018, on souligne les limites suivantes :

- Les années 2014 et 2018 sont caractérisées par des conditions hydrodynamiques très différentes, avec des épisodes de crue beaucoup plus marqués en 2018.
- Les usages phytosanitaires sont estimés par le biais des ventes et non par celui des applications réelles.
- Les ventes sont estimées à partir de la BNVD pour un ensemble de communes dont la zone d'emprise totale ne recouvre pas complètement le bassin d'étude en amont de la station sur la Coise. Une analyse plus fine des usages à l'échelle des sous-bassins en amont des deux autres stations à partir de la BNVD n'a pas été possible compte tenu de sa résolution spatiale insuffisante.
- On ne peut garantir que les produits achetés ont été utilisés (en partie ou en totalité) sur ces mêmes communes pour l'année considérée.

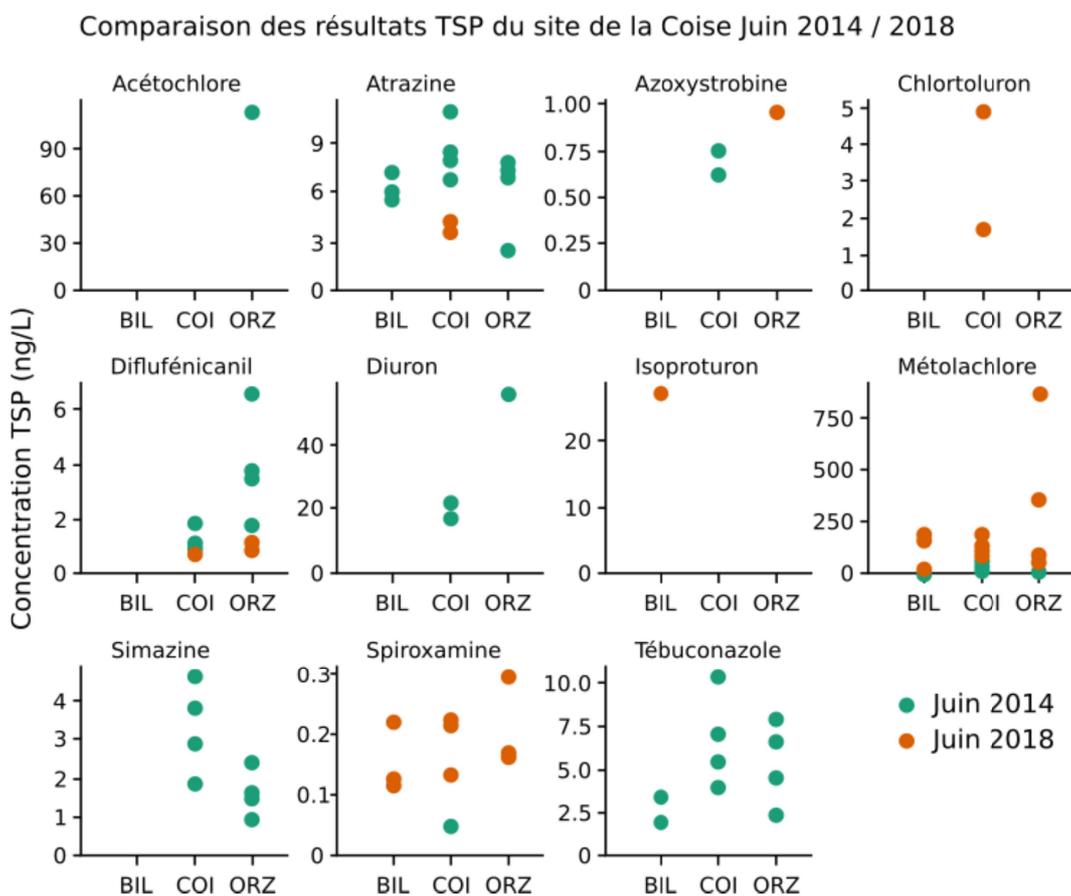


Figure 45 - Comparaison des concentrations moyennes mesurées sur les TSP en 2014 et 2018 aux stations du Bilaize (BIL), sur la Coise (COI) et de l'Orzon (ORZ). Les points <LQ ne sont pas représentés.

Il faut ainsi être très vigilant dans l'interprétation des évolutions de contamination car les conditions hydrologiques durant les campagnes ont été très différentes avec, en 2014, deux petits pics montant à 1 m³/s au maximum et, en 2018, deux pics bien plus importants montant autour de 8 m³/s (station de Saint-Médard-en-Forez Station K0673310 – DREAL Rhone-Alpes-EauFrance) (Annexe 6). On a également noté des teneurs en COT et COD plus élevés en 2018, témoignant sans doute d'épisodes plus ruisselants et érosifs. Les figures 45 et 46 montrent les concentrations moyennes calculées respectivement à partir des tiges silicones et des POCIS pour les principales substances retrouvées en 2014 et/ou en 2018.

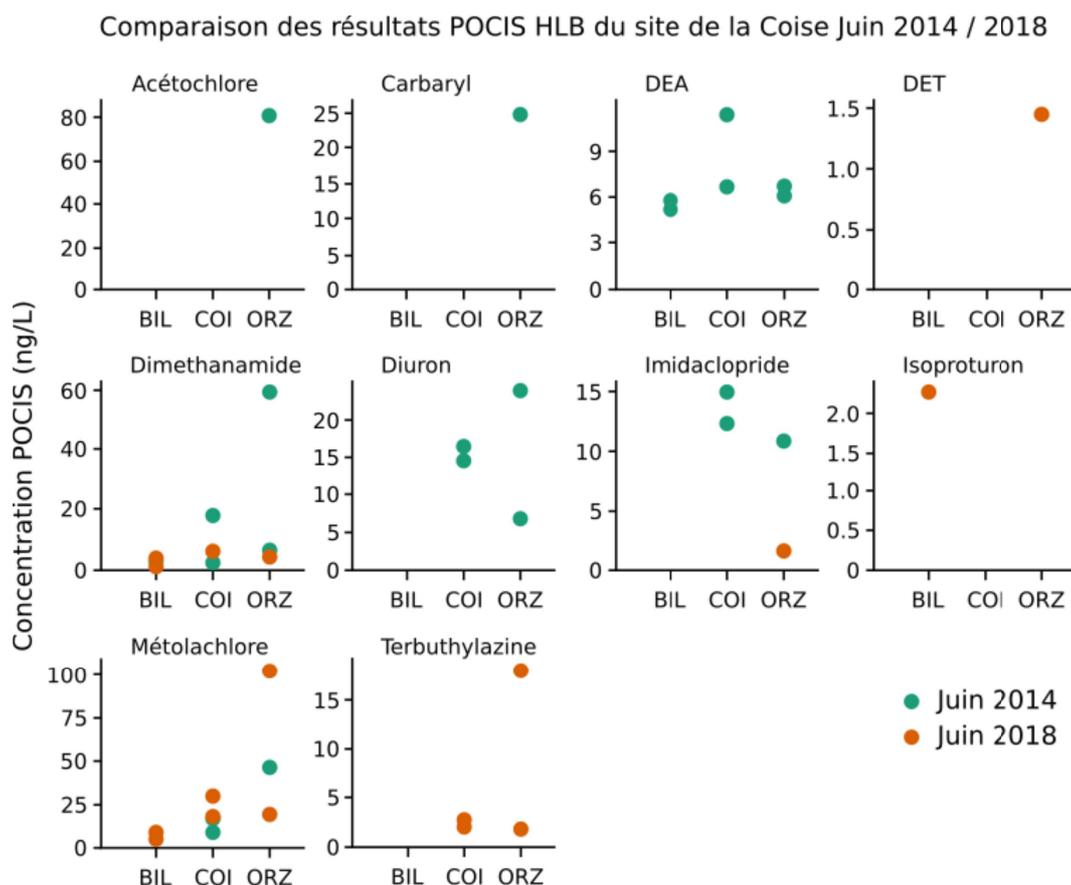


Figure 46 - Comparaison des concentrations moyennes mesurées sur les POCIS en 2014 et 2018 aux stations du Bilaise (BIL), sur la Coise (COI) et de l'Orzon (ORZ). Les points <LQ ne sont pas représentés.

Nous avons cherché à mettre ces résultats de contamination en regard des usages estimés en 2014 et 2018. La connaissance fine des applications sur chaque sous bassin n'étant pas disponible, on a réalisé l'analyse à partir des substances actives de produits phytosanitaires répertoriées au niveau des ventes recensées au code postal dans la Banque Nationale des Ventes de produits phytosanitaires par les Distributeurs agréés (BNVD). Deux codes postaux ont été retenus : ils correspondent à 16 communes dont 12 sur notre zone d'étude et 4 en périphérie immédiate (voire la carte d'emprise des communes en Annexe 7). La figure 47 (A et B) montre les quantités des principales substances analysées sur les échantillonneurs passifs et recensées pour ces communes

dans la BNVD en 2014 (et l'année précédente) et en 2018 (et l'année précédente). Les valeurs de quantités vendues pour une plus large gamme de molécules sont données en Annexe 8.

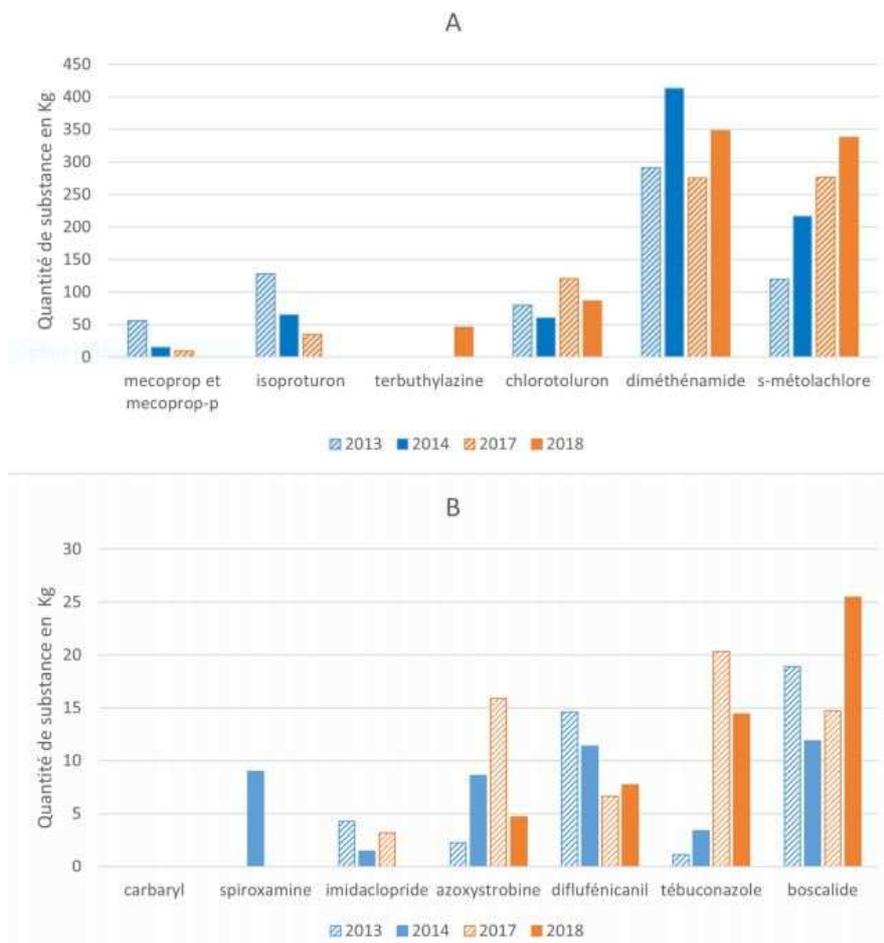


Figure 47 - Quantités des produits phytosanitaires étudiés, appliqués sur la zone d'étude en 2013, 2014, 2017 et 2018. A : substances à plus fort taux d'application et B : substances appliquées en plus faible quantité.

Nonobstant les limites évoquées dans l'encadré plus haut, on constate une diminution des concentrations de certaines molécules dans les cours d'eau :

- L'acétochlore a disparu des mesures en 2018 (interdit d'utilisation depuis 2013), ainsi que le carbaryl (interdit d'utilisation depuis 2008).
- Les concentrations moyennes en atrazine ont baissé en 2018 même si elles sont encore quantifiables (substance interdite depuis 2003). Parmi ses principaux métabolites, la DEA a disparu et les concentrations en DET semblent avoir augmenté.
- Les concentrations en diuron ont aussi diminué (interdit depuis 2008 pour usages agricoles – usages biocides encore autorisés).
- On retrouve quelques traces de linuron en 2018 (interdit d'usage en août 2017).

Ces dernières molécules, qui soit ne sont plus détectées soit le sont en très faibles concentrations, semblent témoigner de leur lente élimination du milieu.

Parmi les substances autorisées, on constate des évolutions diverses :

- Les concentrations en imidaclopride ont diminué ce qui est en cohérence avec la diminution des ventes recensées (cette substance a fait l'objet de restrictions d'usages et son interdiction d'usage fin 2018 semble avoir été anticipée).
- Les concentrations en diflufenicanil et en diméthénamide (interdit en 2006 mais remplacé par un isomère diméthénamide-p) semblent avoir faiblement diminué, ce qui est cohérent avec les baisses de ventes observées.
- Les concentrations en azoxystrobine mesurées en 2014 et 2018 sont comparables voire à la hausse, alors que les ventes de 2018 sont presque la moitié de celles de 2014. On note cependant une forte augmentation des ventes en 2017 qui peut contribuer à expliquer les plus fortes concentrations retrouvées en 2018 (combinées à une année hydrologique plus marquée en 2018).
- Il est difficile de trancher pour certaines substances comme le chlorotoluron et le tébuconazole, dont les ventes ont bien augmenté en 2017 et 2018, en raison de limites de quantification différentes en 2014 et 2018 (tableau en Annexe 8). Pour la spiroxamine, elle semble peu vendue et les valeurs retrouvées sont très faibles sur les deux années.

En revanche, d'autres molécules ont vu leurs concentrations augmenter :

- La terbuthylazine, le métolachlore et le métolachlore OA en particulier. Cela peut s'expliquer pour la première du fait qu'elle a été interdite à l'utilisation en 2003, puis a été ré-autorisée à partir de 2017 pour un usage sur maïs. Pour le métolachlore, on constate une augmentation continue des ventes.
- Enfin, on observe une augmentation des concentrations en isoproturon sur le Bilaise uniquement. Il est à noter que cette molécule a été interdite d'utilisation fin 2017 et a peut-être fait l'objet d'une utilisation de fin de stock.

On constate que, malgré la montée en puissance des ventes de fongicides pour lutter contre la rouille jaune (ex : tébuconazole) suspectée par le SIMA Coise, cette substance n'a pas montré d'augmentation importante de concentration lors de la campagne de suivi en 2018, comme on aurait pu s'y attendre (même si la limite de quantification est passée de 1,24 ng/L en 2014 à 4,26 ng/L en 2018 suite à un changement d'appareil d'analyse qui offre une sensibilité moindre pour ce composé), elle reste assez faible pour témoigner d'une absence de concentration plus marquée qu'en 2014). Par ailleurs, on note que le prothioconazole est le plus vendu des triazoles recensés sur ce site, mais il n'a pas été recherché dans la liste retenue pour le projet Impact-CE. Une analyse plus approfondie du devenir de ces molécules (tébuconazole et prothioconazole) serait donc à encourager sur ce site pour mieux répondre à cette problématique.

Enfin, on observe une augmentation des ventes d'autres molécules (boscalide) ou des ventes non négligeables (époxyconazole, métazochlore) alors que ces dernières n'ont pas été quantifiées lors de la campagne de 2018, bien qu'ayant été recherchées. Ce résultat peut laisser suspecter des mobilités limitées (affinités pour la matière organique moyenne à forte pour les deux premières molécules et dissipation assez rapide pour la dernière). Mais cela peut aussi poser la question de la temporalité des mesures : même si les échantillonneurs passifs sont plus intégratifs qu'un suivi ponctuel, une

période de suivi plus longue(voire tout au long de la période d'application des substances) permettrait d'avoir une vision plus représentative de la contamination liée à une saison culturale.

Les outils biologiques (écotoxicologiques, écologiques) ont été mis en œuvre de façon complémentaire aux échantillonneurs passifs sur chacun des sites de façon à faciliter le croisement de leurs résultats respectifs. L'idée n'est pas, *in fine*, de substituer un outil par un autre, mais de mettre en exergue la plus-value de chacun de ces outils de monitoring chimique, de biosurveillance ou de bioindication pour réunir des indicateurs complémentaires permettant de mieux cerner les impacts, qu'ils soient chimiques, biologiques ou écosystémiques. De fait, les différents types d'outils n'aboutissent pas nécessairement aux mêmes conclusions, renseignant soit les niveaux de contamination des milieux pour différentes substances, soit les niveaux d'exposition du compartiment biologique, ou encore caractérisant la toxicité des milieux ou les impacts écologiques en place. Néanmoins, il nous est apparu utile, dans le cadre de ce projet, d'examiner les relations statistiques entre les données pesticides (obtenues par les échantillonneurs passifs et les différentes molécules mesurées) et les données biologiques (obtenues à travers les outils biologiques et les différents paramètres biologiques mesurés) dans la mesure où un lien de cause à effet entre chimie et biologie est présumé. Cette démarche présente toutefois des limites fortes aussi bien théoriques que dans le cadre du design de l'étude menée ici qui sont précisées ci-après :

- les gradients de contamination par les pesticides sont confondus avec un certain nombre d'autres paramètres (agricoles notamment), tels que la concentration en nutriments, en carbone organique, et l'intégrité hydromorphologique des cours d'eau, pouvant influencer sur l'impact effectif. Le projet Impact-CE ne réunit qu'un nombre limité d'observations expérimentales (i.e., nombre de stations expérimentées) au regard des nombreuses variables environnementales et indicateurs chimiques ou biologiques mesurés. Ces éléments peuvent perturber l'interprétation des liens statistiques entre concentrations en pesticides et effets mesurés, le design ne permettant pas de s'affranchir de ces nombreux facteurs de confusion dans les corrélations observées entre les différentes variables. Leur croisement est d'autant plus risqué que l'on rassemble par l'analyse statistique des données issues de sites présentant des caractéristiques différentes

- les données de concentrations obtenues par les échantillonneurs passifs sont semi-quantitatives, et leur interprétation en termes quantitatifs soulève des incertitudes

- les molécules recherchées ne couvrent pas l'ensemble des molécules potentiellement présentes dans le milieu, et certaines molécules non recherchées (ex : glyphosate et AMPA, médicaments, produits vétérinaires, ...), peuvent influencer la biologie

- la quantification des molécules par les échantillonneurs n'est pas nécessairement corrélée avec leur biodisponibilité ni avec la toxicité du milieu, puisque cette dernière dépend de la nature des molécules en présence, des organismes et du contexte environnemental.

Pour adresser cette dernière limite, nous avons calculé des Unités Toxiques dans certaines de ces analyses. Cette approche permet la prise en compte non seulement de la concentration mais aussi de la toxicité présumée de chaque molécule. Elle peut donc potentiellement mieux refléter la relation entre contamination par les pesticides et réponse biologique. Toutefois, il est important de noter que les données de toxicité ne sont disponibles, à ce jour, que pour un certain nombre d'organismes modèles (ex : algues, daphnies) et qu'elles ont été calculées dans des conditions contrôlées (au laboratoire en contamination unique) qui ne sont pas représentatives de nos organismes d'étude (ex : communautés microbiennes hétérotrophes, macro-invertébrés) ni des conditions environnementales effectives (multi-stress). Ainsi, l'interprétation et l'extrapolation des résultats de ces analyses sont à réaliser avec prudence.

2. Les communautés microbiennes naturelles permettent de cibler des molécules ou des modes d'action spécifiques

2.1 PICT

La tolérance des biofilms au cuivre et au glyphosate a été évaluée sur toutes les stations lors des suivis sur les sites du Charlet, de Lons-le-Saunier et de la Coise. La tolérance au diuron a été évaluée sur la majorité des sites à l'exception du 2^{ème} suivi sur le site de Lons-le-Saunier.

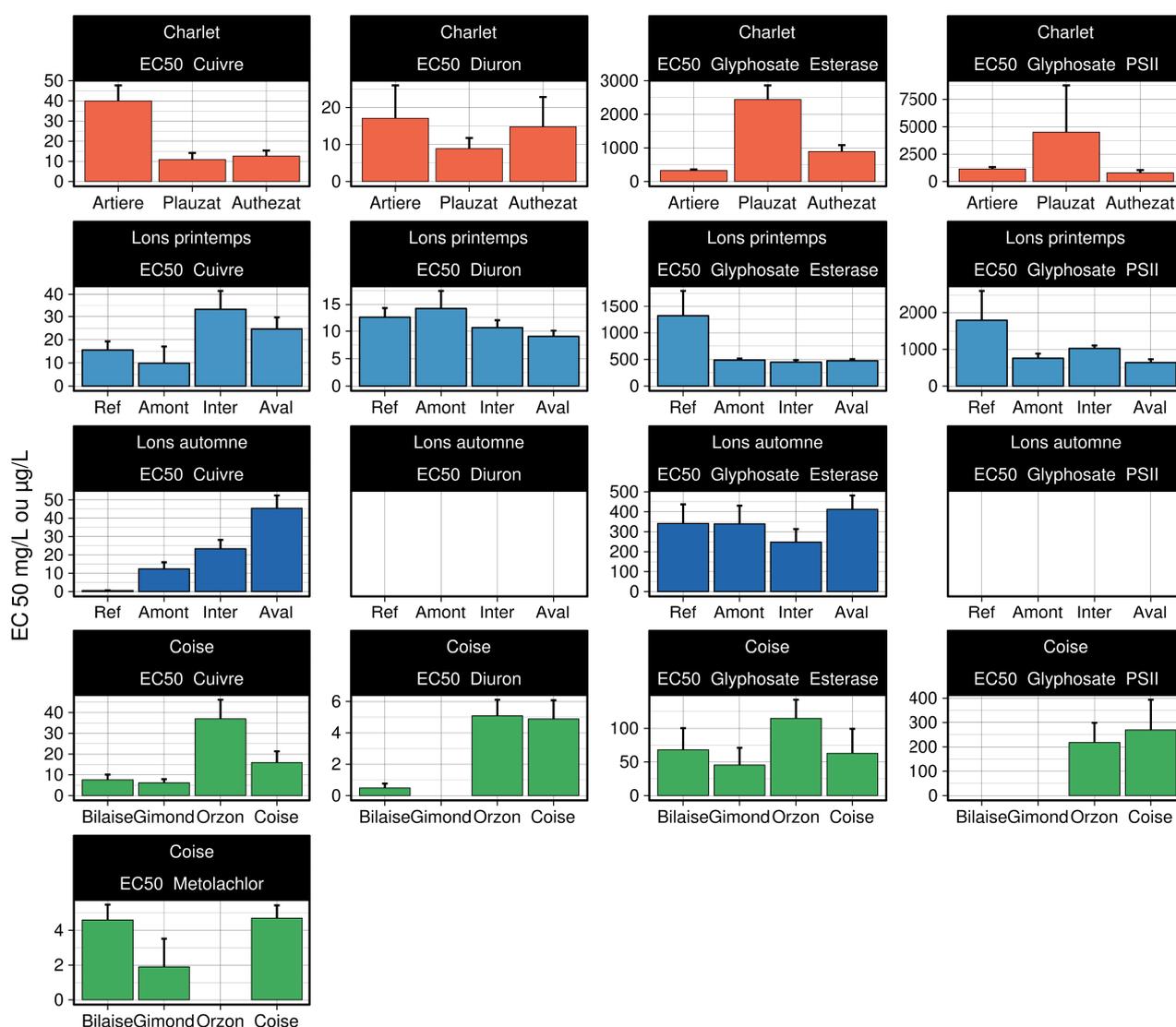


Figure 48 - EC_{50} au cuivre (en mg/L), diuron (en µg/L), glyphosate (en mg/L) et métolachlore (en mg/L) pour les communautés microbiennes collectées sur les différentes stations de chaque bassin-versant étudié. Les EC_{50} ont été obtenues après ajustement d'un modèle de courbe dose-réponse à 3 réplicats / station. Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95 %. L'absence de barre indique que l'estimation de l' EC_{50} n'a pas été possible.

Des recherches ont également été menées au laboratoire pour mettre au point des tests de toxicité aiguë permettant de détecter une acquisition de tolérance au nicosulfuron, au métolachlore et à l'acétochlore. Néanmoins seul un test de toxicité aiguë pour le métolachlore a pu être mis au point et appliqué pour rechercher une acquisition de tolérance microbienne à ce composé lors de la dernière campagne du projet, sur le site de la Coise. L' EC_{50} , i.e. la concentration réduisant de 50 % le paramètre microbien testé, a été choisie pour comparer les niveaux de tolérance microbienne entre les sites. Les résultats sont présentés dans la Figure 48.

Afin d'identifier de possibles corrélations entre la tolérance microbienne observée et les niveaux de contamination, l' EC_{50} obtenue a été comparée à la concentration mesurée dans la rivière du pesticide utilisé dans le test de toxicité aiguë (i.e. cuivre, glyphosate, diuron ou métolachlore) (Figure 49).

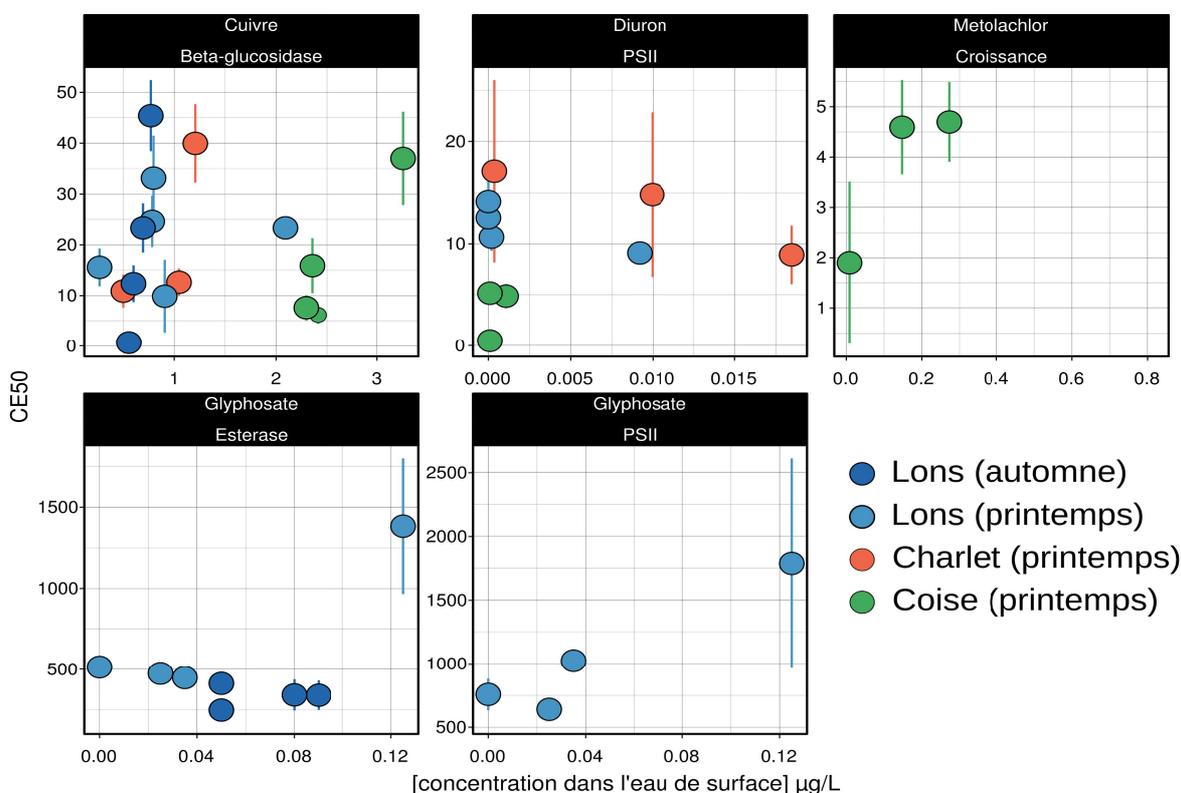


Figure 49 - EC_{50} des communautés microbiennes périphtyiques pour le cuivre (en mg/L), diuron (en µg/L), glyphosate (en mg/L) et métolachlore (en mg/L) en fonction de la concentration du contaminant correspondant mesuré dans la rivière via un échantillonneur intégratif (diuron, métolachlore) ou des prélèvements ponctuels (cuivre, glyphosate). Les EC_{50} ont été obtenues après ajustement d'un modèle de courbe dose-réponse à 3 réplicats / station. Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95 %. L'absence de données indique que l'estimation de l' EC_{50} n'a pas été possible.

Cuivre : Pour la plupart des sites (à l'exception de Lons-le-Saunier au printemps), on observe une augmentation de l' EC_{50} au cuivre lorsque la concentration en cuivre dissous augmente dans la

rivière. Cependant l'observation de ces résultats dans leur ensemble ne permet pas de dégager de tendance claire (Figure 49), mettant en avant la difficulté à comparer les résultats entre les sites. De plus, les concentrations en cuivre ont été mesurées lors d'échantillonnage ponctuel et ne reflètent donc que partiellement l'exposition réelle des communautés sur la période concernée. Le recours à l'outil DGT (Diffusive Gradient in Thin film) qui permet une mesure intégrée du cuivre labile, aurait sans doute permis de consolider la confrontation des concentrations moyennes en cuivre avec les résultats des tests PICT associés. Cependant, ce type de confrontation n'était pas dans les objectifs du projet qui vise plutôt à tirer partie de l'intérêt du PICT pour rendre compte d'expositions au cuivre suffisantes pour induire une acquisition de tolérance, traduisant, le cas échéant, un effet chronique de la contamination au cuivre sur la communauté microbienne.

Diuron : Les concentrations moyennes en diuron dans la rivière sont relativement basses, probablement trop faibles pour induire une acquisition de tolérance à cet herbicide comme suggéré par la faible variation des EC_{50} observées (Figure 48 et 49). Pesce et al. (2016) ont précédemment mis en évidence la diminution de la tolérance microbienne au diuron suite à l'interdiction de cet herbicide. Dans cette étude, les communautés microbiennes périphytiques de la station très faiblement exposée au diuron avaient une EC_{50} moyenne annuelle entre 9,8 et 10,9 μg diuron/L (2009-2011, Pesce et al., 2016). Les valeurs observées dans notre étude sont relativement similaires et confirment donc une faible exposition à cet herbicide.

Glyphosate : La tolérance microbienne au glyphosate est très variable d'une station à l'autre (Figure 48 et 49). Ainsi, une tolérance microbienne élevée au glyphosate a été observée sur le site référence du site de Lons-le-Saunier lors de la campagne de printemps (Figure 48). Le glyphosate n'étant pas piégé par les échantillonneurs mis en œuvre, il n'a pas été possible de quantifier cette substance au moment même des suivis. Sur la base des résultats PICT obtenus, et pour aider à leur interprétation, seuls des échantillonnages ponctuels ont été réalisés quelques jours après les échantillonnages de biofilm. Ces limites rendent difficiles la mise en relation des concentrations en glyphosate mesurées et des niveaux de tolérance au glyphosate. Néanmoins, on observe une augmentation de la tolérance au glyphosate dans les stations où une forte concentration en glyphosate a été mesurée (Figure 49). De plus, cette approche PICT a également été appliquée dans un autre projet (DIAFORM, AE-RM) dans lequel une corrélation entre la tolérance au glyphosate et la concentration en glyphosate de l'eau de surface a pu être mise en évidence (Cheron et al., 2019). Des expériences en laboratoire sont également prévues pour confirmer le potentiel de cette approche pour diagnostiquer l'exposition au glyphosate.

Métolachlore : L'évaluation de la tolérance au métolachlore a uniquement pu être réalisée sur 3 stations du site de la Coise. Elle montre une augmentation de la tolérance microbienne dans les stations les plus contaminées (Bilaie et Coise) par rapport à la station moins contaminée (Gimond) par cet herbicide. Des mesures supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats et valider l'utilisation de cette approche PICT métolachlore.

L'approche PICT a permis dans certains cas de mettre en évidence que les niveaux de concentrations observées dans l'eau de surface étaient suffisants pour modifier les communautés microbiennes périphytiques (ex : PICT cuivre sur le site de Lons-le-Saunier en automne, PICT métolachlore, PICT glyphosate sur le site de Lons-le-Saunier au printemps). Pour certains

contaminants, comme le diuron, il semblerait qu'il existe un niveau de base de la tolérance microbienne permettant d'identifier facilement les sites exposés à cet herbicide. Pour d'autres contaminants, comme le cuivre, les différences de tolérance microbienne observées entre les sites étudiés semblent plus importantes que celles dues aux différences des niveaux d'exposition au cuivre uniquement. Des études supplémentaires, à large échelle, sont nécessaires pour pouvoir déterminer les paramètres modulant cette tolérance (en particulier les phénomènes de cotoxité entre substances présentant des modes d'action similaires) et ainsi pouvoir standardiser les résultats de tolérance microbienne en fonction des paramètres environnementaux.

2.2 Potentiel génétique et fonctionnel des communautés microbiennes du sédiment pour la dégradation de pesticides

Quel que soit le site considéré, la communauté microbienne des sédiments s'est avérée capable de minéraliser l'ensemble des pesticides testés, quoiqu'avec des différences importantes d'une molécule à l'autre (Figure 50). La minéralisation du glyphosate varie dans des proportions allant de 14 à 43 % de la quantité initialement apportée. Ces résultats n'ont pas pu être reliés au scénario d'exposition déterminé par les contaminations observées dans le milieu, excepté sur le site de Lons-le-Saulnier qui semble imprégné de manière homogène avec cet herbicide et l'AMPA, son principal produit de transformation.

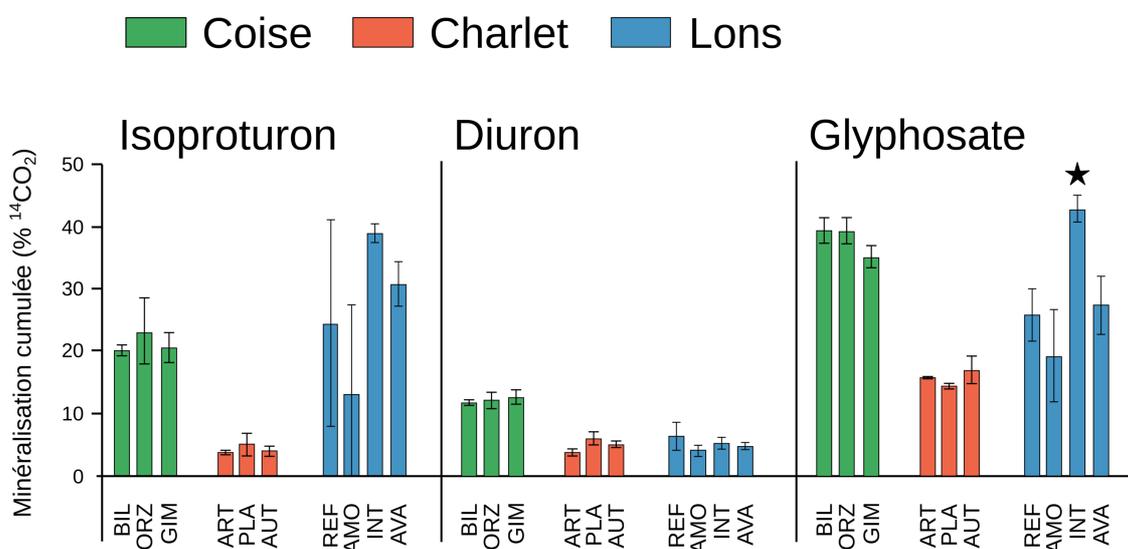


Figure 50 - Pourcentage maximal de minéralisation de l'isoproturon, du diuron et du glyphosate observé après 91 jours d'incubation des échantillons de sédiments prélevés sur le site de la Coise, du Charlet et de Lons-le-Saulnier. L'étoile représente une différence significative entre les stations d'un même bassin-versant.

Sur le site du Charlet, la présence de glyphosate a été décelée sur les stations Plauzat et Authézat dans des mesures ponctuelles du SMVVA. Bien qu'il n'y ait pas eu de mesure de glyphosate à la

station Artière, la présence d'un cimetière et d'espaces sportifs extérieurs peuvent laisser suspecter un usage de cette molécule, l'usage de phytosanitaires étant encore autorisée sur ces espaces en 2017. La minéralisation du diuron, interdit d'usage depuis 2008, est comparativement faible, et comprise entre 3 et 12 % de la quantité initialement apportée. Comme pour le PICT, ce niveau est relativement similaire à celui-ci rapporté par Pesce et al. (2013) dans un autre cours d'eau, suite à la diminution de la contamination de celui-ci après l'arrêt de l'utilisation du diuron.

Toutefois, il est à noter que malgré l'interdiction du diuron, des résidus de cette molécule ont été détectés dans les stations d'Authezat et de Plauzat du site du Charlet, dont l'origine reste inconnue. La minéralisation de l'isoproturon (interdit à la vente en 2017) est faible sur le site du Charlet mais élevée dans les deux autres sites (21 % et 27 % sur les sites de la Coise et de Lons-le-Saunier, respectivement) ce qui semble être en accord avec le scénario d'exposition (pas d'isoproturon dans le site du Charlet alors que des résidus de cet herbicide étaient observés dans au moins une station des deux autres sites).

Les variations entre stations d'un même site sont relativement faibles (à l'exception de l'isoproturon sur le site de Lons-le-Saunier) et aucun gradient amont-aval n'a été mis en évidence. Sur le site de Lons-le-Saunier, une minéralisation plus importante du glyphosate a été observée sur la station Intermédiaire, qui présente par ailleurs les concentrations d'AMPA les plus importantes sur le site (Référence 0,04 ng/L ; Amont 0,30 ng/L ; Intermédiaire 0,36 ng/L ; Aval 0,26 ng/L) d'après les échantillonnages ponctuels.

Le potentiel génétique dégradant l'isoproturon, le diuron, le glyphosate et le 2,4-D a été estimé par qPCR à partir des acides nucléiques extraits des échantillons de sédiments prélevés sur les sites de Lons-le-Saunier et du Charlet (Tableau 4). Quel que soit le site considéré, toutes les qPCR *puhA* ont été négatives indiquant que le potentiel génétique dégradant le diuron n'était pas détectable sur la base de ce gène fonctionnel (qui n'est pas le seul impliqué dans la dégradation du diuron). L'absence de détection du potentiel de dégradation du diuron était attendue en raison de l'interdiction de ce composé en 2008, même si cette substance demeure présente sur le site du Charlet.

La détection du potentiel génétique dégradant du glyphosate confirme les observations du potentiel de dégradation de cet herbicide, montrant que cette fonction est présente au sein de la communauté microbienne des sédiments des stations du site de Lons-le-Saunier (imprégné par cet herbicide et son produit de transformation principal) et du Charlet. Dans les deux sites, la communauté microbienne dégradante *goxA* est plus importante que la communauté *phnJ* (qui était absente sur le site du Charlet) (Tableau 4). Du point de vue méthodologique, le couple d'amorces dégénérées *goxA* semble plus sensible que le couple d'amorces non dégénérées, suggérant l'existence d'une communauté microbienne polymorphe sur ce gène de dégradation. Bien que la minéralisation de l'isoproturon fût observée en plus faible quantité sur le site du Charlet que sur le site de Lons-le-Saunier (Tableau 4), le potentiel génétique dégradant a été détecté à des niveaux semblables sur les stations de ces deux sites.

Tableau 4 - Détection (Det. : nombre de détections/nombre de tests réalisés) et quantification (Quant. : nombre moyen de séquences détectées ± écart-type) par essai qPCR du potentiel génétique dégradant le 2,4-D (*tfdA*), le glyphosate (*goxAd*, *goxA* et *phnJ*) et l'isoproturon (*pdmA*) dans les échantillons de sédiments.

	2,4-D		Glyphosate						Isoproturon	
	<i>tfdA</i>		<i>goxAd</i>		<i>goxA</i>		<i>phnJ</i>		<i>pdmA</i>	
	Det.	Quant.	Det.	Quant.	Det.	Quant.	Det.	Quant.	Det.	Quant.
REF	10/10	914 ± 481	10/10	319 ± 171	9/10	394 ± 335	6/10	112 ± 7	8/10	103 ± 27
AMO	10/10	1251 ± 915	8/10	649 ± 684	5/10	1567 ± 1932	0/10	-	2/10	101 ± 4
INT	10/10	942 ± 541	9/10	275 ± 119	7/10	373 ± 351	0/10	-	2/10	122 ± 38
AVA	10/10	900 ± 579	10/10	339 ± 184	10/10	684 ± 302	1/10	120	3/10	128 ± 48
ART	5/5	406 ± 53	4/5	140 ± 69	2/5	319 ± 210	0/5	-	3/5	100 ± 14
PLA	5/5	361 ± 81	3/5	128 ± 35	1/5	267	0/5	-	2/5	111 ± 20
AUT	5/5	460 ± 152	5/5	137 ± 32	2/5	146 ± 5	0/5	-	2/5	90 ± 1

Dans tous les cas, il est difficile de mettre en relation l'exposition observée dans le milieu et l'abondance du potentiel génétique dégradant correspondant. De plus, le potentiel fonctionnel dégradant et le potentiel génétique de dégradation ne semblent pas être corrélés sur les sites de Lons-le-Saunier et du Charlet. Il est probable que cela soit dû au fait que la détection de résidus de pesticides a été réalisée de manière ponctuelle alors que la mise en place de la biodégradation accélérée des pesticides est un processus intégratif qui conduit à la sélection de communauté microbienne dégradante en réponse à leur exposition. Par conséquent, la détection du potentiel dégradant et du potentiel génétique dégradant est le fruit des expositions passées et présentes du milieu et de sa capacité d'auto-épuration.

3. Le biomonitoring actif par encagement de gammares

3.1 Conditions d'exposition

Les expositions ont été réalisées dans des gammes de température contrastées du fait de variabilités saisonnières, mais aussi de variations entre sites, entre stations et entre les tests consécutifs réalisés sur la même station. Les températures les plus froides (5-8 °C) concernent les Sources de la Vigne, puisque les déploiements ont été réalisés au mois de février. Les déploiements réalisés à l'automne, et surtout au printemps, sont au contraire caractérisés par des températures relativement élevées, atteignant 14-18 °C sur le site de Lons-le-Saunier (au printemps). Ces gammes de température sont conformes aux conditions requises pour la mise en place de ce type de biotest *in situ* (température moyenne entre 7 et 20 °C). Les écarts de température entre tests hebdomadaires et entre stations ont par ailleurs été pris en compte dans l'interprétation des données biologiques (AChE, inhibition alimentaire, cycle de mue) via l'utilisation de valeurs de référence.

Globalement, la survie des gammares lors des tests est satisfaisante (Tableau 5) et a permis la réalisation de la totalité des tests prévus dans la plupart des stations. Des mortalités importantes ont toutefois été observées sur les stations de l'AAC de Lons-le-Saunier en automne (30-50 % de mortalité des femelles pour les expositions longues), en particulier sur la station Intermédiaire (31 % de mortalité chez les mâles sur les expositions courtes). Une mortalité élevée sur la station de Plauzat (site du Charlet) a également été observée et n'a pas permis la lecture de l'ensemble des paramètres de reproduction. Cette surmortalité est liée aux conditions météorologiques (orages) ayant entraîné la sortie de l'eau de certains systèmes d'encagement. Enfin, des mortalités, ponctuellement de l'ordre de 50 % sur l'Orzon, sont liées à un épisode de crue sur l'Orzon et le Bilaise, qui a par ailleurs empêché la mesure de certains des paramètres d'alimentation pour ces deux stations (faible survie et ensablement des dispositifs).

Tableau 5 - Synthèse des résultats de survie des mâles pour les 4 expositions d'une semaine (tests d'activité AChE et d'inhibition alimentaire) et des tests de reproduction et déroulé de mue en expositions longues.

		Survie des mâles % (tests AChE / alim.)				Tests reproduction et mue		
		T1	T2	T3	T4	Survie %	% ♀ < C2	% retard de mue
Vigne	Buternay	100	100	98	99	95	7	0
	Lamblore	99	99	98	98	95	0	0
	Avre	99	95	100	98	90	0	0
Charlet	Artière	85	88	89	96	82	8	17
	Plauzat	76	89	89	93	48	-	-
	Authézat	89	85	90	83	100	13	13
Coise	Bilaise	76	75	74	84	76	0	0
	Orzon	80	79	54	85	61	8	8
	Coise	84	81	84	92	81	0	0
Lons (P)	Seille (P)	98	-	-	-	91	13	13
	Amont (P)	96	95	96	97	67	83	79
	Inter. (P)	93	93	92	100	95	60	60
	Aval (P)	94	94	95	94	90	7	7
Lons (A)	Seille (A)	-	88	-	-	62	15	8
	Amont (A)	96	87	89	86	58	42	58
	Inter. (A)	94	91	95	69	62	54	62
	Aval (A)	94	76	88	78	71	30	40

3.2 Diagnostic de la toxicité du milieu sur les stations de mesure

Sur l'ensemble des stations étudiées, peu de cas d'inhibition de l'activité AChE ont été relevés, reflétant un faible niveau de neurotoxicité lors des périodes d'étude sur ces sites. Une exception concerne la station de la Coise, pour laquelle une faible inhibition a été observée en semaine 3 d'exposition (Figure 51). Par ailleurs, les résultats de la campagne d'automne sur le site de Lons-le-Saunier présentent une valeur faible relativement constante sur l'ensemble des stations et des tests. Même si le niveau sur la station de référence reste conforme au niveau de référence attendu, face à ce patron, on ne peut écarter totalement l'hypothèse d'un biais d'analyse (mesures réalisées sur une même session de dosage) et il semble peu probable que ces niveaux globalement bas tracent une neurotoxicité généralisée et de faible niveau sur l'ensemble des sites pour l'ensemble des dates automnales.

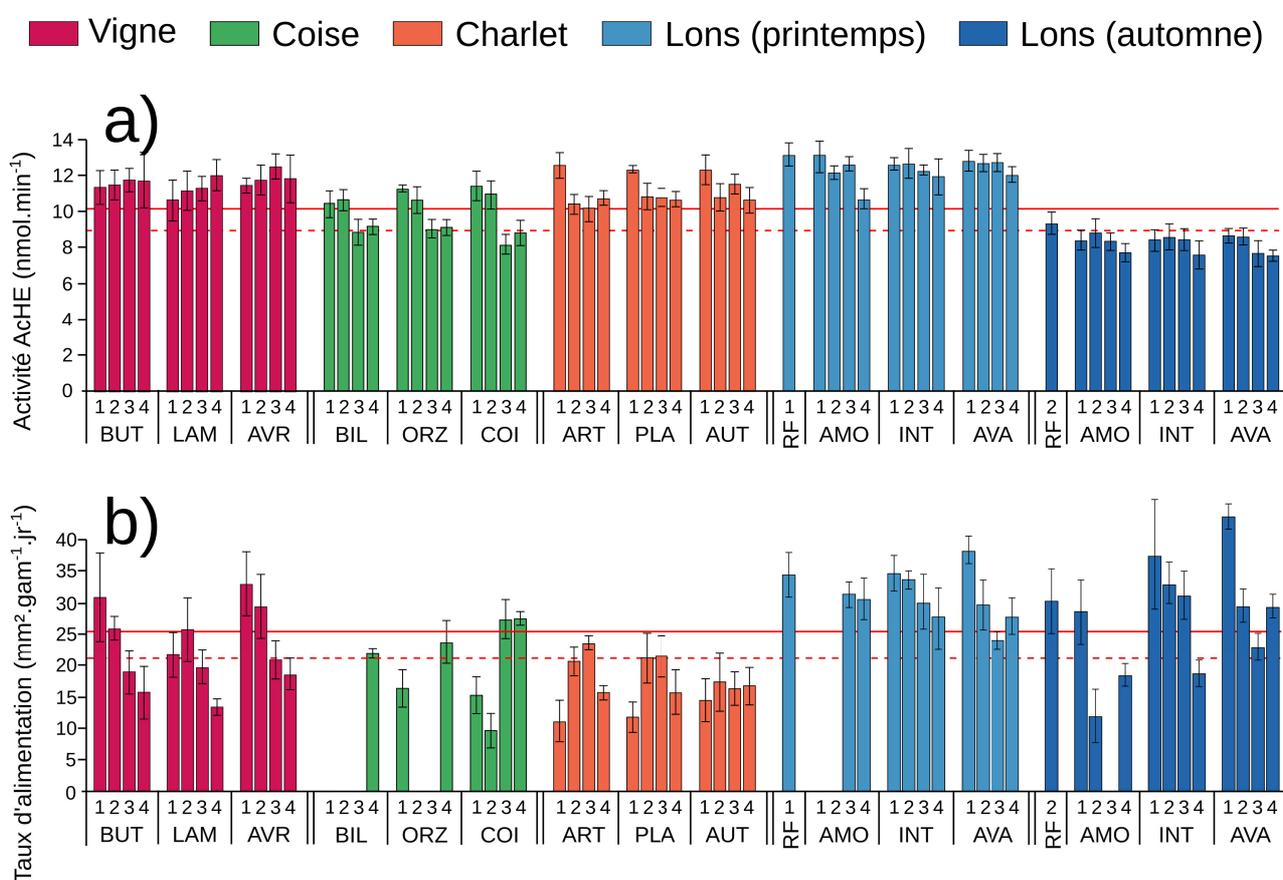


Figure 51 - Niveaux d'activité acétylcholinesterase AchE (a) et d'alimentation (b) (moyenne \pm ET, $n=5$) des gammares mâles enregistrés lors des 4 tests d'une semaine réalisés dans l'ensemble des stations et des campagnes. Ces niveaux sont corrigés pour l'effet de la température et de la taille des lots d'organismes utilisés. En rouge, niveau de référence attendu (trait plein) et seuil à 5 % (tirets).

A l'inverse, les tests d'inhibition alimentaire suggèrent une toxicité significative dans une majorité des stations étudiées. L'ensemble des stations de la Vigne (Lamblore en particulier) et du Charlet (y compris la station de référence) sont impactées selon cet indicateur, pendant au moins

une des quatre semaines d'exposition (Figure 51). Cette toxicité sur les 3 stations du site de la Vigne concerne les semaines 3 et 4 d'exposition et est plus marquée sur le site de Lamblore. Ces résultats sont cohérents avec les montées de débit en semaines 3 et 4. En revanche, les augmentations de concentrations en pesticides sur les 3 stations du bassin de la Vigne sont surtout notées en semaine 4, et l'Avre apparaît comme plus contaminé que les deux autres stations (Annexe 5 - Sources de la Vigne).

Pour le Charlet, la station Authezat s'avère invariablement toxique, alors que les épisodes de toxicité sur Plauzat et Artière ne concernent que les semaines 1 et 4 d'exposition. Ces résultats sont cohérents avec les débits et les sommes de concentrations en certains pesticides (tébuconazole, procymidone, en plus du métolachlore) plus élevés en semaines 1 et 4 sur la station de Plauzat (Annexe 5 - Charlet).

Les résultats sur le site de Lons-le-Saunier révèlent une toxicité automnale (pas d'inhibition au printemps) marquée sur la station Amont (forte inhibition en 2^{ème} et 4^{ème} semaines) et moindre sur la station Intermédiaire (légère inhibition en 4^{ème} semaine uniquement). Sur ce site, les résultats d'inhibition alimentaires ne peuvent pas être expliqués par les variations de débit ni par les valeurs de concentration des pesticides mesurés à la station Amont comparativement aux autres stations. Les débits et les concentrations de la campagne d'automne sur cette station Amont sont, par ailleurs, bien plus faibles qu'au printemps où aucune inhibition n'est observée, en dépit de très fortes concentrations en métolachlore sur toutes les stations en semaine 1 à cette saison (Annexe 5 - Lons-Le-Saunier). Les résultats d'inhibition alimentaires observés sur ce site laissent donc suspecter que d'autres éléments toxiques sont à incriminer, notamment à la station Amont, que ceux recherchés lors de nos campagnes de suivi.

Finalement, la perte de dispositifs sur le site de la Coise ne permet pas de conclure sur le cours d'eau de Bilaise, mais les résultats indiquent une toxicité sur les stations Orzon et Coise (i.e. les 2 stations les plus contaminées) comme en 2014 (Annexe 5 - Coise).

Les impacts sur la reproduction et le déroulé de mue pour l'exposition des femelles sont observés aux 2 saisons sur le site de Lons-le-Saunier. Un nombre d'ovocytes inférieur aux niveaux de référence ainsi qu'un retard de mue ont été observés sur les 3 stations de la Madeleine. Les impacts sont particulièrement importants au printemps et sur la station Amont, sur laquelle l'ensemble des indicateurs relatifs à la mue et la reproduction sont en deçà des valeurs de référence (Tableau 5, Figure 52). Pour l'automne, au-delà de la mauvaise survie des femelles sur l'ensemble des stations lors du déploiement du biotest, on constate aussi des retards de mue sur les 3 stations du site de Lons-le-Saunier avec un impact légèrement moins fort sur l'Aval (Tableau 5). Ici encore, les gradients de concentration amont-aval en pesticides observés sur la Madeleine ne permettent pas d'expliquer les plus forts effets observés sur la station Amont, même si elles sont plus cohérentes avec les différences saisonnières des expositions.

Comme au printemps, le fait que pratiquement l'ensemble des femelles qui n'ont pas atteint le stade C2 soit en retard de mue (i.e. désynchronisation de l'état gonadique, du développement embryonnaire et du stade de mue, cf *section méthodes*) indique une exposition à des substances perturbatrices des fonctions endocrines chez le crustacé sur le site de Lons-le-Saunier. On ne note que peu d'influence sur la production d'ovocytes à l'automne (Figure 52) et les données sur le

nombre d'embryons sont toutes en dessous des niveaux de référence (y compris sur la station de référence), ce qui semble indiquer une problématique de qualité du lot d'organismes utilisés lors de ce déploiement. Malheureusement, nous ne disposons pas de témoin qualité sur chaque lot d'expérimentation au sein de notre équipe de recherche sur cette période pour valider cette hypothèse.

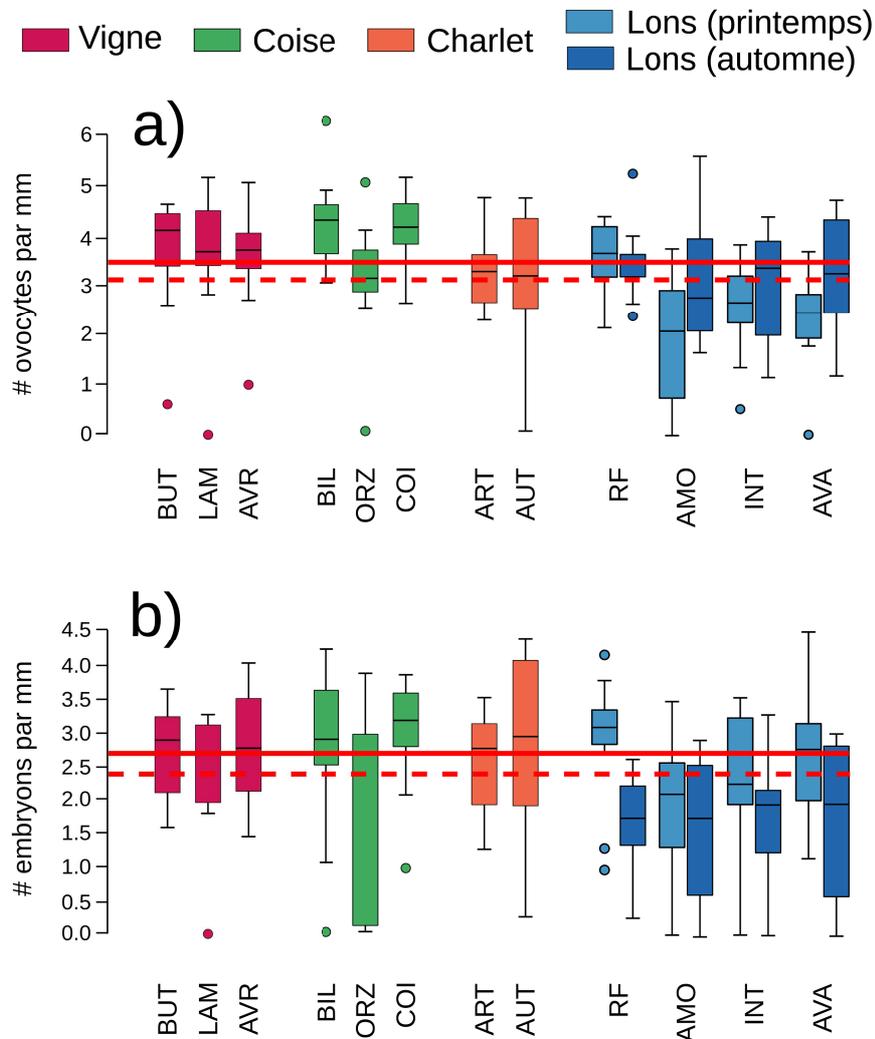


Figure 52 - Nombres d'ovocytes (a) et d'embryons (b) à la fin de l'exposition de 20 jours sur l'ensemble des stations et campagnes) ($n=15$). Ces niveaux sont corrigés par l'effet de la taille des femelles analysées. En rouge, niveau de référence attendu (trait plein) et seuil à 5 % (tirets).

Pour l'ensemble des autres stations étudiées, seule une reprotoxicité ponctuelle sur la station Orzon (site de la Coise) a été observée (nombre réduit d'embryons ; Figure 52). Toutefois, mis en regard des données de survie des femelles et des conditions de crue rencontrées lors de l'exposition,

ce résultat ne peut être attribué de façon univoque à un effet toxique de l'exposition, même si les concentrations en pesticides mesurés sont en général plus élevées sur cette station.

3.3 Marqueurs en développement

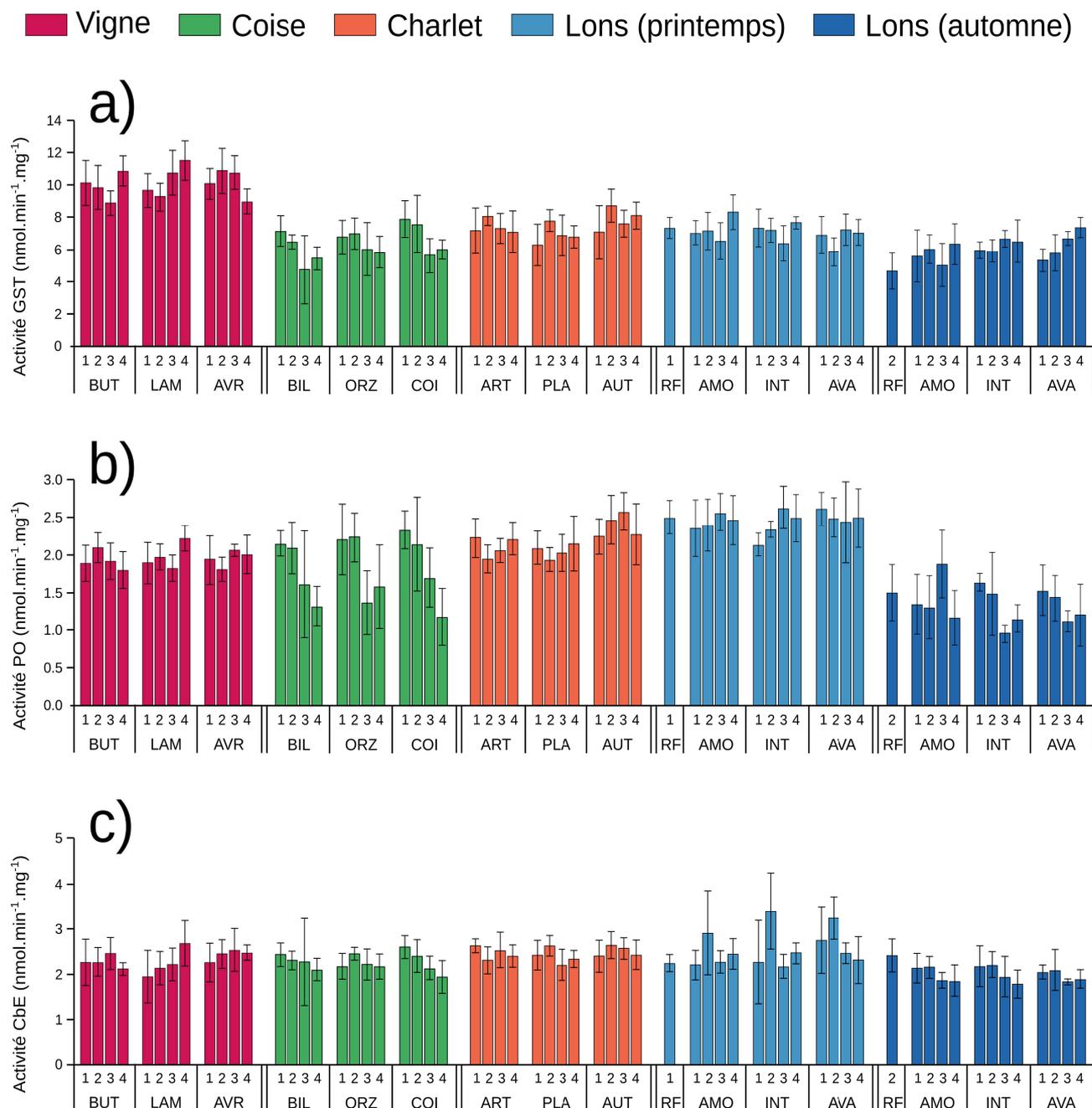


Figure 53 - Niveaux d'activité glutathion-s-transférase (GST) (a), de phenoloxidase (PO)(b) et carboxylesterase (CbE)(c) des gammarus mâles enregistrés lors des tests hebdomadaires réalisés sur l'ensemble des stations du projet (moy ± ET, n=5) exprimés par mg de masse fraîche.

Les résultats des mesures des biomarqueurs GST, PO et CbE sont analysés ici de façon globale sur l'ensemble des tests réalisés au cours du projet. Nous ne disposons pas, à l'heure actuelle, de recul sur la variabilité de ces biomarqueurs, par exemple en fonction des conditions de température ou en fonction du poids des lots d'organismes utilisés lors de chaque test, ceci se traduisant par l'absence de valeur de référence applicable de façon commune sur l'ensemble de ces mesures.

Concernant la GST (Figure 53a), on note un effet campagne, avec des niveaux plus élevés sur l'AAC de la Vigne et éventuellement plus faibles pour la campagne automnale sur Lons-le-Saunier. Ces résultats posent la question de l'effet température (l'AAC de la Vigne en conditions hivernales) ou encore un effet campagne de dosage.

Si on analyse les résultats intra-déploiement (même site, même date), on peut noter quelques modulations : par exemple des niveaux plus forts sur le Lamblore et le Buternay que sur l'Avre en semaine 4 pendant la période d'inhibition alimentaire, une induction sur la station Amont du site de Lons-le-Saunier en semaine 4 de la campagne printanière ou encore une induction au cours des 2 premières semaines sur la Coise.

Les mesures de PO (Figure 53b) présentent elles aussi un fort effet campagne : par exemple, des niveaux globalement hauts sur Lons-le-Saunier au printemps, globalement bas à l'automne. Cela repose aussi ici la question de l'influence du poids des organismes, de la répétabilité des protocoles d'analyse d'échantillons. Là encore, on peut tout de même noter des modulations quand on raisonne par comparaison intra-campagne, par exemple des niveaux relativement très hauts sur la station Amont du site de Lons-le-Saunier en semaine 3 de la campagne automnale.

Les résultats pour la CbE (Figure 53c) apparaissent beaucoup plus répétables entre campagnes. Une modulation intéressante peut être pointée, toujours sur l'AAC de Lons-le-Saunier, ici au printemps en semaine 2.

L'ensemble de ces résultats préliminaires sera par la suite analysé au regard de campagnes de dosages réalisés dans différents programmes en cours au sein de l'équipe d'INRAE et de suivi qualité sur les lots d'organismes utilisés depuis 3 ans environ, avec pour objectif une quantification des sources de variabilité liées à l'influence du poids des organismes, des conditions d'exposition comme la température, la répétabilité de la procédure de préparation et d'analyse des échantillons, et de permettre la définition de valeurs de référence à l'instar de celles développées pour l'ACHÉ ou l'alimentation.

3.4 Étude protéomique sur Lons-le-Saunier

Pour la première fois en écotoxicologie aquatique, la méthode Scout-MRM a pu être appliquée ici chez les gammarès mâles exposés sur l'AAC de Lons-le-Saunier pour la quantification à haut débit d'une liste de protéines clés de la physiologie de ce crustacé : 157 protéines de la reproduction, l'immunité, l'homéostasie et la détoxification ont pu être suivies (Faugère et al., 2020). Nous avons focalisé l'étude protéomique sur les échantillons des mâles exposés 20 jours sur l'AAC de Lons-le-Saunier lors de la campagne printanière au regard des effets toxiques détectés en termes de reprotoxicité. Des échantillons de mâles référence ont été ajoutés à l'analyse, correspondant aux organismes exposés lors de la deuxième exposition sur la Seille (biotest de reproduction également).

L'analyse différentielle des niveaux des 277 peptides rapporteurs correspondant au 157 protéines ciblées a permis d'identifier 10 peptides exprimés différemment entre sites de la Madeleine et de la Seille (Figure 71). Un peptide correspondant à des protéines annotées comme enzyme malique (peptide DIDAAFLVGAMPR) est surexprimé dans les organismes exposés dans les sites de la Madeleine. Cette enzyme a été décrite comme régulée par l'hormone juvénile chez les insectes (Farkas et al., 2002), voie ciblée par les insecticides juvéniles notamment. Parmi les peptides régulés à la baisse dans les organismes mis en cage dans les sites de la Madeleine, on retrouve 2 peptides appartenant à une endochitinase (EAFDTVGR et LVLGIPFYGR) et 2 peptides appartenant à une protéine annotée comme cellulase (SAMNVALIAFK et AADLGLDSTNRR). Les chitinases sont des enzymes clés pour la réalisation du processus de mue chez les arthropodes (Muthukrishnan et al., 2019).

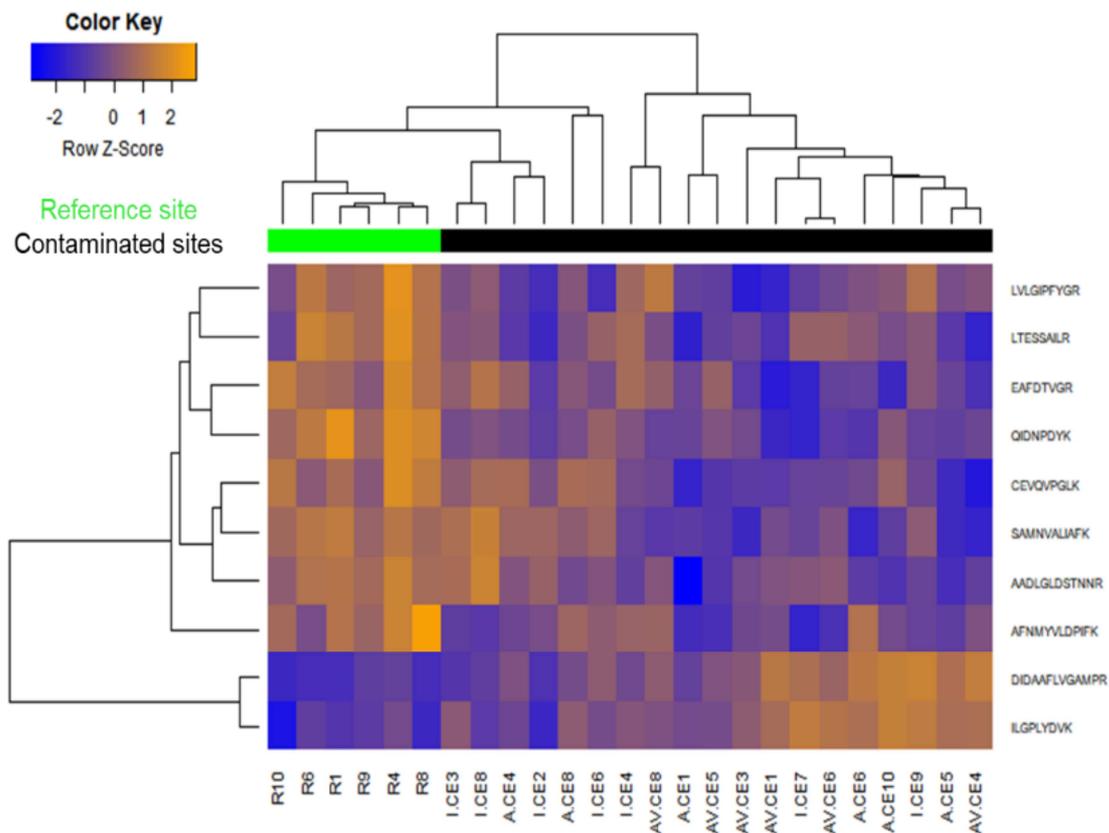


Figure 54 - Représentation heatmap des niveaux de 10 peptides différemment exprimés chez les gammarès mâles (mesures individuelles) lors des expositions de 20 jours dans le bassin de l'AAC de Lons-le-Saunier (3 stations sur la Madeleine : Amont A, Intermédiaire I, Aval AV) et dans la Seille (R). Les concentrations de ces peptides ont été mesurées par spectrométrie de masse lors d'un dosage multiplexé (Scout-MRM) ciblant un total de 277 peptides appartenant à 157 protéines choisies comme potentiels biomarqueurs d'impact de différentes fonctions biologiques.

L'inhibition constatée est ainsi à mettre en regard avec les forts retards de mue enregistrés sur l'AAC de Lons-le-Saunier. A noter que les chitinases d'autres crustacés ont déjà été signalées

comme des biomarqueurs sensibles aux insecticides et fongicides (Muthukrishnan et al., 2019). Les cellulases sont quant à elles essentielles pour la digestion chez *G. fossarum*. Enfin, un peptide régulé à la baisse (QIDNPDYK) appartient à la calréticuline, une protéine du réticulum endoplasmique hautement conservée de la famille des lectines. Elle est impliquée dans l'osmorégulation, le chaperonnage moléculaire et la réponse immunitaire chez les crustacés (Duan et al., 2014 ; Huang et al., 2016 ; Moshtaghi et al., 2017). La calréticuline a été proposée comme un biomarqueur de stress général dans des modèles *in vitro* et chez les vertébrés (Groebe et al., 2010).

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'approche moléculaire testée pour le dosage multiplexe de biomarqueurs protéiques chez *G. fossarum* permet de capter *via* une approche relativement large de screening (omique) une réponse biologique à l'exposition dans ce contexte de contamination d'origine agricole. Le nombre limité de peptides modulés dans les sites contaminés suggère une certaine spécificité de la réponse décrite en termes de mécanismes d'action des substances en cause lors de l'exposition. De futures études sont aujourd'hui programmées à l'échelle nationale pour appréhender la variabilité de ces biomarqueurs protéiques, leur signification fonctionnelle et leur lien avec les typologies de substances toxiques, afin d'avancer vers des outils de biomonitoring robustes, sensibles et spécifiques, donc informatifs sur la nature de la toxicité détectée lors de la mise en œuvre d'approche de biotests *in situ*.

4. La décomposition des litières et ses communautés microbiennes

4.1 Perte de masse des litières

Malgré la perte de 37 sacs à litières sur les 300 sacs déployés (sacs non retrouvés ou vides), le calcul des taux de décomposition, alors basé sur une seule date au lieu de 2, a été possible pour 148 répliques (au lieu de 150). Dans l'ensemble, les taux de décomposition des litières d'aulne se sont avérés plus élevés qu'attendu (fines mailles : 0,045 jour⁻¹ ; grosses mailles : 0,150 jour⁻¹) d'après la littérature, en particulier au printemps dans les sacs à grosses mailles. Cette différence saisonnière persiste lorsque les données de décomposition sont corrigées pour prendre en compte l'effet de la température (exprimés en degré-jours) (Figure 55). Dans la mesure où elle concerne essentiellement les sacs à grosses mailles, elle pourrait refléter l'appétence des litières introduites pour les consommateurs à une période de l'année pendant laquelle les ressources sont limitantes dans le cours d'eau. Du fait de cette variabilité saisonnière nous avons limité les analyses suivantes à des analyses intra-saisonnières en excluant les données de la campagne d'automne.

Ces résultats montrent une inhibition de la décomposition des litières (Figure 55). En adéquation avec de précédentes études (Brosed et al., 2016), l'effet de l'exposition aux pesticides semble n'avoir affecté que la décomposition des litières dans les sacs à grosses mailles, tandis que la décomposition dans les sacs à fines mailles semble peu impactée. Ceci suggère un plus fort effet des pesticides sur les fonctions assurées par les macro-invertébrés que sur les fonctions microbiennes, et illustre la capacité des communautés microbiennes à développer une tolérance aux contaminations par les phytosanitaires, exploitée notamment dans le cadre de l'outil PICT. Il est à noter que les concentrations en fongicides, molécules à même de compromettre sévèrement la décomposition

microbienne, étaient relativement faibles (et comparativement moins recherchées) dans l'ensemble des stations d'étude, par rapport aux herbicides. Par ailleurs, la toxicité établie selon les Unités Toxiques *Daphnia*³ ne reflète pas nécessairement la toxicité du mélange pour les micro-organismes hétérotrophes, pour lesquels les données de toxicité des phytosanitaires sont trop rares à ce jour pour permettre le calcul d'Unités Toxiques.

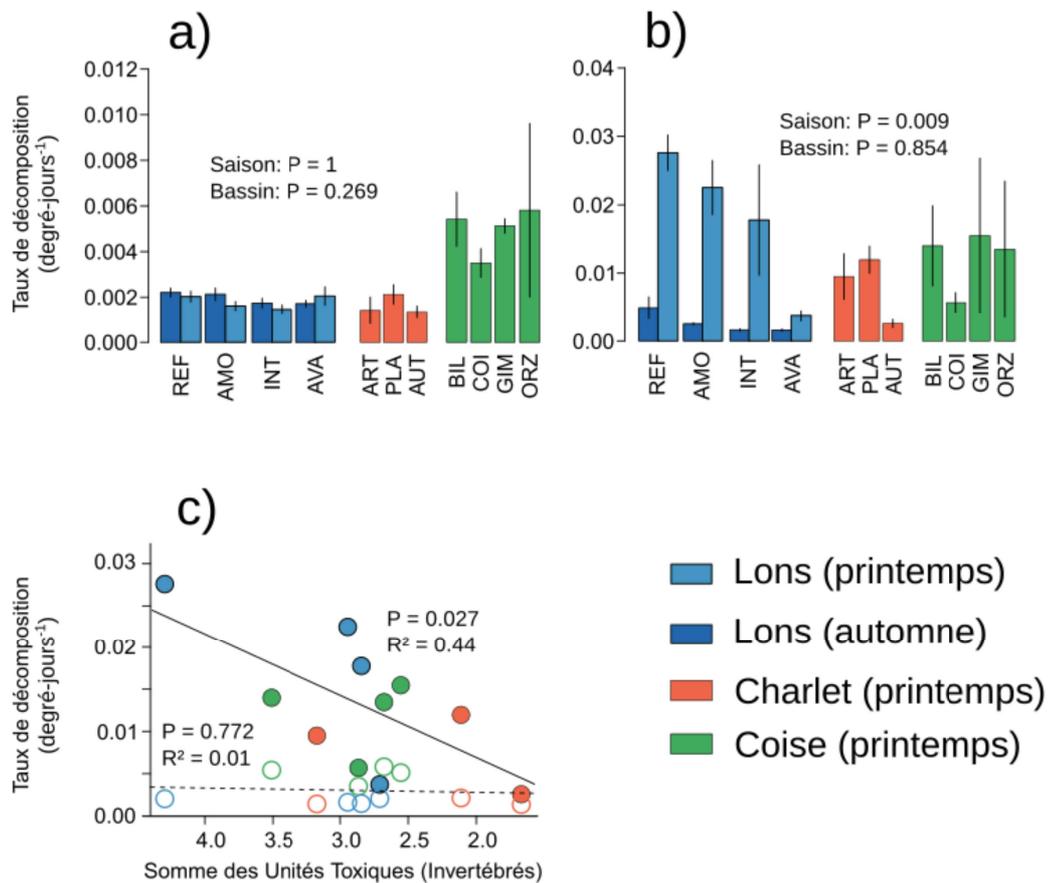


Figure 55 - Taux de décomposition dans les sacs à litières fines mailles (a) et grosses mailles (b) dans les différents cours d'eau (moyenne \pm ET) aux différentes saisons. Les statistiques sont les résultats d'un test de Kruskal et Wallis. Le panel (c) montre la relation entre la décomposition dans les sacs à fines (trait pointillé – cercles colorés) et grosses (trait plein – disques colorés) mailles au printemps le long du gradient de pesticides, quantifié par la somme des unités toxiques (basées sur les NOEC) pour *Daphnia magna*. Les statistiques correspondent aux corrélations de Pearson.

Ces résultats restent toutefois très encourageants et suggèrent que le processus de décomposition des litières constitue un outil performant pour le diagnostic des impacts fonctionnels des contaminations des cours d'eau par les pesticides (Figure 55c). Les résultats d'Impact-CE ont permis de mettre en évidence de fortes variations saisonnières, sans doute liées à des variations de

3 Voir la définition et le mode de calcul au chapitre V section 3.3 (page 109)

débit, de la disponibilité en ressources alternatives dans le cours d'eau, ou encore de variations saisonnières dans la densité des invertébrés détritivores. Le développement de la décomposition des litières comme outil de bioindication passe donc par une meilleure définition des conditions d'application de la méthode (saison, conditions hydrologiques) et une meilleure compréhension des variations saisonnières de ce processus.

4.2 Communautés d'hyphomycètes aquatiques associés aux litières

La production de conidies par les hyphomycètes associés aux litières d'aulne des cours d'eau étudiés (2 à 717 conidies produites par jour et mg de litière) est globalement faible par rapport aux données de la littérature (de l'ordre de 1000 ou davantage). Cela peut être dû aux débits importants qui ont entraîné la fragmentation des parties du limbe les plus fragiles, par ailleurs les plus susceptibles de supporter une communauté fongique active.

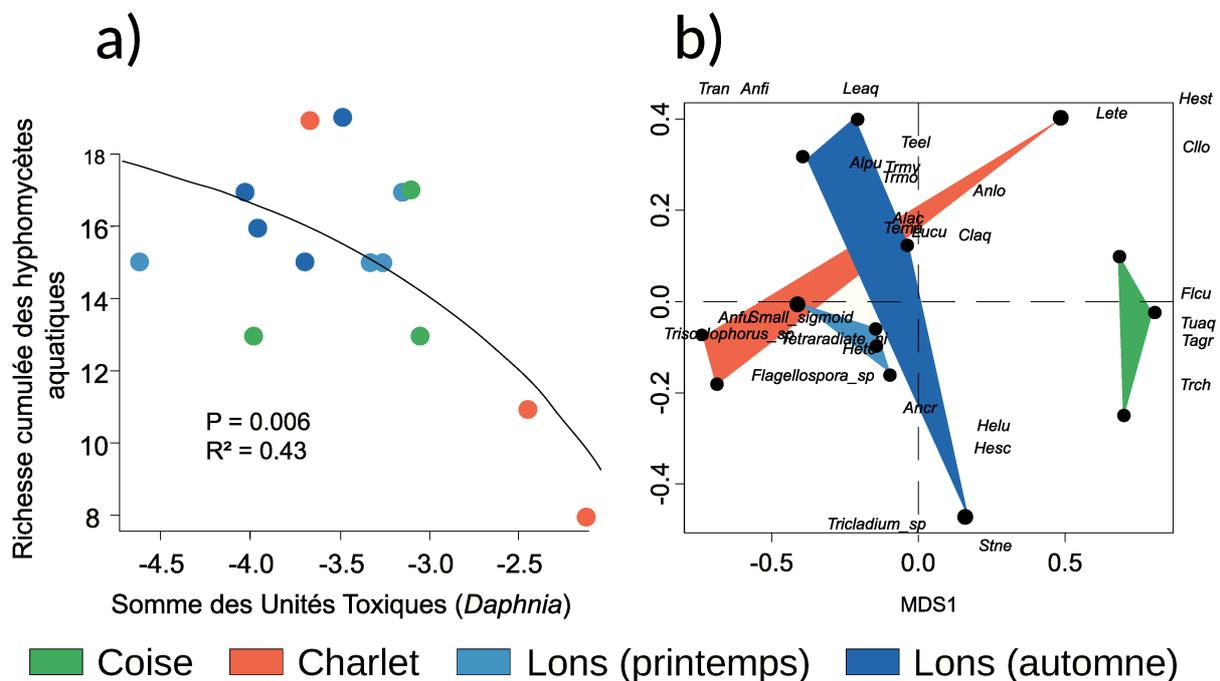


Figure 56 - a) Relation entre la richesse spécifique des hyphomycètes aquatiques associés aux litières (richesse cumulée entre répliques et dates) et la contamination par les pesticides. Les statistiques sont des corrélations de Pearson et la courbe de tendance a été modélisée selon un modèle inverse. b) N-MDS sur la densité relative de chaque espèce dans les différentes stations. La projection des espèces est donnée en utilisant les abréviations spécifiées dans la Table 1. Pour les espèces 'hors cadre' la position sur le plan factoriel correspond à la projection – le long des axes – sur le bord du cadre le plus proche.

De plus, les taux de sporulation présentent généralement un pic à des stades de décomposition intermédiaires, après quoi ils déclinent. Dans le contexte des expériences d'Impact-CE (taux de décomposition très élevés associés à une fragmentation importante) la faiblesse des taux de sporulation n'est pas surprenante.

Tableau 6 - Abondance relative des espèces et morpho-espèces observées dans les 3 bassins-versants. 0 : absent, • < 5 %, + : entre 5 et 10 %, ++ : entre 10 et 50 %, +++ > 50 %.

Species	Code	Charlet	Coise	Lons A	Lons P
<i>Alatospora acuminata</i>	Alac
<i>Alatospora pulchella</i>	Alpu	.	0	0	.
<i>Anguillospora crassa</i>	Ancr
<i>Anguillospora filiformis</i>	Anfi	.	0	.	.
<i>Anguillospora furtiva</i>	Anfu	.	0	.	.
<i>Anguillospora longissima</i>	Anlo	.	.	.	0
<i>Fusarium sp?</i>	Small_sigmoid	++	.	++	++
<i>Clavariopsis aquatica</i>	Claq
<i>Clavatospora longibrachiata</i>	Cllo	++	+	0	.
<i>Flagellospora sp?</i>	Flagellospora_sp	.	0	.	.
<i>Flagellospora curvula</i>	Flcu	++	++	.	.
<i>Geniculospora inflata</i>	Gein	0	0	.	0
<i>Heliscella stellata</i>	Hest	.	.	0	.
<i>Heliscella stellataculla</i>	Hesc	.	++	+++	++
<i>Heliscus lugdunensis</i>	Helu
<i>Heliscus tentaculus</i>	Hete	0	0	.	.
<i>Lemonniera aquatica</i>	Leaq	.	0	.	.
<i>Lemonniera terrestris</i>	Lete	.	.	.	0
<i>Lunulospora curvula</i>	Lucu	0	.	.	.
<i>Stenoclaadiella neglecta</i>	Stne	0	0	.	0
<i>Taeniospora gracilis</i>	Tagr	0	.	0	0
<i>Tetrachaetum elegans</i>	Teel	.	.	.	0
<i>Tetracladium setigerum</i>	Tese	.	0	0	.
<i>Tetracladium marchalianum</i>	Tema	++	.	.	.
Tettradié non identifié	Tettradiate_ni	.	.	.	+
<i>Tricladium angulatum</i>	Tran	.	0	.	.
<i>Tricladium chaetocladium</i>	Trch	0	.	0	0
<i>Tricladium sp?</i>	Tricladium_sp	0	0	0	.
<i>Tricladium splendens</i>	Trsp	0	0	0	.
<i>Tripospermum myrtii</i>	Trmy	0	0	.	0
<i>Triscelophorus monosporus</i>	Trmo	0	0	.	0
<i>Triscelophorus? sp</i>	Triscelophorus_sp	0	0	0	.
<i>Tumularia aquatica</i>	Tuaq	.	.	0	.
Richesse spécifique		22	18	23	23

Les taux de sporulation n'ont pas pu être mis en relation ni avec la contamination par les pesticides (Unités Toxiques calculées à partir des NOEC⁴), ni avec aucun autre paramètre physico-chimique. Un effet positif de l'ammonium (qui peut être utilisé par les champignons comme source d'azote) a été trouvé à 14 jours ($P = 0,001$; $R^2 = 0,62$), mais s'est avéré non significatif lorsqu'un seul site (Gimond), présentant de fortes concentrations en ammonium et des taux de sporulation comparativement importants, était exclus de l'analyse.

En revanche, la richesse spécifique des hyphomycètes aquatiques associés aux litières est raisonnablement élevée, avec entre 8 et 19 espèces (listées dans le Tableau 6) observées par cours d'eau (richesse cumulée entre répliques et dates de prélèvement). Cette richesse est négativement corrélée à la contamination par les pesticides (Unités Toxiques *Daphnia*) (Figure 56), mais cet effet est statistiquement indissociable d'une relation négative entre richesse fongique et concentration en nitrates ($p < 0,001$; $R^2 = 0,56$). Quel que soit le mécanisme sous-jacent, il se trouve donc que la richesse spécifique (mais pas l'activité de sporulation) des hyphomycètes aquatiques associés aux litières répond de manière négative aux impacts agricoles, caractérisés par un ensemble de pressions simultanées comprenant les concentrations en pesticides et en nutriments. En termes de composition spécifique des communautés, la plus grande part de la variabilité est expliquée par les différences entre sites (39,7 % des variations) (Figure 56), tandis que le gradient de pesticides n'en explique qu'une part relativement faible (12,7 %). Aucune espèce particulière ne s'est avérée présenter un quelconque potentiel indicateur.

4.3 Biomasse fongique

La biomasse fongique observée dans le cadre du projet (17,5 – 101,1 µg par g de litière ; figure 57a,b) ne varie ni entre sites ni entre saisons, mais semble diminuer le long du gradient de contamination par les pesticides (figure 57c) tel que mis en évidence par les unités toxiques *Daphnia*⁵. Ce résultat souligne une résistance probable des processus microbiens (décomposition microbienne des litières, sporulation), qui se maintiennent malgré un impact négatif des pesticides sur la diversité et la biomasse des champignons aquatiques. Toutefois, l'interprétation de ces résultats est soumise à caution puisque les données de toxicité *Daphnia* ne rendent pas nécessairement compte de la toxicité du milieu pour les champignons. L'établissement d'un référentiel des effets toxiques des pesticides sur les fonctions fongiques (inexistant à ce jour) améliorerait clairement notre capacité à établir des relations entre concentrations en pesticides et processus fongiques. Par ailleurs, l'interprétation des données d'ergostérol, qui varie le long du processus de décomposition, mais aussi selon la composition spécifique des communautés fongiques, reste toutefois délicate et ne permet pas toujours d'inférer sur les mécanismes sous-jacents aux résultats obtenus.

4 Voir la définition et le mode de calcul au chapitre V section 3.3 (page 109)

5 Voir la définition et le mode de calcul au chapitre V section 3.3 (page 109)

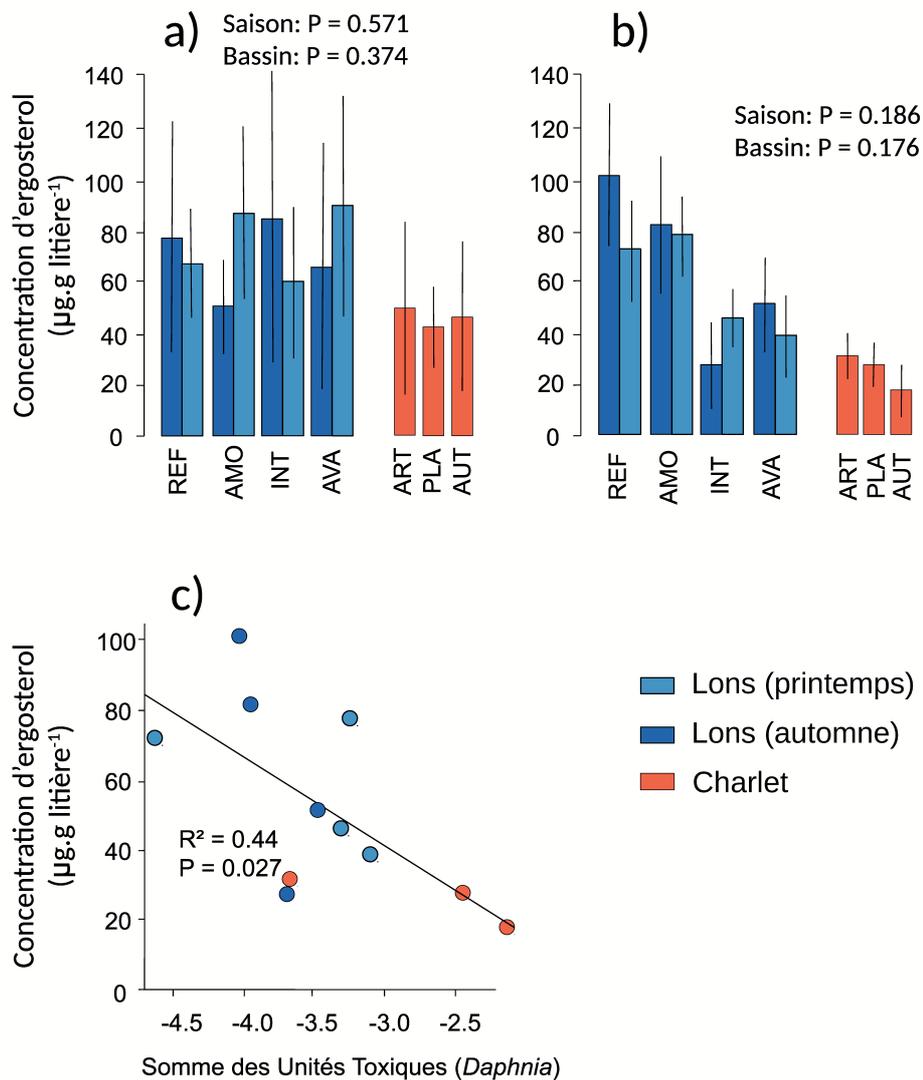


Figure 57 - Concentration d'ergostérol (moyenne \pm ET) associée aux litières à la première (a) et la deuxième (b) date de prélèvement dans les bassins de l'AAC de Lons-le-Saunier (vert) et du Charlet (bleu) aux deux saisons (hachuré : automne, plein : printemps). Les valeurs de P sont les résultats de tests de Kruskal et Wallis sur les valeurs moyennes. (c) présente la relation entre la concentration d'ergostérol moyenne (date 2) et la toxicité liée aux pesticides (somme des unités toxiques).

4.4 Structure des communautés bactériennes

L'ensemble d'échantillons correspondant à Lons-le-Saunier (printemps et automne 2017) et Charlet (printemps 2017) a été analysé. En ce qui concerne la Coise (printemps 2018), trop peu de matériel foliaire a pu être récupéré en raison d'une forte abrasion des litières (débit important) et l'analyse a dû être abandonnée pour ce site.

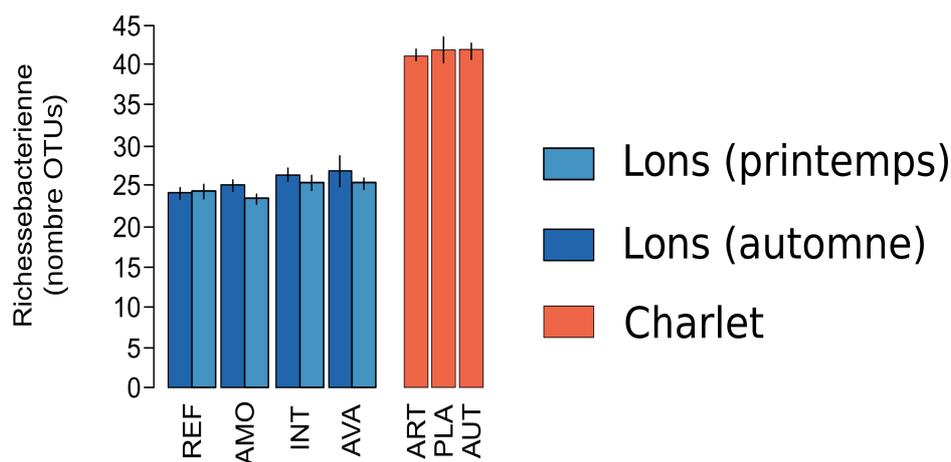


Figure 58 - Richesse d'OTUs du gène 16S RNA (moyenne +/- SE) associés aux litières provenant des sacs à fines mailles dans les 2 bassins-versants et pour les 2 saisons.

La richesse d'OTUs basée sur la méthode utilisée (PCR-DGGE) renseigne essentiellement sur les espèces dominantes, et sous-estime la contribution des espèces rares à la diversité bactérienne associée aux litières. Cette richesse est globalement similaire à celles rencontrées dans la littérature pour le même type de substrat (Rossi et al., 2017). Comparativement, la richesse en OTUs des communautés du site du Charlet (41,7 +/- 0,2 OTUs) est supérieure à celle des communautés du site de Lons-le-Saunier (25,2 +/- 0,4 OTUs) (Figure 58), ceci pouvant être expliqué par les différences en conditions environnementales entre les deux sites. Cependant, l'absence de variations des valeurs de richesse d'OTUs entre stations d'un même site ne permet pas de mettre en évidence un quelconque effet du gradient de contamination (exprimée en unités toxiques *Daphnia*⁶).

En revanche, l'analyse de similarité sur la structure des communautés bactériennes associées aux litières montre clairement un fort effet saison, suivi d'un effet site, et finalement un effet de gradient amont-aval (Figure 59). La structure des communautés bactériennes est très divergente ($r < 5\%$ de similarité) entre printemps (Lons-le-Saunier et Charlet) et automne (Lons-le-Saunier), tandis que les différences entre sites pour une même saison (automne) sont moins importantes (Lons-le-Saunier vs Charlet, $r = 33,5\%$). Au printemps, les communautés des stations situées en amont des sites de Lons-le-Saunier et du Charlet (Référence et Amont) se distinguent de celles des stations situées vers l'aval des sites ($r = 62,7\%$). En automne, les différences entre les stations situées en amont (Référence, Amont) et en aval (Intermédiaire, Aval) du site de Lons-le-Saunier sont nettement supérieures ($r = 7,4\%$) à celles rencontrées au printemps sur le même site.

6 Voir la définition et le mode de calcul au chapitre V section 3.3 (page 109)

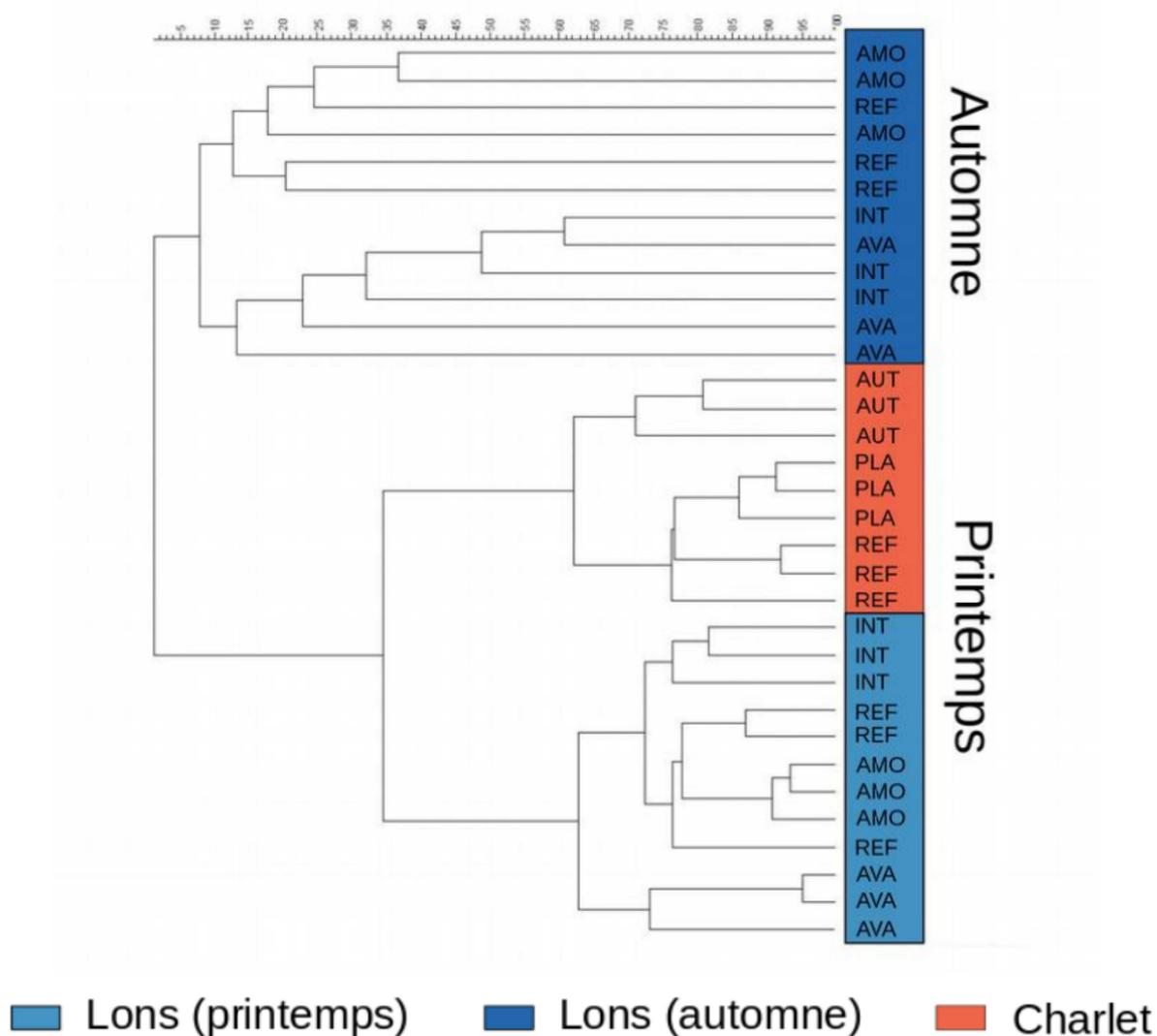


Figure 59 - Analyse de similarité (corrélation de Pearson) entre les profils DGGE obtenus pour le gène 16S rRNA sur les différentes stations du bassin de l'AAC de Lons-le-Saunier (automne et printemps) et Charlet (printemps) à la deuxième date de prélèvement (4 semaines d'incubation des litières).

Bien qu'elle reste peu importante, la modification de la structure des communautés bactériennes des litières pourrait contribuer à la mise en évidence de contaminations par les pesticides dans les deux sites étudiés. L'approche utilisée pour analyser la structure des communautés bactériennes dans cette étude (PCR-DGGE) est semi-quantitative et ne reflète pas exactement l'abondance relative des OTUs retrouvées. Pour compléter ces données, un séquençage type NGS sur le gène 16S rRNA aurait été utile pour mieux explorer la diversité des espèces bactériennes rares associées aux litières en décomposition.

4.5 Activités enzymatiques

L'ensemble des échantillons correspondant aux campagnes de Lons-le-Saunier (printemps et automne 2017) et Charlet (printemps 2017) a été analysé. En ce qui concerne le site de la Coise (printemps 2018), trop peu de matériel foliaire a pu être récupéré en raison d'un débit trop important et l'analyse a dû être abandonnée. Bien qu'il y ait une certaine variabilité dans les 5 activités enzymatiques testées (cellobiohydrolase, β -glucosidase, β -xylosidase, laccase, phenoloxidase) d'un cours d'eau à l'autre (Figure 60a,b), ces variations ne reflètent pas clairement la contamination des cours d'eau par les pesticides.

Une relation marginale se dessine, avec une inhibition des activités phenoloxidase (pour T1, $P = 0,06$, $R^2 = 0,33$) et laccase (pour T2, $P = 0,07$, $R^2 = 0,33$) par la contamination par les pesticides (Unités Toxiques *Daphnia*). Il n'est pas clair si ces relations reflètent un réel effet de la contamination, ou par exemple un effet confondant de la disponibilité en azote qui régule par ailleurs leur activité (Waldrop et al., 2004).

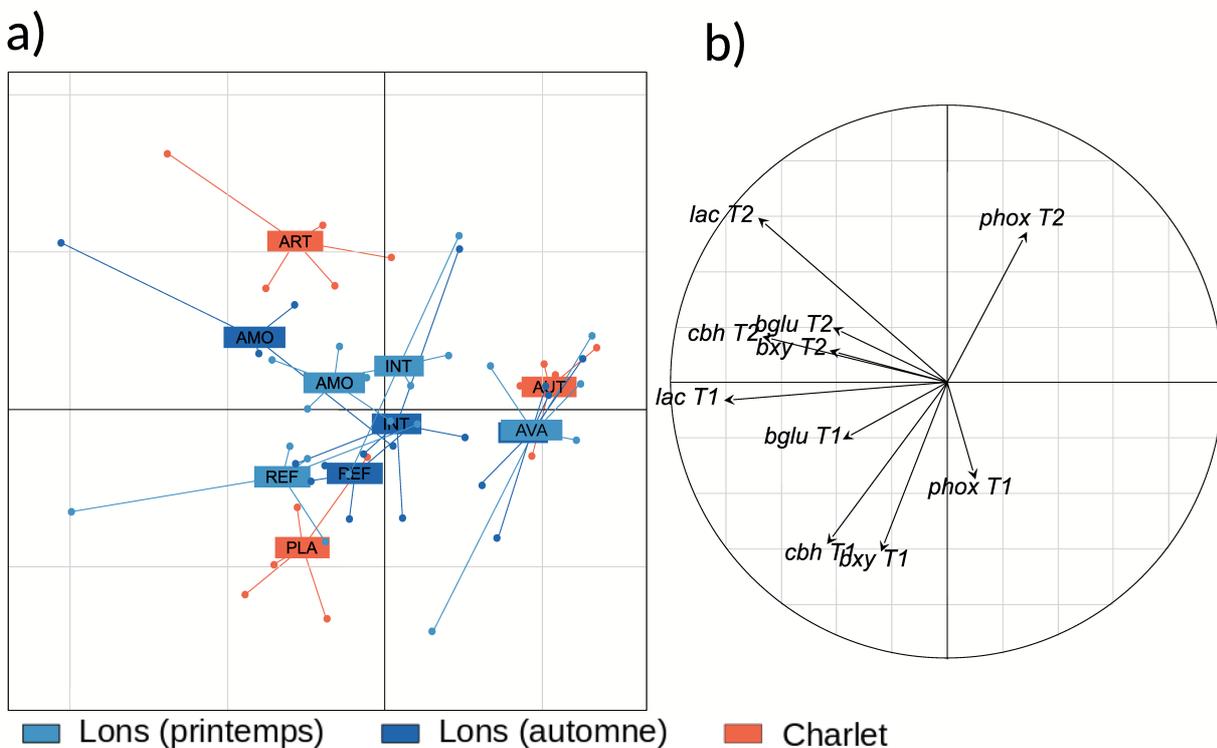


Figure 60 - ACP sur les activités enzymatiques (Lons-le-Saunier et Charlet) à la première (T1) et deuxième (T2) date de prélèvement, avec la répartition des stations sur le premier plan factoriel (a), le cercle des corrélations des variables (b). *phox* : Phenoloxidase, *cbh* : Cellobiohydrolase, *bglu* : β glucosidase, *lac* : laccase, *bxy* : β -xylosidase.

Sur les sites de Lons-le-Saunier et du Charlet, les activités enzymatiques les plus faibles ont été observées sur les cours d'eau situés les plus en aval (Authezat et la station Aval du site de Lons-le-Saunier), dénotant potentiellement une inhibition des activités enzymatiques le long d'un gradient

de pression agricole. On note que les données utilisées lors du projet sont rapportées à la masse de litière. Le calcul d'activités microbiennes spécifiques (i.e. rapportées à la biomasse fongique et bactérienne) auraient permis davantage de précision.

5. Une alternative aux litières naturelles : la décomposition de substrats artificiels

5.1 Perte de résistance des bandes de coton

Une grande partie des bandes de coton initialement déployées n'a pas pu être exploitée en raison d'une dégradation trop importante (73 bandes récupérées sur 140). Si aucune donnée n'est ainsi disponible sur le site de la Coise, des taux de dégradation ont néanmoins pu être calculés sur les 2 autres sites. Dans l'ensemble, et en accord avec les données de décomposition des litières, la dégradation des bandes de coton sur nos sites (ca. 6 % perte de résistance par jour au printemps) (Figure 61) s'est avérée plus rapide qu'attendu d'après les données de la littérature (en moyenne 1,7 % par jour d'après Tiegs et al., 2013).

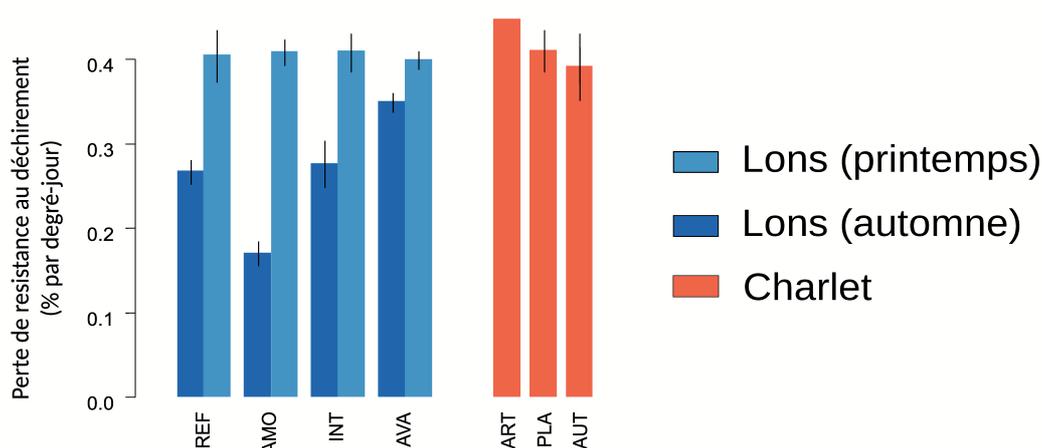


Figure 61 - Dégradation des bandes de coton (exprimée en % de perte de résistance par degré-jour) dans les 2 bassins-versants et pour les 2 saisons.

Aucune relation entre la perte de résistance des bandes de coton et la contamination par les pesticides n'a pu être mise en évidence. Étant donnée la perte d'une grande partie des données, la puissance statistique associée aux tests est toutefois faible. La dégradation des bandes de coton est plus importante au cours du printemps. Toutefois, les différences saisonnières sont moins prononcées que pour la dégradation des litières. Cela appuie le fait que l'activité des invertébrés (qui ne sont pas ou peu impliqués dans la dégradation des bandes de coton) est au moins en partie responsable de l'importante décomposition des litières au printemps. La perte de nombreuses bandes de coton suggère que le protocole devra être adapté pour limiter les risques. Les facteurs pouvant maximiser les chances de récupérer les bandes de coton incluent une meilleure définition des conditions de déploiement (éviter les zones ou périodes de courants importants), une réduction

du temps d'exposition, l'utilisation de bandes de coton plus larges ou encore leur disposition à l'intérieur de sacs à litière.

5.2 Décomposition des tablettes

L'évaluation de la décomposition des substrats artificiels immergés s'est révélée difficile dans certains cas, du fait d'une très forte perte de masse, notamment dans les sacs à larges mailles. Cette perte de masse apparaissait principalement due au frottement des substrats contre les sacs plutôt qu'à l'activité biologique. Des améliorations techniques sont nécessaires pour limiter le frottement des substrats contre les sacs et pouvoir évaluer la décomposition microbienne de ces substrats dans l'eau de surface.

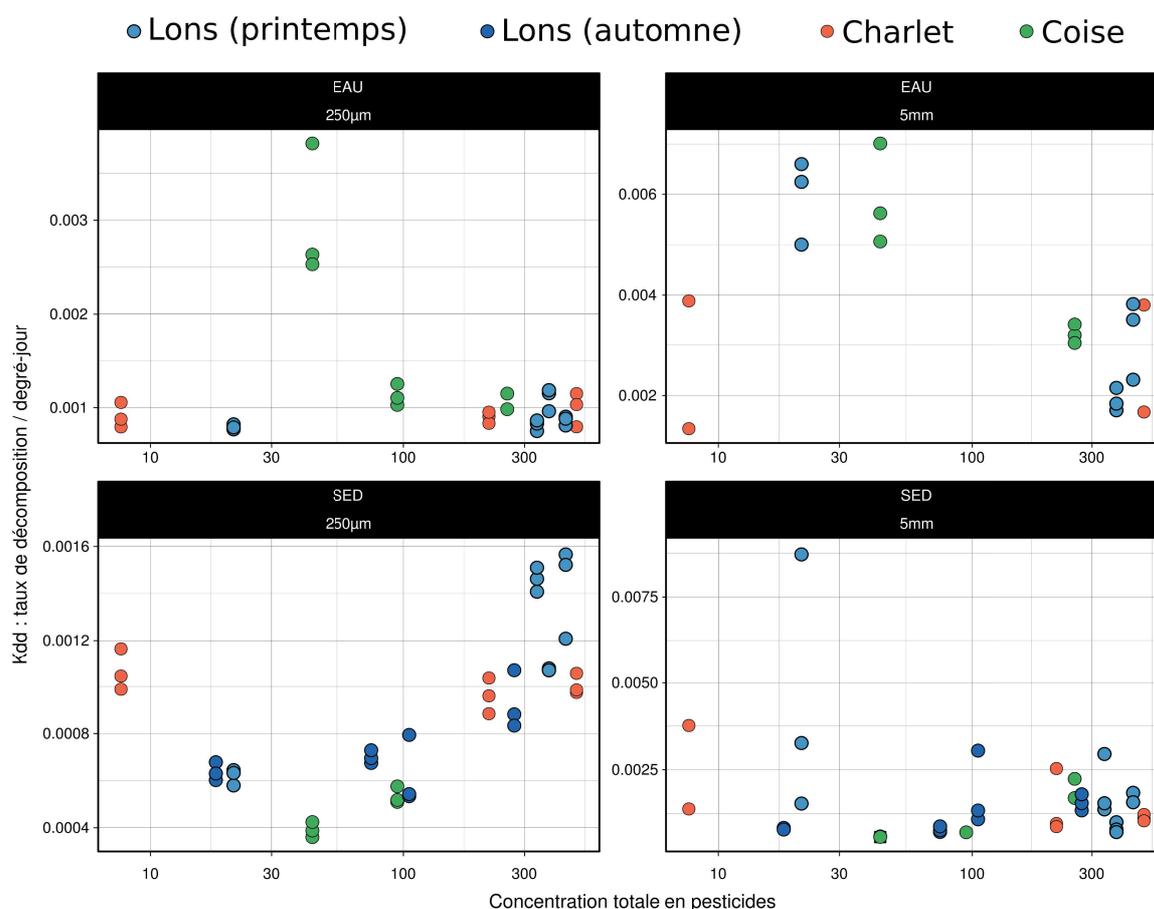


Figure 62 - Taux de décomposition (/degrés-jours) des substrats artificiels placés dans des sacs de mailles fines (250 µm) ou larges (5 mm) et immergés dans l'eau de surface (en haut) ou enfouis dans les sédiments (en bas).

Les substrats artificiels enfouis dans les sédiments ne subissent pas l'abrasion de l'eau et fournissent une information intéressante sur la capacité des communautés microbiennes et d'invertébrés à décomposer la matière organique. Ainsi, en rassemblant les résultats obtenus sur les différents sites, nous avons pu observer une réponse bimodale de la décomposition microbienne le long du gradient de contamination symbolisé par la concentration totale en pesticides (Figure 62). Il

semblerait qu'à partir d'un certain seuil, le taux de décomposition microbien augmente lorsque la concentration en pesticides augmente. Cela pourrait s'expliquer par une plus forte teneur en matière organique, souvent concomitante d'une augmentation de la contamination.

6. Communautés et traits fonctionnels des invertébrés benthiques : I_2M_2 et Outil de Diagnostic Invertébrés (ODI)

La note I_2M_2 , calculée pour chaque campagne (Lons-le-Saunier printemps et automne, Coise et Charlet), varie entre sites et stations. La variabilité saisonnière est plus limitée, et concerne essentiellement la station Aval du site de Lons-le-Saunier (Figure 63a). L'ensemble des cours d'eau autour de Lons-le-Saunier (de la référence aux stations les plus impactées) est caractérisé par des notes I_2M_2 élevées les plaçant dans des bons voire très bons états écologiques.

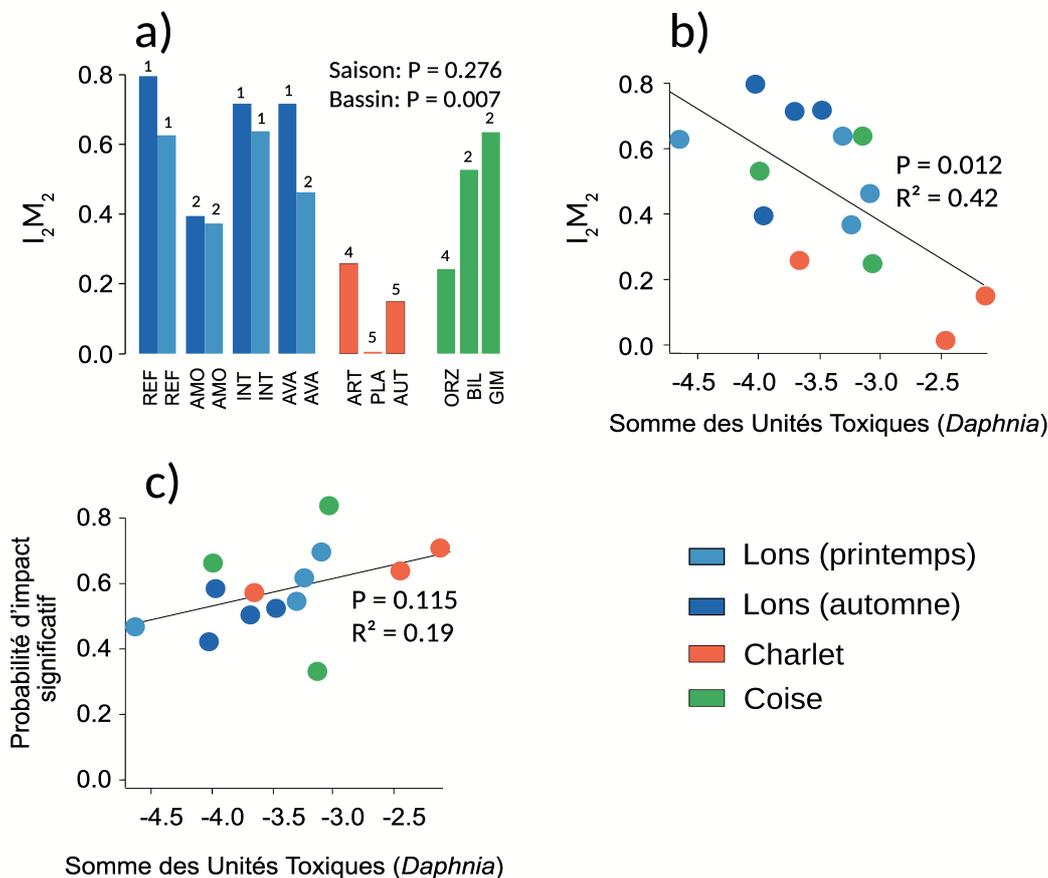


Figure 63 - a) Notes I_2M_2 dans les différents cours d'eau et aux différentes saisons. Le chiffre au-dessus des barres indique la classe de qualité correspondante (1 = très bon état ; 2 = bon état ; 3 = état moyen, 4 = état médiocre ; 5 = état mauvais). b) Variation des notes I_2M_2 et c) Probabilité de pression significative par les pesticides le long du gradient de contamination par les pesticides (Unités Toxiques *Daphnia*).

A l'inverse, les cours d'eau du Charlet apparaissent tous en mauvais ou très mauvais état écologique, y compris le cours d'eau de référence, ce résultat pouvant en partie être dû aux conditions d'étiage particulières lors de la période du prélèvement.

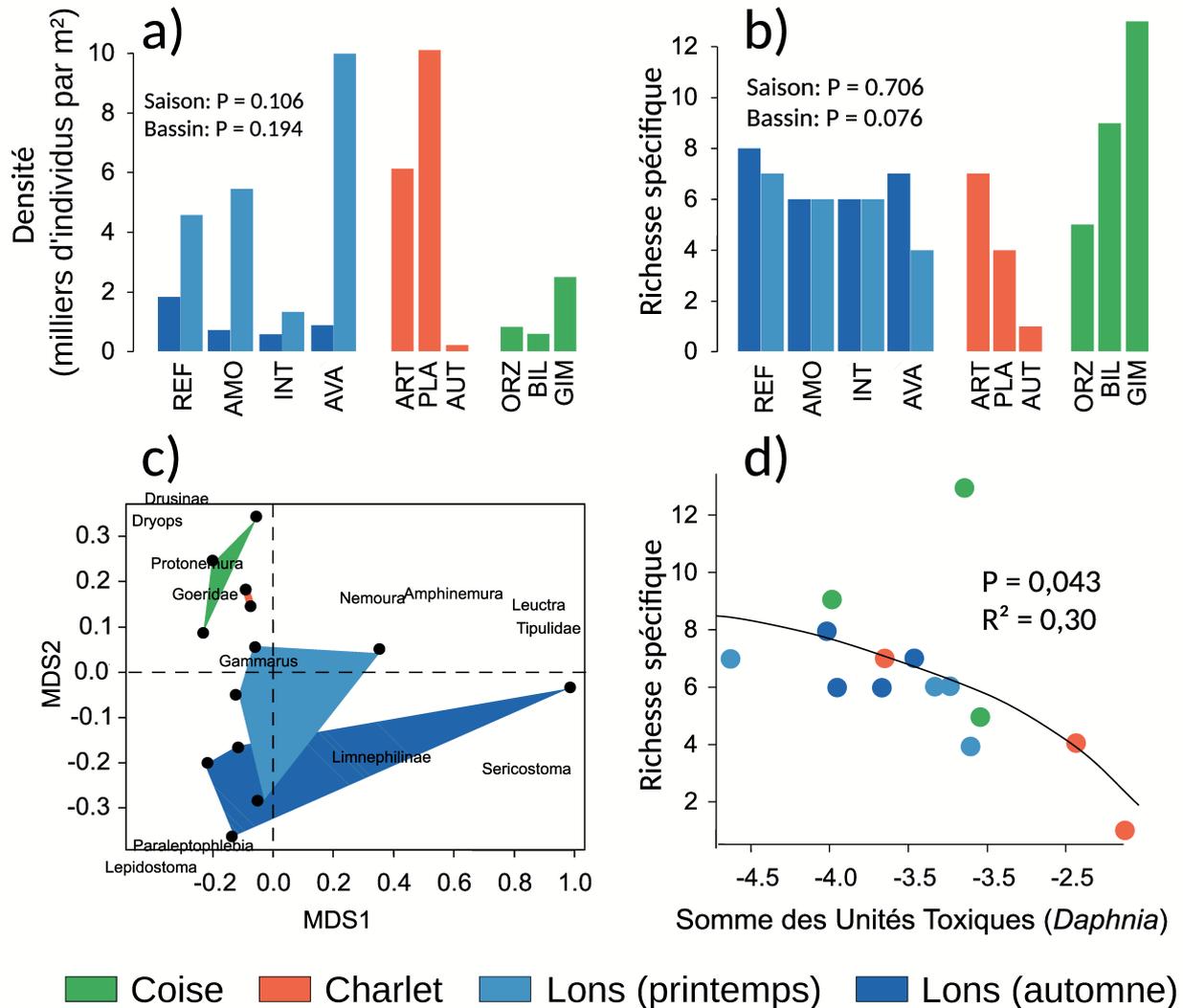


Figure 64 - a) Densité des invertébrés décomposeurs dans les différentes stations et pour les deux saisons. b) Effet de la contamination par les pesticides sur la richesse taxonomique des invertébrés décomposeurs. c) Composition des communautés dans les différentes stations et saisons illustrée par le premier plan factoriel d'une analyse MDS (Multidimensional Scaling) et d) Relation entre richesse spécifique des détritivores et niveau de contamination par les pesticides. Pour a) et b) les statistiques sont les résultats de tests de Kruskal-Wallis, et pour d) d'une corrélation de Pearson. La ligne de tendance est un modèle inverse. En c) la position des espèces 'hors cadre' sur le plan factoriel correspond à la projection – le long des axes – sur le bord du cadre le plus proche.

Les stations de la Coise sont intermédiaires, avec 2 stations en bon état et une en mauvais état (la plus contaminée par les pesticides par ailleurs) (Figure 63a). La valeur de l'I₂M₂ est

négativement corrélée au niveau de contamination par les pesticides (Unités Toxiques *Daphnia*⁷). Cette relation est renforcée si seuls les prélèvements de printemps sont considérés (Figure 63b). L'indicateur de pression « pesticides » n'apparaît pas corrélé de manière significative à la pression mesurée par le biais des unités toxiques ($P = 0,160$, Figure 63c). On note toutefois une nette amélioration de la relation après exclusion de la station Gimond ($P = 0,026$; $R^2 = 0,37$). Ce manque de robustesse peut également tenir aux concentrations de pesticides relativement élevées dans les stations de référence ; ainsi l'ensemble des stations apparaît comme ayant une probabilité assez forte de contamination par les pesticides. La relation aurait sans doute été plus claire en prenant en compte un gradient de contamination plus important, par exemple avec des stations de référence moins contaminées.

La densité et la composition spécifique des communautés d'invertébrés détritivores prélevés dans le cadre du protocole I₂M₂ varient considérablement d'un cours d'eau à l'autre (Figure 64a,b) et d'une saison à l'autre, avec une densité plus importante au printemps. Cette saisonnalité est liée au cycle de vie des invertébrés détritivores et pourrait expliquer en partie les pertes de masse de litière plus importantes au printemps. Les prélèvements de printemps correspondent à une période où une partie des larves d'insectes n'a pas encore émergé, mais où l'éclosion des juvéniles de crustacés (gammare et aselles) a déjà eu lieu, générant des densités importantes de détritivores. La densité des détritivores ne semble pas affectée par la contamination par les pesticides. En revanche, la richesse spécifique de ces organismes pourrait décroître le long du gradient de contamination (Figure 64b,d). Encore une fois, la relation est plus claire si seules les données de printemps sont considérées.

7 Voir la définition et le mode de calcul au chapitre V section 3.3 (page 109)

V. SYNTHÈSE DE TOUS LES RÉSULTATS ACQUIS ET ANALYSE GLOBALE

1. Objectif et présentation de l'ensemble des données du projet Impact-CE

L'objectif principal de cette partie est d'analyser *via* des approches statistiques multivariées l'ensemble des données générées par les partenaires scientifiques du projet responsables de chaque outil. Plus précisément, cette analyse a pour objectifs : (i) de dresser un bilan de la contamination en pesticides sur l'ensemble des stations étudiées, (ii) d'analyser et hiérarchiser la sensibilité des indicateurs biologiques mis en place sur l'ensemble des stations et (iii) d'expliquer la variation des indicateurs biologiques par les paramètres abiotiques et/ou biotiques mesurés dans le cadre de ce projet. De manière indirecte, les analyses mises en œuvre permettent de mettre en avant les complémentarités et/ou redondances des réponses des outils (paramètres chimiques d'une part et paramètres biologiques d'autre part).

Pour répondre à ces objectifs, les données générées par l'ensemble des partenaires du projet sur chaque site ont été collectées et regroupées. Le jeu de données sur lequel ont été réalisées les analyses statistiques est présenté de façon synthétique en Figure 65.

Le jeu de données prend en compte les quatre sites étudiés (Charlet, Coise, Lons-le-Saunier et Vigne) ainsi que les deux campagnes d'échantillonnage réalisées pour le site de Lons-le-Saunier (LonsC1 pour la campagne d'échantillonnage réalisée au printemps et LonsC2 pour la campagne d'échantillonnage réalisée en automne). Au total, 19 stations ont été analysées. Sur l'ensemble des stations, 47 principaux paramètres ont été mesurés et peuvent se regrouper en deux catégories :

- Les paramètres abiotiques liés aux analyses chimiques de l'eau (pesticides, ions majeurs, métaux)
- Les paramètres biotiques qui représentent les indicateurs biologiques et fonctionnels des communautés de micro/macro-invertébrés et des communautés microbiennes lotiques et des sédiments

Enfin, deux caractéristiques du jeu de données sont à prendre en compte pour une analyse statistique globale. La première est que tous les paramètres n'ont pas été mesurés sur l'ensemble des stations. C'est notamment le cas pour le site de la Vigne où tous les paramètres biologiques n'ont pas pu être analysés en raison des difficultés techniques rencontrées sur le site (absence d'eau dans la rivière) ou de certains paramètres mesurés mais finalement non exploitables (certaines mesures PICT notamment) (Figure 65). L'autre particularité du jeu de données est la différence du nombre d'observations selon les paramètres analysés (Figure 65). De nombreux paramètres comportent 1 observation par campagne d'échantillonnage (31 paramètres avec 1 mesure/campagne). A l'inverse, certains paramètres comme la concentration en pesticides dans les TSP ou l'inhibition alimentaire chez le gammare comportent 4 observations par campagne d'échantillonnage.

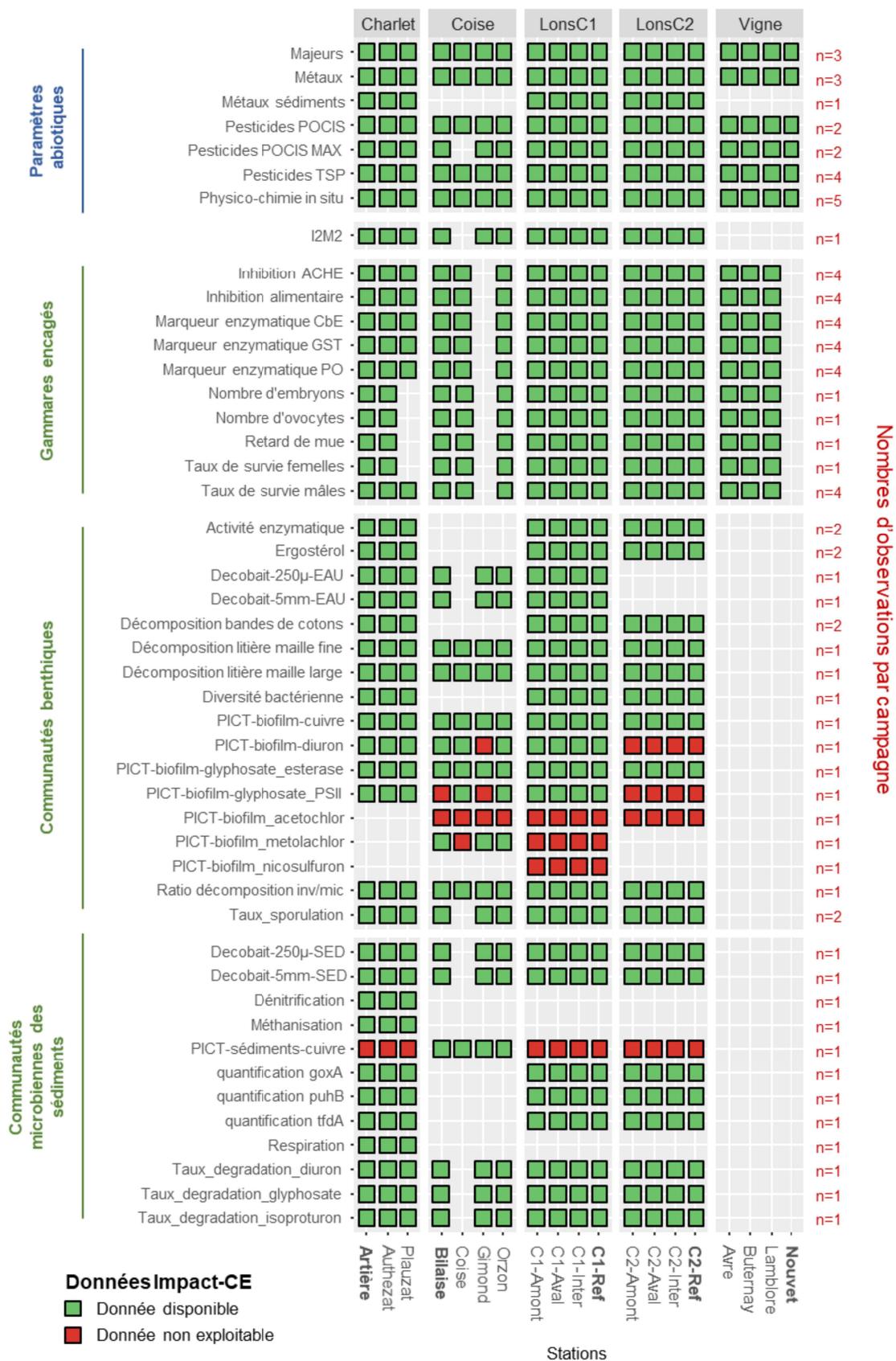


Figure 65 - Graphique présentant l'ensemble des paramètres mesurés dans le cadre du projet Impact-CE par site d'étude (bassin-versant) et par station. Les stations de référence sont représentées en gras.

2. Démarche analytique et approches statistiques

En tenant compte des spécificités du jeu de donnée, l'analyse statistique globale a été déclinée en trois volets analytiques (Figure 66). Le premier consiste en l'analyse des paramètres abiotiques et plus particulièrement des données de concentration en pesticide issues des trois échantillonneurs passifs mis en place dans ce projet (TSP, POCIS et POCIS-MAX). Le deuxième volet porte sur la variation des indicateurs biologiques mis en place sur l'ensemble des sites. Enfin, dans un troisième volet, plusieurs approches statistiques sont utilisées (analyse multiple des corrélations, partition de variance, analyse en réseaux) pour analyser le lien entre la variation des paramètres abiotiques et celle des paramètres biotiques sur l'ensemble des sites.

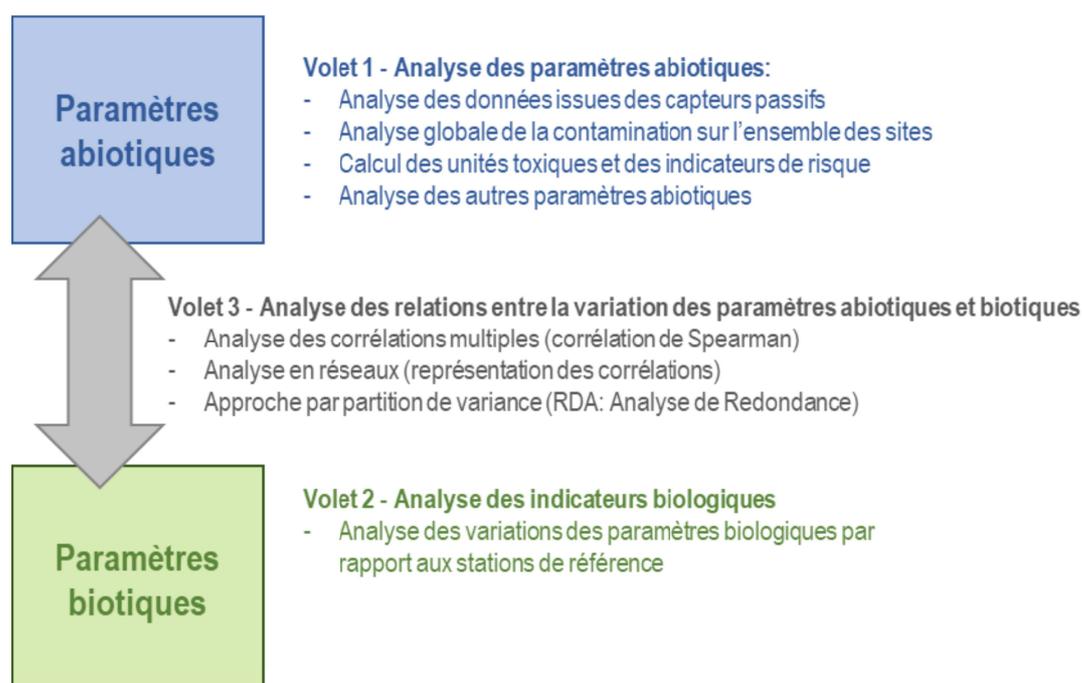


Figure 66 - Représentation schématique des différentes analyses statistiques réalisées sur les données du projet Impact-CE.

3. Volet 1 - Analyse des paramètres abiotiques

3.1. Analyse des données issues des échantillonneurs passifs

On rappelle que les données issues des échantillonneurs passifs se présentent de la façon suivante :

- 23 molécules de pesticides sont analysées sur les TSP sur 4 périodes d'exposition pendant la campagne d'échantillonnage (1 mesure par semaine)
- 41 molécules de pesticides sont analysées sur les POCIS sur 2 périodes d'exposition pendant la campagne d'échantillonnage (1 mesure toutes les deux semaines)

- 17 molécules de pesticides sont analysées sur les POCIS-MAX sur 2 périodes d'exposition pendant la campagne d'échantillonnage (1 mesure toutes les deux semaines).

La liste des molécules analysées par échantillonneur est présentée en Annexe 4. Parmi les molécules analysées, 15 molécules de pesticides sont analysées en commun entre les TSP et les POCIS. Au total, 66 molécules de pesticides différentes ont été analysées dont 9 fongicides, 11 insecticides et 46 herbicides. Pour simplifier et homogénéiser notre jeu de données, la concentration moyenne de chaque molécule a été calculée par échantillonneur et par campagne d'échantillonnage sur l'ensemble des stations. Lorsque la concentration d'une molécule était inférieure à la limite de quantification (<LQ), la concentration de la molécule a été remplacée par la limite de quantification divisée par deux (LQ/2).

Les résultats, présentés en Figure 67, montrent que plusieurs molécules de pesticides analysées sont retrouvées au sein des stations avec des concentrations allant de 0,01 ng.L⁻¹ à 236 ng.L⁻¹ pour la molécule de métolachlore. Certaines des molécules analysées sont ubiquistes, c'est notamment le cas du tébuconazole (fongicide), du métolachlore (herbicide) et de l'insecticide imidaclopride (insecticide). A l'inverse, d'autres molécules sont spécifiques du site analysé. Par exemple, les molécules cyproconazole et diméthoate ont été seulement détectées sur le site du Charlet (Figure 67). L'analyse des profils de concentrations montre que la contamination en pesticide a été moins importante sur les stations de référence de chaque site (nombre de molécules détectées et concentration moins importants).

Nos résultats montrent également des différences importantes de concentration entre les molécules détectées en commun par les TSP et POCIS. C'est notamment le cas du métolachlore et du diuron dont les concentrations étaient plus faibles dans les POCIS. Au regard des différences de concentrations observées pour ces deux molécules, une analyse plus fine des concentrations sur les 15 molécules analysées en commun a été réalisée pour évaluer les différences de « sensibilité » entre ces deux échantillonneurs.

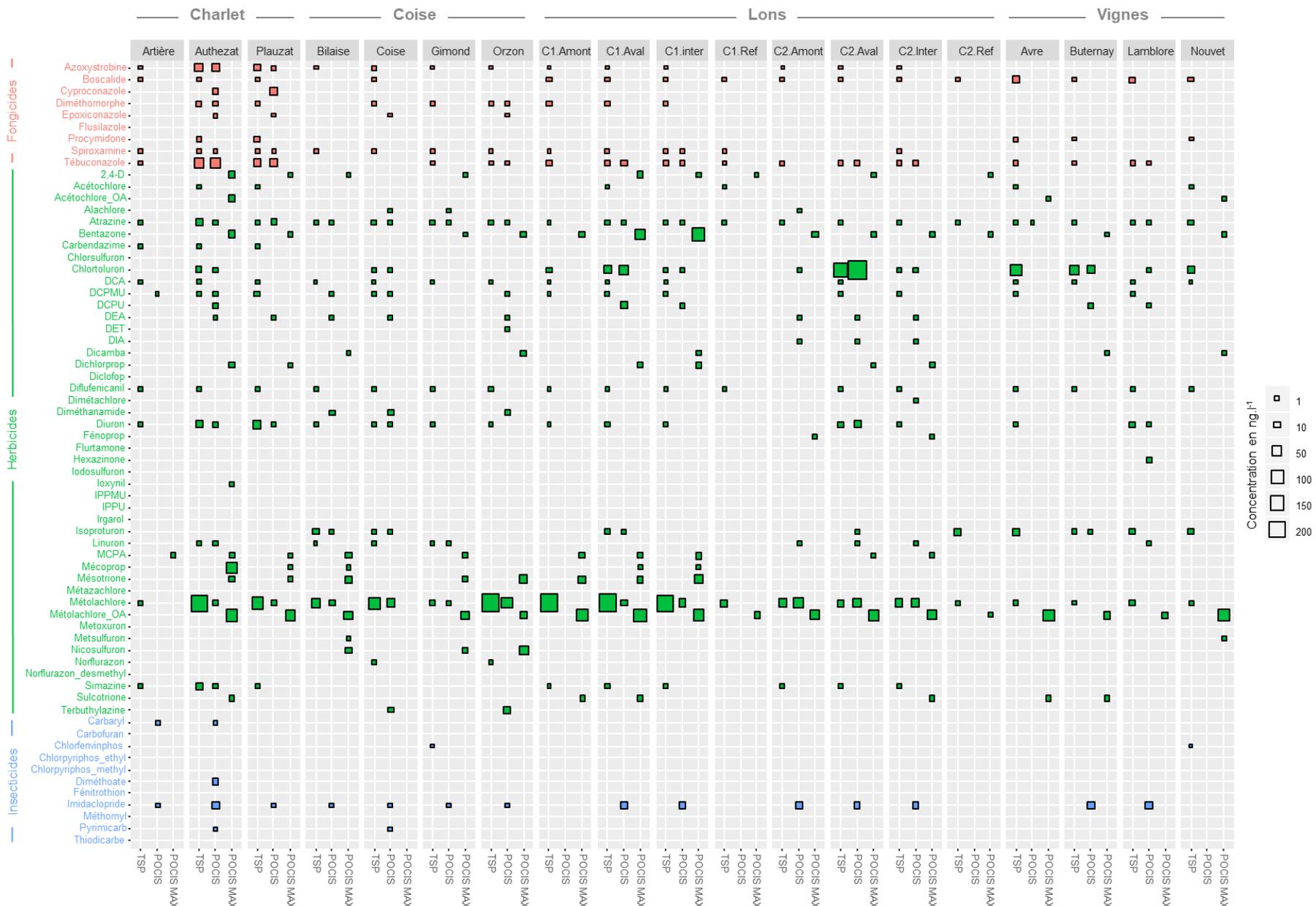


Figure 67 - Profil de concentration des molécules de pesticides analysées à partir des trois échantillonneurs passifs sur l'ensemble des stations.

Pour cette analyse et en raison du nombre différent d'observations entre les deux échantillonneurs (2 et 4 observations/campagne pour POCIS et TSP, respectivement), la concentration d'une molécule détectée dans le POCIS pendant les deux premières semaines d'exposition a été comparée à la moyenne des concentrations de cette même molécule détectée dans le TSP pendant la première et la deuxième semaine d'exposition. De plus, étant donné que les seuils de détection entre les deux échantillonneurs passifs sont différents, la limite de détection la plus élevée entre les deux échantillonneurs a été choisie pour analyser la quantification d'une molécule. Par conséquent, les molécules dont la concentration était inférieure à la limite de quantification maximale n'ont pas été prises en compte dans notre analyse. Au total, l'analyse a été réalisée sur 157 concentrations de molécules et est présentée en Figure 68.

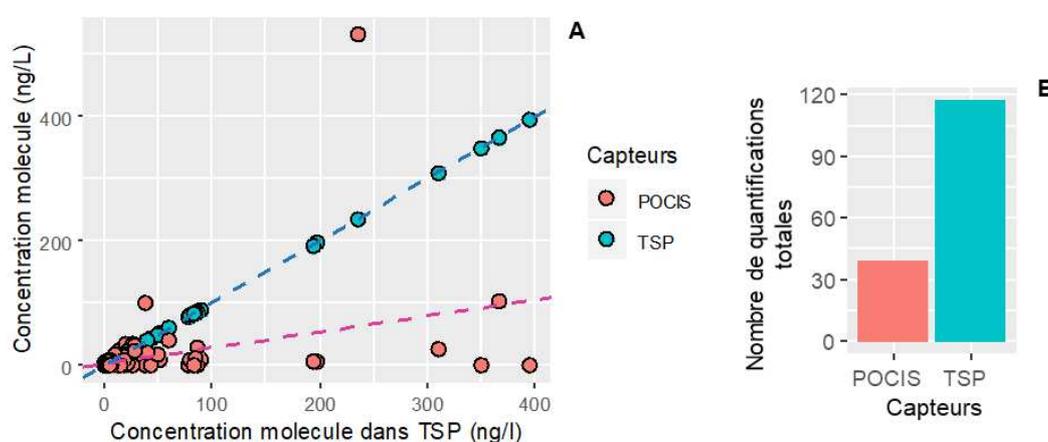


Figure 68 - (A) Analyse des concentrations des molécules détectées dans le POCIS par rapport à la concentration des molécules détectées dans le TSP et (B) nombre de quantifications total (tous sites confondus) par échantillonneur pour lesquelles la concentration est supérieure à la LQ la plus élevée (différentes LQ entre méthodes d'analyse).

L'analyse montre que les concentrations des molécules estimées par les POCIS sont, en moyenne, 3,7 fois moins importantes que les concentrations estimées par les TSP (Figure 68A). Cette différence de concentration peut s'expliquer par le fait que les valeurs de concentration des POCIS n'ont pas pu être corrigées par les taux d'échantillonnage *in situ*. En effet ces derniers n'ont pas pu être estimés du fait d'une vitesse de courant trop faible. Il est probable que ces faibles vitesses aient été induites par les cagettes dans lesquelles étaient disposés les POCIS. Des études ultérieures ont préconisé le déploiement des POCIS dans des pochettes grillagées interférant moins avec l'hydrodynamique du cours d'eau tout en garantissant une certaine protection des membranes (Bernard 2018).

3.2. Analyse globale de la contamination sur l'ensemble des sites

Malgré les différentes caractéristiques techniques des trois échantillonneurs (logKow des molécules piégées, durée d'exposition, limite de quantification), la somme des concentrations moyennes en pesticides des trois échantillonneurs a été utilisée comme proxy d'un indicateur de contamination en pesticides sur l'ensemble des sites. Pour les molécules en commun entre les TSP et POCIS, une concentration moyenne pour chaque molécule entre échantillonneurs a été calculée.

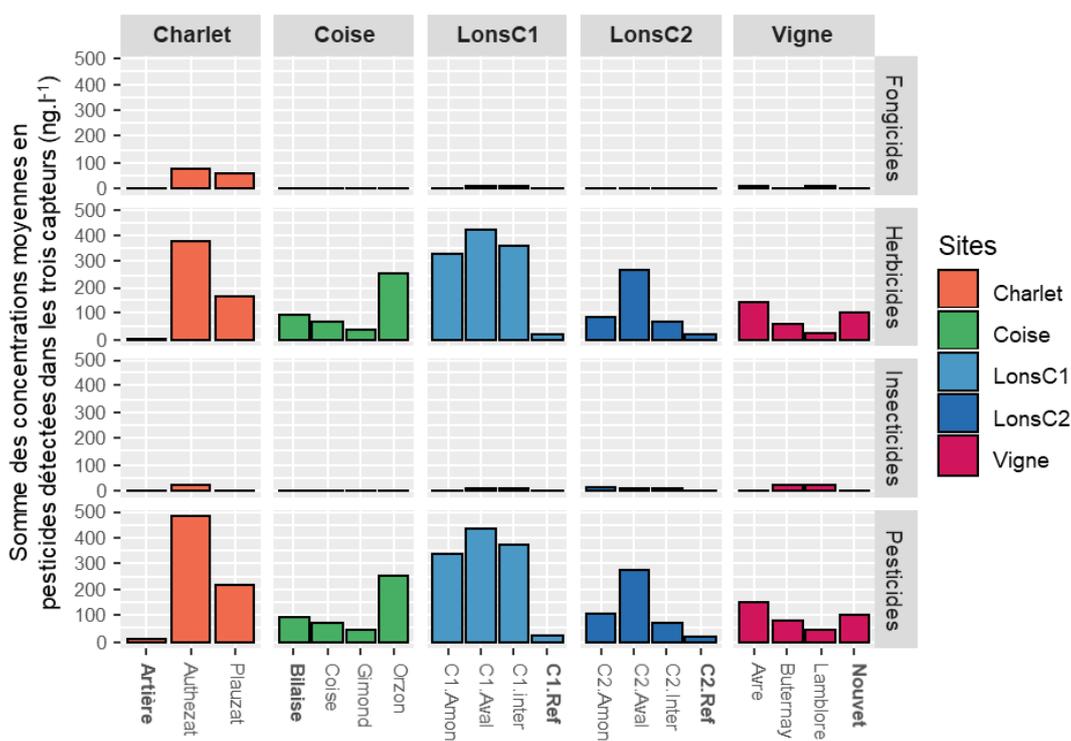


Figure 69 - Histogrammes représentant les concentrations totales de pesticides et de leurs classes (fongicides, herbicides et insecticides) sur l'ensemble des stations de chaque site. Les stations de référence sont représentées en gras.

Les résultats présentés en Figure 69 montrent que la concentration totale en pesticides varie de 7,65 ng.L⁻¹ pour la station d'Artière (site du Charlet) à 480,65 ng.L⁻¹ pour la station d'Authezat (site du Charlet). Les stations de référence ont été les moins contaminées en pesticides sur 3 des 5 sites. Parmi les molécules de pesticides analysées, la concentration des molécules appartenant à la classe des herbicides a été la plus importante, représentant en moyenne 89 % de la concentration totale en pesticide sur l'ensemble des stations.

En plus de la concentration totale en pesticide, le nombre de molécules de pesticides détectées sur l'ensemble des stations a été analysé (Figure 70). Bien que la liste des molécules ne soit pas exhaustive, cette information permet d'avoir une image de la diversité des pesticides rencontrés sur les sites. Pour les molécules analysées en commun entre les TSP et POCIS, nous avons considéré qu'une molécule était présente lorsque celle-ci était détectée au

moins une fois entre les deux échantillonneurs. Les résultats montrent que sur les 66 molécules analysées, 7 à 35 molécules de pesticides ont été détectées au sein des stations et sont représentées majoritairement par les herbicides (Figure 70).

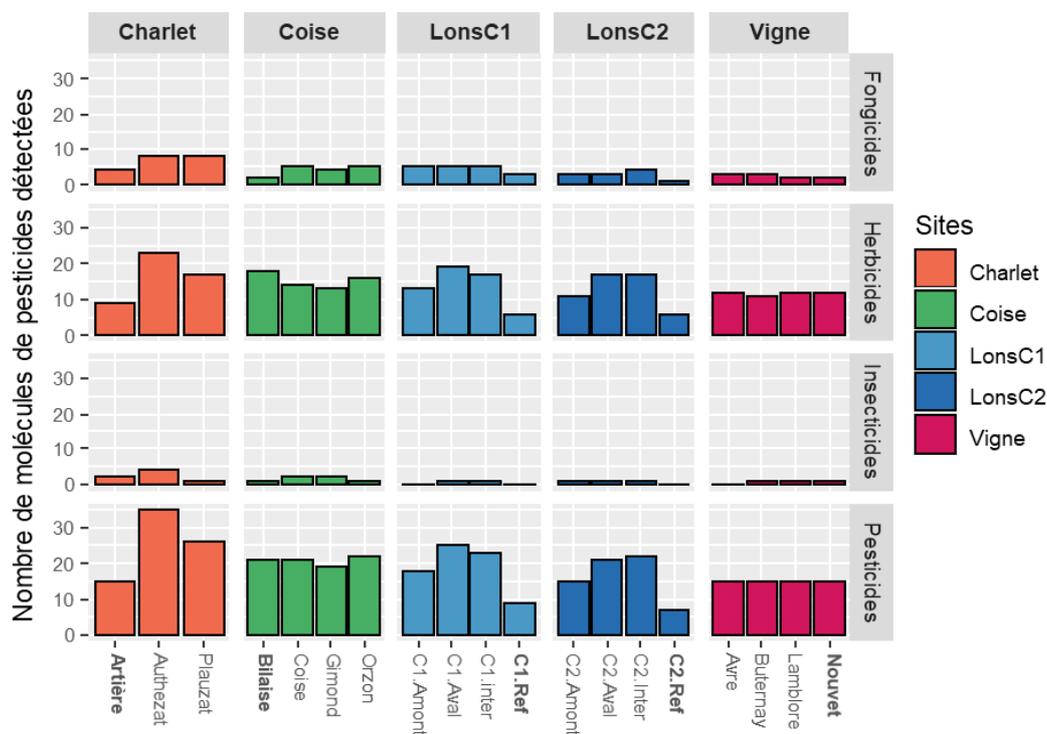


Figure 70 - Histogrammes représentant le nombre total de molécules de pesticides et de leurs classes (fongicides, herbicides et insecticides) sur l'ensemble des stations de chaque site. Les stations de référence sont représentées en gras. Nombre de molécules recherchées : 32 herbicides, 11 métabolites d'herbicides, 12 insecticides, 12 fongicides

3.3. Calcul des unités toxiques et des indicateurs de risque

En plus des indicateurs de contamination (concentration et nombre de pesticides détectés), des indicateurs de risque ont été calculés sur la base des potentiels toxiques des molécules sur l'environnement. Ce choix se justifie par le fait que les molécules de pesticides, en raison de leur mode d'action, n'ont pas la même toxicité sur les organismes biologiques. Par conséquent, une forte concentration en pesticide détectée dans un milieu n'est pas synonyme de risque toxique plus élevé pour ce milieu, et inversement.

Pour le calcul des indicateurs de risque, la toxicité de chaque molécule (unité toxique) a été évaluée sur la base des résultats de tests de toxicité fournis par la base de donnée « Pesticide Properties DataBase » (<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/index.htm>) selon l'équation suivante :

$$UT_i = \frac{C_i}{NOEC_i^T}$$

où UT_i représente l'unité toxique d'une molécule, C_i la concentration moyennée de la molécule détectée pendant la campagne d'échantillonnage pour une station et $NOEC_i^T$ la concentration maximale pour laquelle aucun effet de la molécule n'a été observé sur un organisme donné (résultats issus de test de toxicité de laboratoire). Dans cette étude, on a privilégié le recours à la NOEC plutôt qu'à la LC50 du fait que les échantillonneurs passifs donnent accès à des valeurs de concentrations moyennes sur 7 à 15 jours qui sont en général de plusieurs ordres de grandeurs inférieures aux valeurs de LC50. Le choix des valeurs de NOEC à considérer a été difficile dans la mesure où les modèles biologiques étudiés dans ce projet (micro-organismes autotrophes et hétérotrophes et macro-invertébrés), ne disposent pas tous de données d'effet pertinentes dans la littérature. A défaut, les unités toxiques ont été calculées à partir des résultats des tests de toxicité pour trois taxons pour lesquels on disposait de valeurs de NOEC pour un certain nombre des substances phytosanitaires étudiées :

- Taxon poisson : NOEC à partir d'un test chronique de 21 jours sur l'espèce *Oncorhynchus mykiss*,
- Taxon invertébré : NOEC à partir d'un test chronique de 21 jours sur l'espèce *Daphnia magna*,
- Taxon algue : NOEC à partir d'un test chronique de 96 heures sur plusieurs espèces d'algues dans la mesure où on ne dispose pas de suffisamment de données pour une seule espèce.

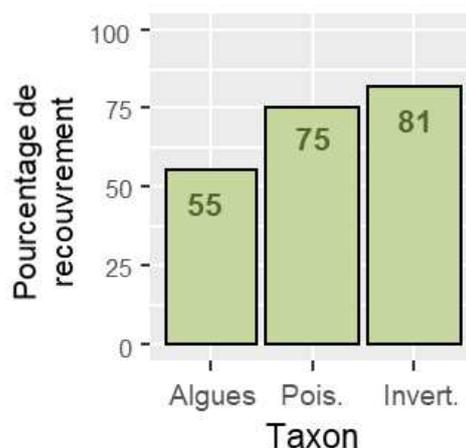


Figure 71 - Pourcentage de molécules analysées dans le projet Impact-CE ayant fait l'objet d'un test de toxicité sur les taxons : algue, poisson et invertébré (Données collectées à partir de la PPDB).

Les valeurs de NOEC collectées dans la PPDB pour chaque molécule et pour chaque taxon sont présentées en Annexe 4. En raison d'un manque de données de la PPDB, il est important de noter que les unités toxiques n'ont pas pu être calculées pour toutes les molécules et tous les taxons. La Figure 71 présente le pourcentage de recouvrement de notre jeu de donnée avec les informations collectées à partir de la PPDB. Nos résultats montrent notamment que seulement 55 % des molécules analysées dans ce projet ont fait l'objet d'un test de toxicité sur les algues.

Pour chaque taxon, nous avons calculé la somme des unités toxiques des molécules détectées dans chaque station. Nous nous référons à cette grandeur comme indicateur de risque pour chaque taxon dans la suite de l'analyse (désignés IR algues, IR poisson et IR invertébré). Un indicateur de risque global a également été calculé via la somme des IR des trois taxons (désigné IR taxon). Les indicateurs de risque utilisés dans notre analyse sont présentés ci-dessous (Figure 72).

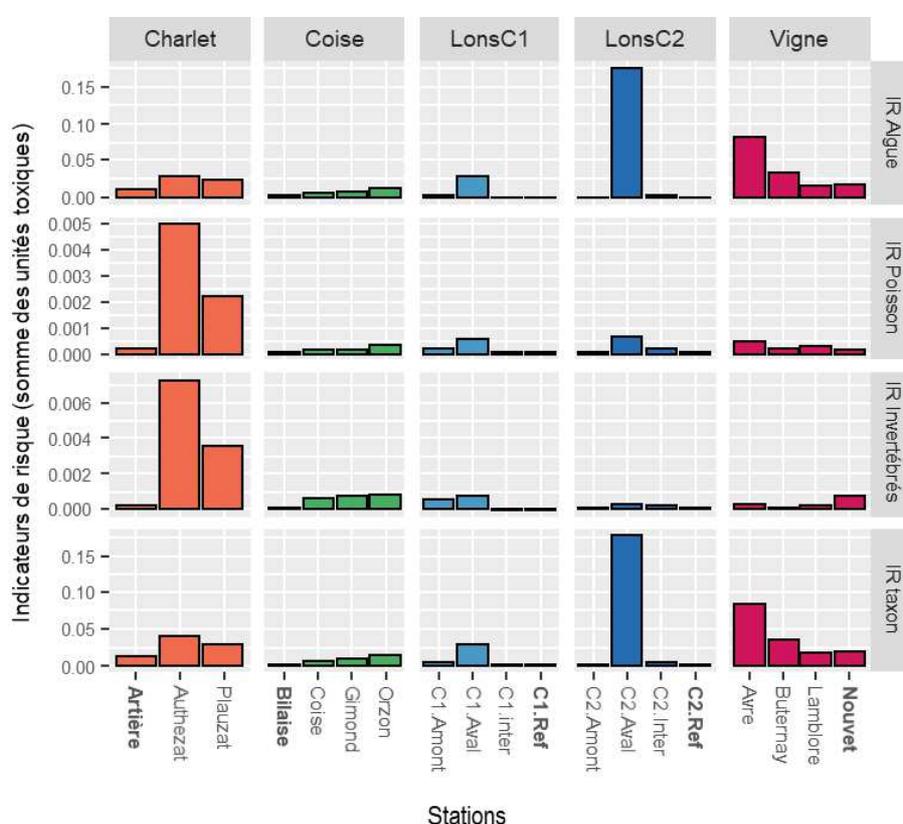


Figure 72 - Indicateurs de risque (IR) pour les taxons algue, poisson et invertébré et pour les trois taxons regroupés (IR taxon). Les IR sont calculés à partir de la somme des unités toxiques des molécules détectées pour chaque taxon en chaque station de chaque site. Les stations de référence sont représentées en gras.

Nos résultats montrent que les risques de toxicité diffèrent selon les sites, les stations et les taxons considérés. Les pesticides détectés dans les stations Authezatzat et Plauzatzat (site du

Charlet) représentent un risque plus élevé pour les communautés d'invertébrés et de poissons que les autres stations. Pour les communautés algales, le risque toxique le plus élevé a été observé sur la station Aval du site de Lons-le-Saunier pendant la période automnale (Figure 72). Ce risque élevé s'explique notamment par la forte concentration de l'herbicide chlortoluron détectée dans cette station (164 ng.L⁻¹) et de sa toxicité reconnue sur les communautés algales (NOEC de 0,001 mg.l⁻¹ pour test chronique de 96 heures sur des espèces d'algues vertes).

La comparaison des indicateurs de risque avec les indicateurs de contamination révèle une hiérarchisation différente des stations. Les fortes concentrations de pesticides détectées dans les stations d'Authizat et de Plauzat n'ont pas été associées à un risque toxique plus élevé sur l'environnement. A l'inverse, le risque toxique élevé observé pour la station Aval de Lons-le-Saunier ou la station d'Avre (site de la Vigne) n'a pas été associé à de plus fortes concentrations mesurées de pesticides dans ces deux stations. Bien que le potentiel toxique n'ait pas pu être évalué pour toutes les molécules et tous les taxons (manque de données de la PPDB sur les tests de toxicité), ces indicateurs de risque apportent des informations complémentaires sur la contamination en pesticides du milieu et seront pris en compte pour analyser la variation des paramètres biologiques sur l'ensemble des sites.

3.4. Analyse des autres paramètres abiotiques

En complément des analyses sur les données des échantillonneurs passifs, les concentrations des éléments métalliques dissous et des paramètres majeurs ont également été déterminés. En effet, certains d'entre eux représentent un proxy de la contamination organique, ont une influence importante sur la diversité et l'activité des organismes aquatiques, peuvent moduler la réponse biologique aux pesticides ou encore interagir avec ces substances.

Analyse des éléments métalliques dissous

Au total, 10 métaux ont été analysés sur l'ensemble des stations avec, pour chaque campagne d'échantillonnage, 3 à 5 mesures réalisées par station. Pour simplifier le jeu de données, la moyenne des concentrations pour chaque métal et chaque station a été calculée sur l'ensemble de la campagne d'échantillonnage. Les métaux ont ensuite été regroupés en deux groupes (Figure 73):

- Métaux DCE (substances prioritaires, SP) : Somme des concentrations molaires des métaux faisant l'objet d'une réglementation DCE (cadmium, nickel et plomb).
- Métaux DCE (polluants spécifiques de l'état écologie, PSEE) : Somme des concentrations des métaux ou métalloïdes suivis pour le bon état écologique des cours d'eau (cuivre, arsenic, zinc et chrome).

Les trois autres métaux (aluminium, manganèse et fer) analysés dans le projet n'ont pas été présentés dans ce rapport. Les concentrations en cuivre ont fait l'objet d'une description à part entière (Figure 73) dans la mesure où ce métal est ciblé par l'approche PICT.

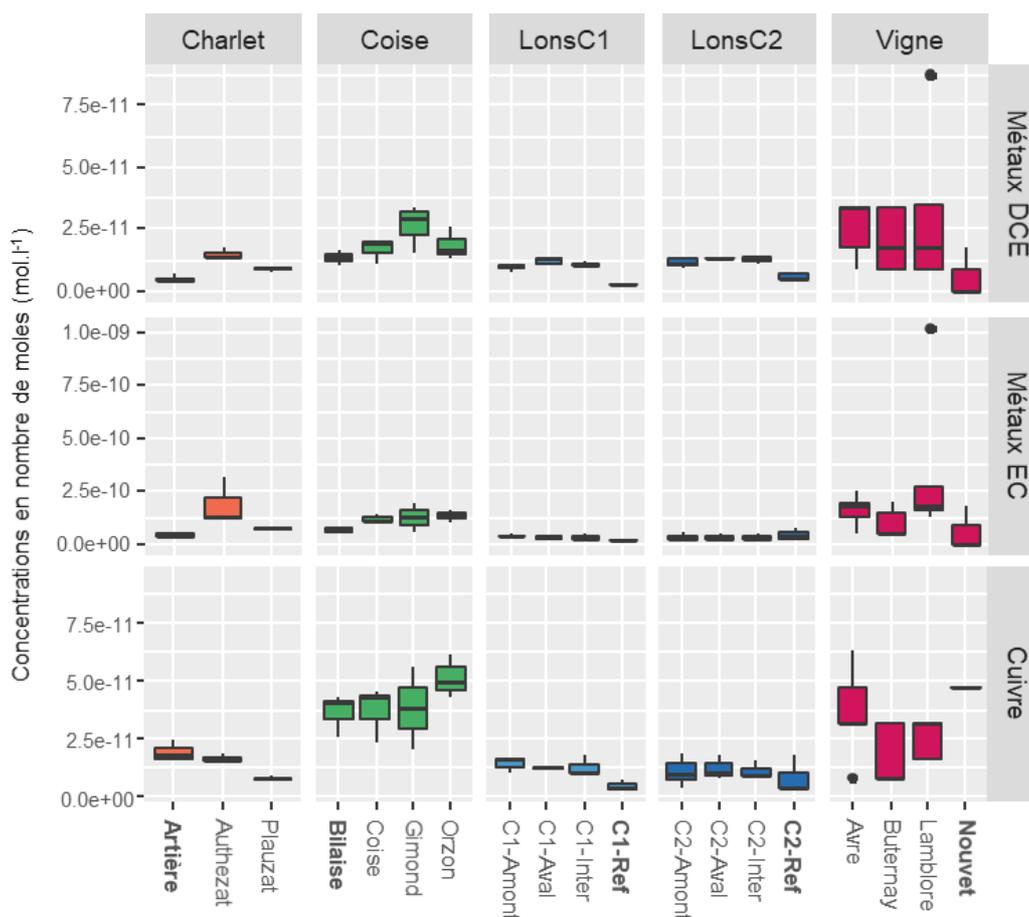


Figure 73 - Somme des concentrations des métaux DCE, EC (voir ci-dessous) et cuivre sur l'ensemble des stations de chaque site. Les stations de référence sont représentées en gras.

Pour l'ensemble des sites, les concentrations en métaux ont été plus faibles dans les stations de référence que dans les autres stations (Figure 73). Les stations d'Authezat (site du Charlet), de Gimond (site de la Coise) et les trois stations du site de la Vigne ont été caractérisées par une plus forte concentration en métaux que les autres stations.

Analyse des majeurs

Concernant les paramètres majeurs, seuls le carbone organique total (COT) et les nitrates ont été analysés puisqu'ils représentent tous les deux un proxy d'une contamination organique. Les résultats présentés en Figure 74 montrent que les concentrations en COT les plus importantes ont été observées sur le site de la Coise, avec en moyenne des concentrations en COT allant de 8,3 à 17 mg.L⁻¹ sur l'ensemble des stations.

Les concentrations en nitrates les plus élevées ont été observées sur les sites de la Vigne et du Charlet. Pour le site de la Vigne, les concentrations en nitrates ont varié, en moyenne, entre 17,5 et 48,2 mg.L⁻¹. Sur le site du Charlet, les concentrations en nitrates ont été largement supérieures dans les stations d'Authezat et de Plauzat (52,4 et 71,4 mg.L⁻¹, respectivement) par rapport à la station de référence (Artière, 4,3 mg.L⁻¹).

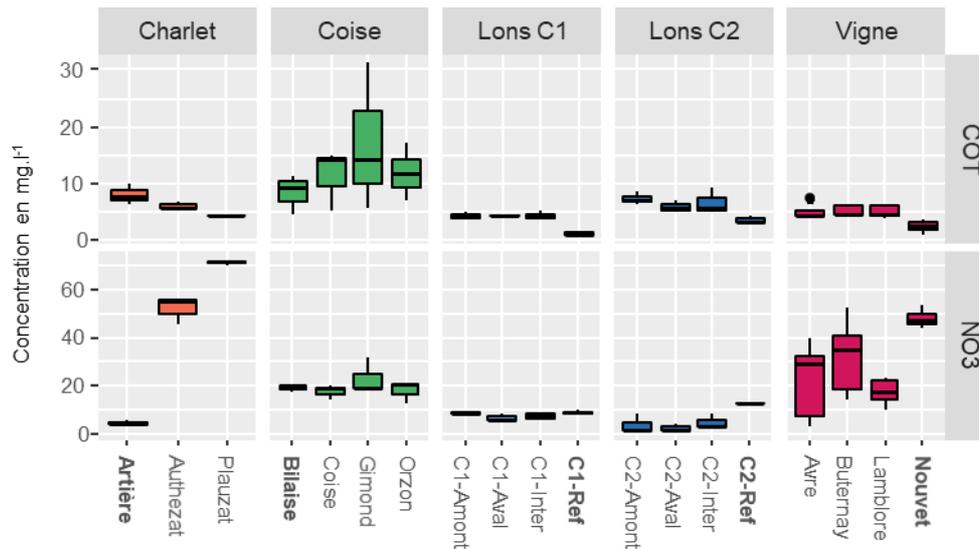


Figure 74 - Concentrations moyennes en carbone organique total (COT) et en nitrates (NO₃) mesurées sur l'ensemble des stations de chaque site. Les stations de référence sont représentées en gras.

4. Volet 2 - Analyse des indicateurs biologiques

L'objectif de ce deuxième volet analytique est (i) d'identifier les paramètres biologiques les plus impactés sur l'ensemble des stations et (ii) de hiérarchiser les stations pour lesquelles les modifications des paramètres biologiques étaient les plus importantes. Pour cela l'ensemble des paramètres biologiques mesurés sur le terrain ont été analysés et, pour chaque paramètre et chaque site, le pourcentage de différence entre les stations et leur station de référence a été calculé. On note que le fait de calculer pour chaque paramètre le pourcentage de différence entre les stations et leur station de référence permet de centrer et normaliser les variables et de comparer les différentes variables biologiques entre elles. Les résultats, exprimés en valeurs absolues, sont présentés en Figure 75.

Les résultats de cette analyse montrent que, par rapport aux stations de référence, les paramètres biologiques mesurés sur le terrain ont été modifiés très largement sur l'ensemble des sites. C'est notamment le cas des paramètres liés au développement chez le gammare (Retard_mue), aux indices de l'I₂M₂, à la décomposition de la matière organique (Decompo_litière_M.large, Kmic/Ktot, Decompo_250µm_SED), aux communautés fongiques (sporulation) et aux capacités de tolérance des communautés microbiennes (EC50_Cuivre, EC50_Glyphosate_Esterase) (Figure 75).

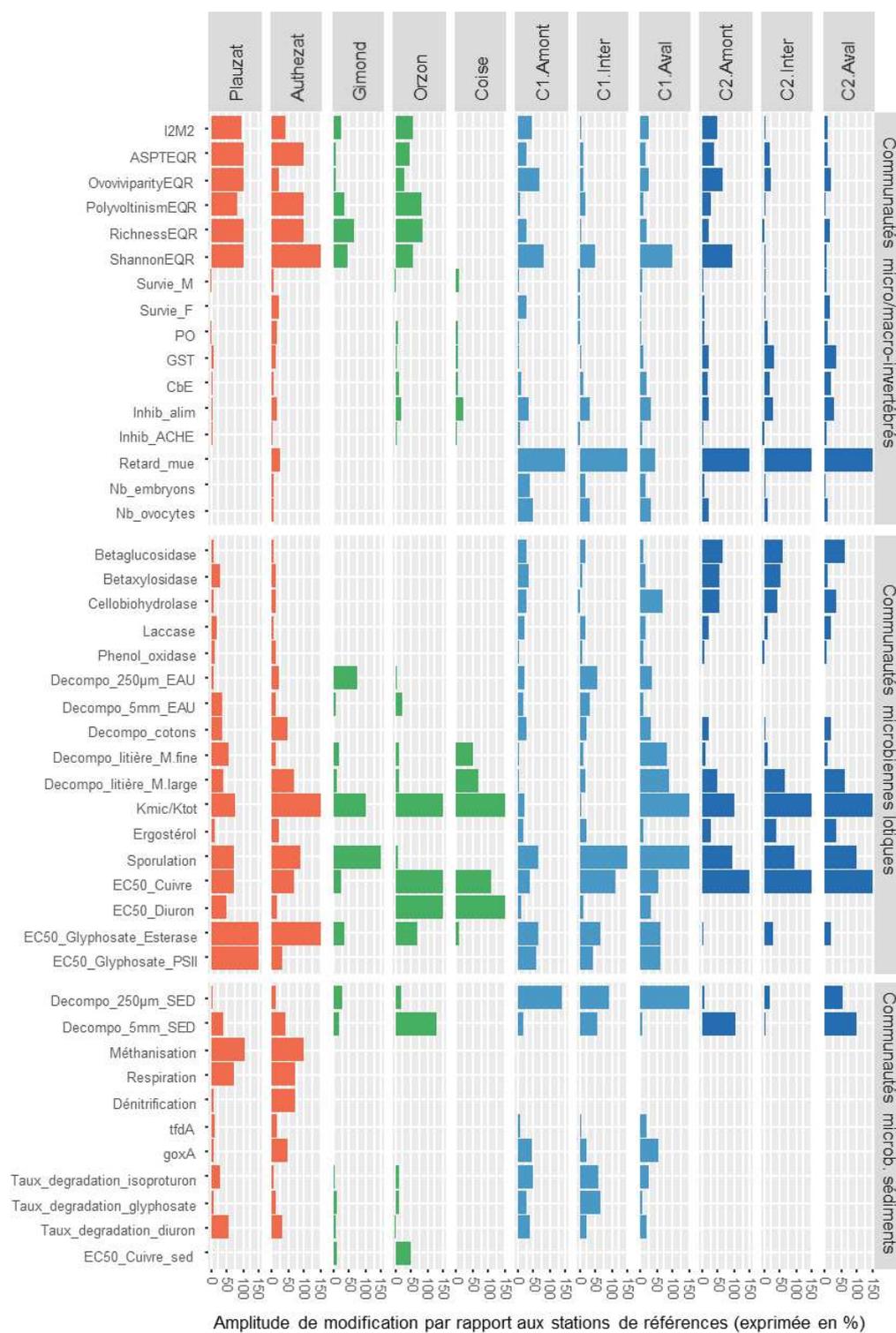


Figure 75 - Amplitude de modification des paramètres biologiques mesurés au sein des stations de chaque site par rapport aux paramètres biologiques mesurés dans les stations de référence des sites respectifs. Les amplitudes sont exprimées en pourcentage et en valeur absolue. L'absence de barre indique une absence de données.

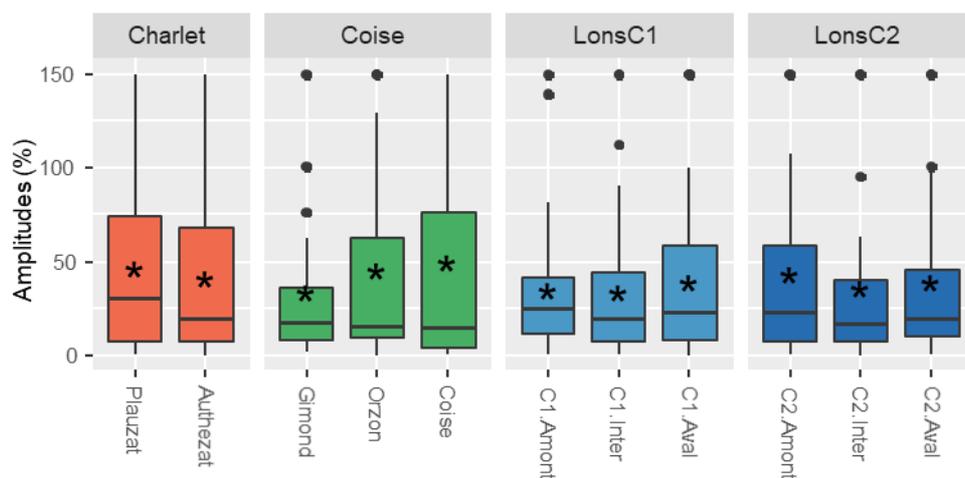


Figure 76 - Représentation box plot des amplitudes de modification des paramètres biologiques mesurés sur les stations de chaque site. Les astérisques représentent la moyenne des amplitudes.

Le site sur lequel les modifications des paramètres biologiques ont été les plus importantes sur les stations est celui du Charlet et plus particulièrement la station de Plauzat avec, en moyenne, une amplitude de modification des paramètres de 50 % (Figure 76). Sur cette station, 25 % des paramètres biologiques mesurés ont eu une amplitude de modification supérieure à 90 % (Figure 77B). Sur le site de la Coise, les amplitudes de modifications des paramètres sur les stations Orzon et Coise ont été plus importantes que sur la station Gimond (Figure 75 et 76). Toutefois, ces observations sont à prendre avec précaution puisque le nombre de paramètres biologiques mesurés par station sur ce site a été différent (Figure 77).

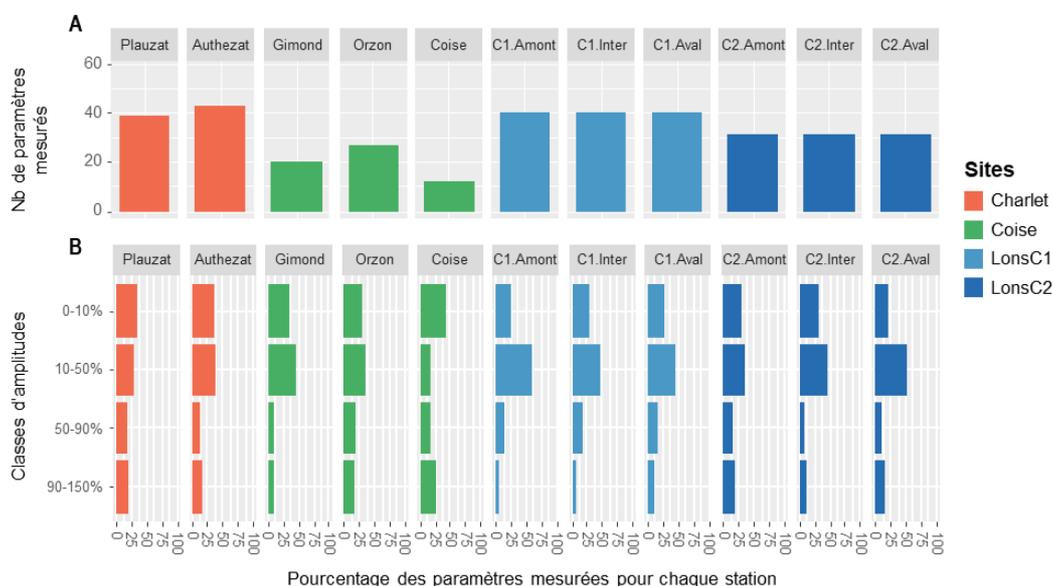


Figure 77 - Nombre de paramètres biologiques mesurés (A) et pourcentage de paramètres mesurés selon leurs classes d'amplitudes de modification pour chaque station (B).

Concernant le site de Lons-le-Saunier, les amplitudes de modification des paramètres sont relativement proches entre les stations Amont, Inter et Aval. La station sur laquelle l'amplitude de modification des paramètres biologiques a été la plus importante est la station Amont pendant la campagne d'automne (C2) avec en moyenne 41 % de modification (Figure 76). Les résultats montrent également que le nombre de paramètres biologiques avec une amplitude de modification supérieure à 90 % a été plus important lors de la campagne d'échantillonnage d'automne que dans celle du printemps (Figure 77).

5. Volet 3 - Analyse des relations entre la variation des paramètres abiotiques et biotiques

Dans ce dernier volet analytique, l'objectif a été d'analyser les relations entre les paramètres abiotiques et biotiques mesurés sur le terrain et d'identifier les paramètres pouvant expliquer la variation des indicateurs biologiques. Pour répondre à cet objectif, trois approches statistiques ont été utilisées : la partition de variance, l'analyse des corrélations et l'analyse en réseau des corrélations.

Tableau 7 - Paramètres biotiques et abiotiques utilisés pour l'analyse de redondance RDA.

	Abréviation	Description
Paramètres abiotiques	COT	Concentration en carbone organique total
	NO3	Concentration en nitrate
	Met.DCE	Concentration en métaux faisant l'objet d'une réglementation DCE
	Met.EC	Concentration en métaux suivis pour le bon état écologique des cours d'eau
	F.tot	Concentration totale en fongicides
	H.tot	Concentration totale en herbicides
	I.tot	Concentration totale en insecticides
	P.mol	Nombre de pesticides détectés
	TC.moy	Température moyenne pendant la campagne d'échantillonnage
	IR.taxons	Indicateurs de risque
Paramètres biotiques	I ₂ M ₂	Indice de l'I ₂ M ₂
	Inhib.ACHE	Inhibition de l'acétylcholinestérase chez le gammare
	Inhib.alim	Inhibition alimentaire chez le gammare
	Survie.M	Taux de survie des mâles chez le gammare
	GST	Enzyme glutathion-s-transférase chez le gammare
	CbE	Enzyme carboxylérase chez le gammare
	PO	Enzyme phénoloxydase chez le gammare
	EC50_Cuivre	EC50 sur test de toxicité avec cuivre
	EC50_Glyphosate_Est	EC50 de l'activité estérase des biofilms dans test de toxicité avec
	erese	Glyphosate
	Sporulation	Taux de sporulation des communautés fongiques
	Decompo_250_sed	Taux de décomposition des decobait dans sédiments avec sac à mailles 250 µm
Decompo_5mm_sed	Taux de décomposition des decobait dans sédiments avec sac à mailles 5 mm	

5.1. Analyse en partition de variance

Dans un premier temps, une approche en partition de variance a été utilisée pour analyser les relations entre paramètres abiotiques et biotiques. Pour cela, une analyse de redondance RDA (Legendre et Legendre, 1998) a été testée sur le jeu de données (en se restreignant aux paramètres qui avaient le plus de mesures valides, on dispose bien d'un nombre d'observations supérieures au nombre de variables explicatives, même si on est en limite). Cette méthode d'ordination contraignante permet d'étudier la relation entre deux tableaux de variables Y (paramètres abiotiques) et X (paramètres biotiques) et de hiérarchiser les variables explicatives (paramètres abiotiques) les unes par rapport aux autres.

Pour utiliser cette méthode, une étape de pré-sélection des paramètres biotiques et abiotiques a été réalisée selon les critères suivants :

- les paramètres abiotiques ont été sélectionnés en fonction de leur intérêt scientifique pour le projet et de leurs auto-corrélation (ex : les paramètres fortement corrélés à un paramètre d'intérêt ont été supprimés)
- les paramètres biotiques ont été sélectionnés pour maximiser le nombre d'observations sur l'ensemble des sites (les paramètres et les stations avec trop de valeurs manquantes ont été supprimés de notre jeu de données).

Sur la base de ces critères, 12 paramètres biotiques et 10 paramètres abiotiques (variables explicatives) sur un total de 13 stations (observations) ont été sélectionnés et sont présentés dans le Tableau 7.

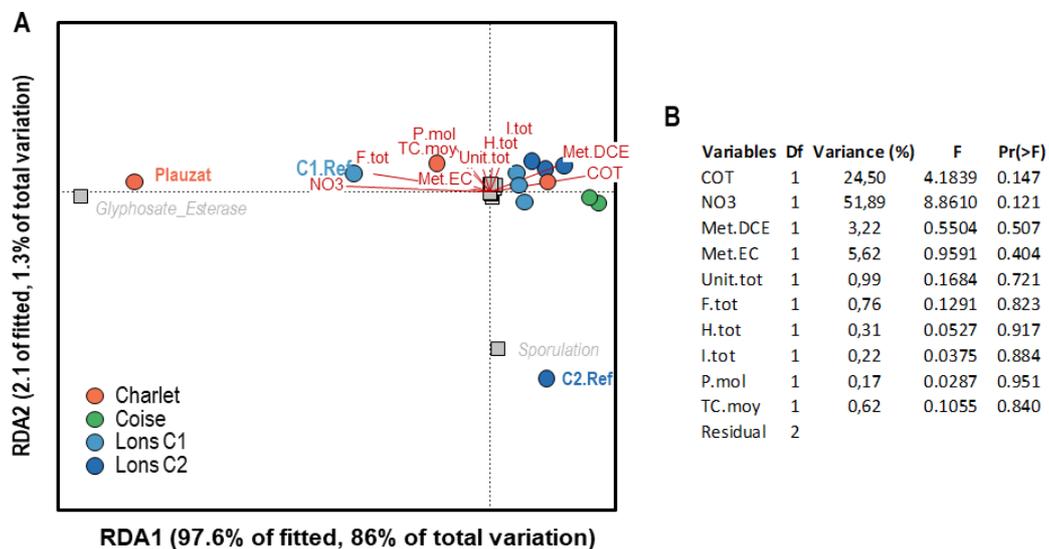


Figure 78 - Diagramme d'ordination de l'analyse RDA (A) et contribution des variables explicatives du modèle (B). (cercles : paramètres abiotiques et carrés : paramètres biotiques).

L'analyse RDA sur les paramètres sélectionnés (dont les valeurs ont au préalable été centrées-réduites) est présentée en Figure 78. Les résultats de cette analyse montrent qu'aucune des

variables abiotiques n'explique significativement la variation des paramètres biologiques (Figure 78B) et que le modèle généré n'est pas significatif ($P = 0,053$). Ces résultats suggèrent donc qu'il n'y a pas de relation entre les paramètres biotiques et abiotiques testés.

5.2. Analyse des corrélations

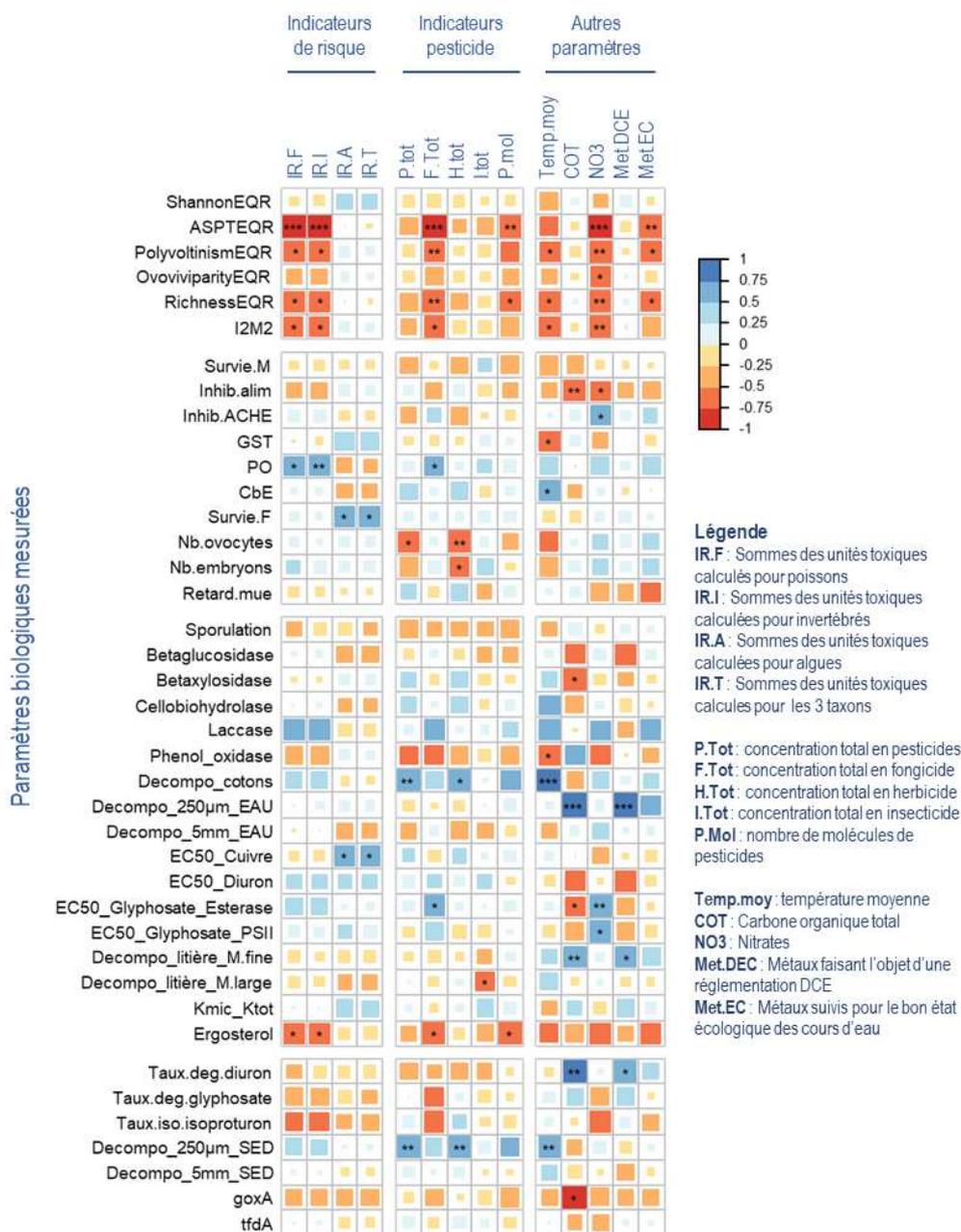


Figure 79 - Matrice de corrélation de Spearman entre paramètres biotiques et paramètres abiotiques. Seules les corrélations d'intérêts sont présentées. Le niveau de significativités des corrélations est représenté par : *** pour $P < 0,001$; ** pour $P < 0,01$ et * pour $P < 0,05$.

Le faible nombre de paramètres et d'échantillons testés par l'analyse RDA ne permet pas d'avoir une analyse statistique robuste et exhaustive des relations entre les paramètres biotiques et abiotiques. Pour contourner cette limite méthodologique, une analyse des corrélations a été utilisée afin d'analyser les relations existantes entre les paramètres. Contrairement à l'analyse RDA, cette méthode a l'avantage de ne pas exclure les paramètres qui contiennent des valeurs manquantes et, donc, de pouvoir analyser un plus grand jeu de données. Toutefois, elle ne permet pas de hiérarchiser les paramètres entre eux.

L'analyse des corrélations a été réalisée sur les paramètres comportant au minimum 6 observations avec la méthode de Spearman. Au total, 83 paramètres ont été analysés (53 paramètres biotiques et 30 paramètres abiotiques) de manière exploratoire et sans a priori. Par conséquent, aucune correction des seuils de significativité n'a été apportée sur la matrice de corrélation. Dans ce rapport, seules les relations entre les paramètres abiotiques d'intérêt et les paramètres biotiques sont présentées (Figure 79). Les résultats de l'analyse montrent l'existence de corrélations significatives, positives ou négatives entre les paramètres abiotiques et biotiques. Parmi les paramètres liés à une contamination aux pesticides, les résultats des corrélations montrent que :

- L'augmentation de la concentration totale en fongicides (F.tot) est associée à une diminution de l'indice I₂M₂ et de la biomasse fongique sur les litières (ergostérol).
- L'augmentation de la concentration totale en insecticides est associée à une diminution de la décomposition des litières en mailles larges.
- L'augmentation de la concentration totale en herbicides (H.tot) est associée à une diminution du nombre d'ovocytes et d'embryons chez le gammare, mais aussi à une augmentation des activités de décomposition de la matière organique (Decompo_cotons et Decompo_250µm_SED).
- Les indicateurs de risque pour les poissons et les invertébrés (IR.F et IR.I) calculés à partir des unités toxiques ont été associés à une diminution de l'indice I₂M₂ et de la biomasse fongique ainsi qu'à une augmentation de l'activité phénoloxydase (PO) chez le gammare.

Ces résultats mettent en évidence un lien entre les paramètres liés à la contamination par les pesticides et les modifications des paramètres biologiques mesurés sur le terrain. D'autres paramètres abiotiques sont également significativement corrélés avec les paramètres biotiques. C'est notamment le cas de la concentration en carbone organique (COT) et des nitrates (NO₃).

5.3. Analyse en réseaux des corrélations

Dans la section précédente, seules les relations d'intérêt entre les paramètres biotiques et abiotiques ont été présentées. Par conséquent, l'évaluation des relations des paramètres biotiques et abiotiques entre eux n'a pas été prise en compte dans l'interprétation des résultats alors que ces relations peuvent également contribuer à expliquer la variation des paramètres

biologiques au sein des stations. Pour aller plus loin dans l'analyse des corrélations et évaluer l'ensemble des relations existantes entre les paramètres, une analyse en réseaux sur la matrice de corrélation de Spearman a été réalisée. Cette méthode permet de visualiser plus facilement l'ensemble des relations du jeu de données et d'identifier les paramètres biotiques et/ou abiotiques les plus connectés.

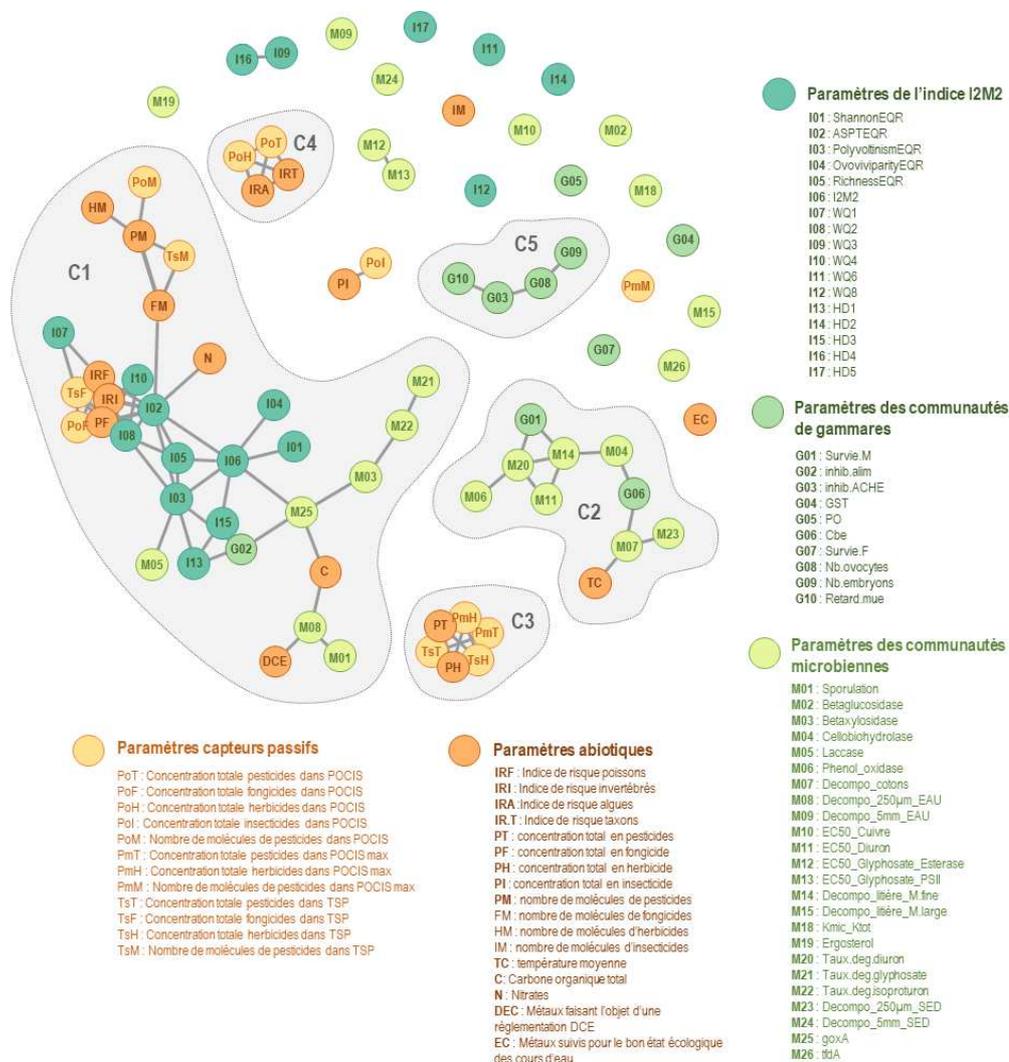


Figure 80 - Analyse en réseaux à partir de la matrice de corrélations de Spearman sur les corrélations significatives avec un coefficient de corrélation supérieur ou égal à 0,8. Les paramètres biotiques et abiotiques ont été divisés en 5 groupes (cf. légende). Les principaux groupes (Clusters) de connexion entre paramètres ont été mis en évidence en gris clair et numérotés de C1 à C5.

Dans ce rapport, l'analyse en réseaux des corrélations a été réalisée seulement sur les corrélations significatives avec un coefficient de corrélation supérieur ou égal à 0,8 (Figure 80). Le réseau de corrélation montre que certains paramètres sont fortement connectés entre eux alors que d'autres paramètres sont non connectés. Au total, 18 paramètres sont non connectés. L'analyse statistique de notre réseau indique que les corrélations significatives

avec un coefficient de corrélation supérieur ou égal à 0,8 représentent 3,1 % de l'ensemble des corrélations avec une valeur transitive de 68 %. Cette valeur indique la complexité des relations entre les paramètres. Une valeur transitive élevée (proche de 100 %) représente une complexité élevée des relations entre les paramètres. Les métriques du réseau confirment donc l'existence de relations entre certains paramètres mesurés sur le terrain.

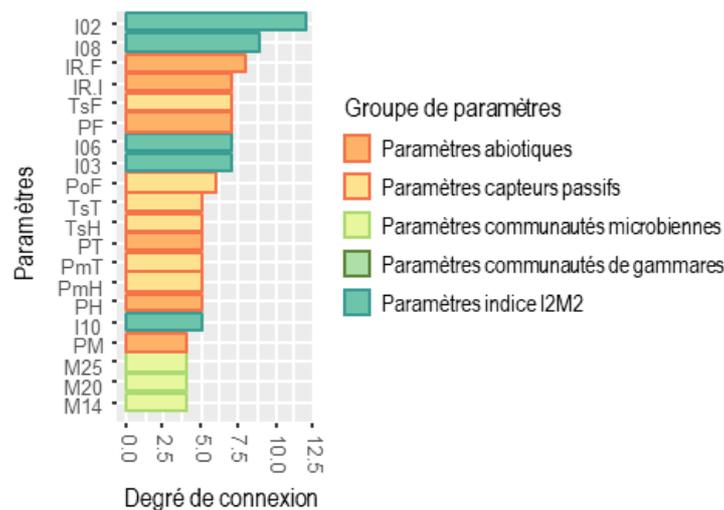


Figure 81 - Histogramme représentant les 20 paramètres biotiques et abiotiques qui ont eu le plus de connexions au sein du réseau (Figure 16). La correspondance des noms des paramètres est présentée en figure 16 (cf. légende).

Au sein du réseau, les paramètres les plus connectés (entre 7 et 12 connections) ont été les métriques de l'I₂M₂ (ASPTEQR, WQ2, I₂M₂, PolyvoltinismEQR), les indicateurs de risque pour les poissons et les invertébrés (IR.F et IR.I) ainsi que les paramètres liés à la contamination en fongicides (TsF, PF, PoF) (Figure 81). Certains paramètres des communautés microbiennes sont également fortement connectés avec d'autres paramètres. C'est notamment le cas du potentiel génétique dégradant le glyphosate (M25), du taux de dégradation du diuron (M20) et du taux de décomposition de la litière végétale dans les mailles fines (M14).

Parmi les paramètres connectés entre eux, l'analyse en réseaux révèle 5 clusters (Figure 80). Deux clusters (cluster C4 et C3) sont représentés exclusivement par des paramètres abiotiques liés à la contamination en pesticides. On observe notamment que la concentration totale en pesticides (PT) est significativement liée à la concentration en herbicide mesurée dans les TSP et POCIS-MAX. Le cluster C5 est représenté exclusivement par les paramètres biotiques mesurés chez le gammare (Retard_mue, Nb_ovocytes, Nb_embryons, Inhib.ACHE).

Les deux autres clusters sont représentés par des connexions entre paramètres biotiques de différentes communautés d'organismes et par des connexions de paramètres biotiques. Au

sein du cluster C1, les résultats montrent notamment de fortes connections entre la concentration en fongicides (TsF, PoF, PF, FM) et les métriques de l'I₂M₂ (I10, I02, I08, etc.).

6. Discussion et conclusion

L'objectif principal de cette partie a été d'analyser *via* des approches statistiques multivariées l'ensemble des données générées par les partenaires scientifiques du projet.

Dans le premier volet analytique, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'exploitation des données issues des échantillonneurs passifs. Les profils de concentrations en pesticides édités pour chaque station et pour chaque échantillonneur ont permis d'avoir une représentation globale du nombre de pesticides détectés et de leurs concentrations. Ces résultats confirment notamment l'intérêt d'utiliser différents échantillonneurs passifs pour élargir le spectre de détection des molécules et avoir une vision plus holistique de la contamination en pesticides au sein d'un environnement. Toutefois, les différentes caractéristiques techniques des échantillonneurs passifs (ex : seuil de détection, durée d'exposition) peuvent rendre difficile l'établissement d'indicateurs de contamination communs entre les données chimiques issues des trois échantillonneurs. C'est d'autant plus vrai que des différences de concentrations en molécules ont été observées entre les échantillonneurs passifs TSP et POCIS. Ces observations soulignent la difficulté d'avoir une image juste et précise des concentrations réelles en pesticides dans un environnement. Malgré cela et en tenant compte des biais liés aux caractéristiques techniques des échantillonneurs passifs, l'utilisation groupée des données issues de trois échantillonneurs nous a permis d'établir des indicateurs de contamination (nombre et concentration totale de molécules de pesticides, indice de risque basé sur la toxicité des molécules) afin d'identifier et de hiérarchiser les stations les plus impactées.

L'analyse globale des paramètres biologiques (volet 2) a été réalisée en comparant les paramètres mesurés dans les stations au sein d'un même site avec leur station de référence. De cette façon, nous avons pu hiérarchiser, au sein d'un même site, les stations entre elles et identifier les paramètres biologiques pour lesquels des modifications ont été importantes.

Enfin, dans le dernier volet analytique, l'analyse des corrélations nous a permis de mettre en évidence des relations entre les paramètres biotiques et abiotiques. Plus précisément, nos résultats montrent que certains paramètres liés à la contamination en pesticide ont une influence sur la variation des paramètres biologiques mesurés sur le terrain. Toutefois, l'interprétation de ces résultats (corrélations) doit être faite avec beaucoup de précaution car le faible nombre d'observations par station (minimum 6 observations et maximum 19 observations par station) ne permet pas d'avoir des approches statistiques robustes. Par conséquent, les résultats statistiques de cette dernière partie ne permettent pas de tirer des conclusions sur l'effet d'une contamination en pesticides sur le fonctionnement biologique des milieux aquatiques. Néanmoins, ils peuvent trouver leur utilité dans l'interprétation des modifications des paramètres biologiques au sein des stations de chaque site.

VI. SYNTHÈSE

1. Bilan par site : ce que nos indicateurs nous ont appris sur l'état écologique et la contamination de chaque site par les pesticides

1.1 Site de la Vigne

La station de l'Avre apparaît comme la plus contaminée du site, avec une contamination caractérisée par la dominance des herbicides céréales (chlortoluron et isoproturon). Sur les stations du Buternay et du Lamblore, l'absence de pics de contamination semble indiquer qu'il y a eu peu de transferts de substances (du moins pour les substances recherchées) lors des événements pluvieux. Par ailleurs le Lamblore présente un profil plus atypique, notamment par la présence de substances interdites peu présentes sur les autres stations (diuron, hexazinone) et par l'absence de chlortoluron. Une toxicité est révélée sur l'ensemble des stations par l'inhibition de l'alimentation chez le gammare avec une variabilité temporelle commune (toxicité en semaine 3 et 4) à mettre en lien avec des débits plus importants (Figure 5). La toxicité globalement moindre sur l'Avre ne coïncide pas avec l'importance de la concentration des pesticides recherchés. Cela pourrait refléter la présence sur les autres stations, de molécules non recherchées et/ou plus toxiques. Notre étude n'a pas permis d'en rendre compte avec la gamme des molécules analysées. Les autres indicateurs biologiques n'ont pas été déployés sur ces stations.

1.2 Site de Lons-le-Saunier

Les résultats obtenus par les échantillonneurs passifs révèlent une contamination plus importante sur la station Aval (en termes de concentration, de nombre de molécules détectées et de toxicité) que sur les autres stations, avec la dominance de l'herbicide métolachlore sur toutes les stations de Lons-le-Saunier (plus marquée au printemps) et du chlortoluron essentiellement à la station Aval (plus marquée à l'automne). Cette analyse est corroborée par une décomposition de la matière organique par les invertébrés (litière et substrats artificiels) plus faible sur la station Aval, associée à des activités microbiennes moindres (activités enzymatiques, biomasse fongique), ce qui dénote un impact significatif de la contamination sur le fonctionnement écologique du cours d'eau à cette station. On note que le PICT cuivre est également plus élevé sur les stations Intermédiaire et Aval, témoignant d'une présence suffisante de cet élément pour modifier les communautés microbiennes. En revanche, une reprotoxicité marquée, de type perturbation endocrinienne, est retrouvée aux 2 saisons avec un impact plus fort sur l'Amont et au printemps ; un autre type de toxicité est également tracé par des inhibitions alimentaires détectées uniquement à l'automne, et présentant une variabilité à l'échelle hebdomadaire, là encore localisée sur l'Amont de la Madeleine. L'outil

de diagnostic invertébrés confirme ces résultats puisqu'il souligne une perturbation aux pesticides très probable (60 %) sur ces deux stations (Amont et Aval).

La station Intermédiaire n'est pas exempte de contamination mais apparaît, quel que soit l'indicateur considéré (hormis PICT cuivre au printemps), moins impactée que les stations Amont et Aval. Ce résultat est surprenant et suggère que les impacts viticoles (principalement captés par la confluence avec le ruisseau des Mouraches au niveau de la station Intermédiaire) ont été moins importants que les impacts liés aux autres cultures, du moins pour les contaminants organiques sur les périodes de déploiement des outils. Cette conclusion est corroborée par de relativement faibles concentrations de pesticides organiques associés à la viticulture. On note toutefois sur cette station une capacité des communautés microbiennes à minéraliser le glyphosate, ce qui semble indiquer une exposition (actuelle ou passée) significative à cette molécule.

Enfin, la station de référence, bien que caractérisée par des concentrations globalement moindres, s'avère contaminée par des apports en isoproturon (herbicide céréale) et probablement en glyphosate (révélé par le PICT et qui a été confirmé par des dosages ponctuels de cette molécule et de son principal métabolite (AMPA)).

Le fait que les outils pointent différents impacts en différentes stations à différentes dates semble indiquer ici des contaminations de nature différentes auxquelles ils ne répondent pas avec la même intensité. Ces réponses contrastées entre indicateurs soulignent leur caractère complémentaire. Si les impacts fonctionnels observés sur la station Aval semblent globalement cohérents avec les concentrations plus importantes des pesticides recherchées, la reprotoxicité et l'inhibition alimentaire observées en station Amont (au printemps et à l'automne, respectivement) peuvent être spécifiquement liées à certaines molécules – possiblement non identifiées par l'analyse ciblée réalisée sur les échantillonneurs passifs – dont l'impact fonctionnel à l'échelle de l'écosystème passe inaperçu (décomposition des litières non impactée). Une analyse plus complète des substances en présence sur la station Amont serait donc nécessaire pour aller plus loin dans l'identification des causes. Sur le site de Lons-le-Saunier, la réplication de l'étude à deux saisons a permis de mettre en évidence la variabilité saisonnière des apports en pesticides dans le cours d'eau. Une partie de la variabilité saisonnière des indicateurs biologiques (reprotoxicité et inhibition alimentaire) permet d'illustrer ces variations qualitatives et quantitatives des effets de la contamination. A l'inverse, la variabilité saisonnière d'autres indicateurs (décomposition des litières) implique un effet saisonnier important de la réponse en lien avec d'autres facteurs environnementaux (température, phénologie des détritivores, disponibilité des ressources naturelles), d'où l'importance de disposer d'une condition de référence par site et par saison pour ces indicateurs.

1.3 Site du Charlet

Les résultats obtenus sur le site du Charlet reflètent un gradient de contamination Artière<Plauzat<Authezat, dominé par les herbicides maïs et fongicides céréales, mais incluant également des insecticides sur la partie aval. La station Authezat se révèle la plus

impactée, avec des indices forts de contamination relevés par toutes les métriques. Des concentrations importantes en pesticides y sont relevées par les échantillonneurs passifs et les indicateurs biologiques y dénotent de fortes altérations du fonctionnement écologique : une toxicité permanente sur les gammares (comme en 2015) et une faible décomposition de la matière organique liée à des communautés fongiques et d'invertébrés très altérées (ex : faible diversité fongique, mauvais score I_2M_2).

Sur Plauzat, la contamination semble légèrement moins importante, avec des concentrations moindres et une toxicité moins marquée pour le gammare (comme en 2015). L'état du cours d'eau reste néanmoins préoccupant, avec un niveau de contamination restant élevé, la présence de glyphosate (non recherché par les échantillonneurs passifs) révélée par l'approche PICT, ainsi qu'une perturbation importante liée à un excès de nitrates. Cette pression, suggérée par l'outil de diagnostic invertébrés et une décomposition microbienne des litières rapide, est confirmée par les données physico-chimiques.

Sur la station de référence (Artière), les concentrations de substances phytosanitaires mesurées sont très faibles. Toutefois, l'approche PICT (qui révèle une exposition plus marquée au cuivre), une toxicité non nulle pour les gammares et une note I_2M_2 médiocre suggèrent que la station n'est pas exempte de pressions. Il est probable que ces pressions soient liés à la présence d'habitations (un village avec un cimetière et un terrain de sport est situé en amont de la station), du substrat basaltique très particulier (charge métallique importante) et d'une activité agricole (bien que limitée) en amont de la station d'étude.

1.4 Site de la Coise

La contamination des stations se caractérise par une concentration moindre par rapport aux sites du Charlet et de Lons-le-Saunier, ce qui est cohérent avec la dominance de la polyculture-élevage sur le bassin de la Coise. On y retrouve toutefois des concentrations importantes de métolachlore. La confrontation avec les ventes (données de la BNVD) montre que le suivi par échantillonneurs passifs sur ce site gagnerait à être plus exhaustif qu'il n'a été possible de le faire dans le cadre de ce projet. En effet, il serait intéressant d'analyser certaines molécules comme le prothioconazole et le boscalide et de consolider les suivis de tébuconazole compte tenu de l'augmentation des ventes de ces substances. Rappelons également que ces outils ne permettent pas (encore) de piéger le glyphosate alors qu'il est l'objet de quantités vendues soutenues, voire en légère augmentation entre 2014 et 2018.

La station la moins impactée de ce site est la station Gimond, suivie de la station Bilaise. La plus contaminée est la station Coise, même si l'Orzon présente des pics importants de contamination (notamment par le métolachlore). En adéquation avec les données chimiques, les impacts biologiques sont les plus importants sur la station de la rivière Coise. On y observe une importante inhibition alimentaire des gammares (comme en 2014), qui concorde avec une dégradation de la matière organique (décomposition des litières et des substrats artificiels benthiques) plus faible que sur les autres stations. Une exposition significative des communautés microbiennes au glyphosate y est par ailleurs suspectée par l'approche PICT. La station Orzon semble significativement impactée également, avec une note I_2M_2

relativement faible et une exposition significative des communautés microbiennes au glyphosate (PICT). Les impacts fonctionnels (décomposition des litières) y sont toutefois moins importants que sur la Coise. L'approche PICT permet par ailleurs de suspecter une exposition résiduelle au diuron sur les stations Orzon et Coise. En adéquation avec les données chimiques, la station Gimond (la moins contaminée par les pesticides) présente un score I_2M_2 relativement bon.

2. Présentation des résultats orientée par la réponse aux questions posées par les gestionnaires des sites étudiés

Les réponses aux questions posées en amont du projet par les opérationnels sont présentées sous forme de fiches (Fiches 1 à 4), à destination des opérationnels et du grand public. Chaque fiche présente une question ainsi que les aspects des résultats Impact-CE permettant d'y répondre. Ces fiches synthétiques illustrent la possibilité de notre panel d'indicateurs d'aborder des questions diverses, ainsi que sa capacité de fournir aux opérationnels des solutions appropriées à une grande variété de problématiques ou de contextes. La complémentarité entre les outils apparaît par ailleurs très clairement, puisque aucun d'entre eux ne permet d'aborder l'ensemble des questions. De plus, il apparaît que l'examen des résultats apportés par différents outils permet de nuancer les réponses aux questions : chaque indicateur portant sur des processus, organismes ou niveaux d'organisation biologiques différents, leur réponse à une contamination donnée ne concorde pas nécessairement. C'est la confrontation de différents outils qui permet d'embrasser la complexité des patrons de contamination et de leurs impacts à différentes échelles de temps et sur différents compartiments de l'écosystème (voir Tableau 9, chapitre VI.3).

Fiche n°1

Le suivi ponctuel actuel rend-il compte de la contamination réelle du cours d'eau par les pesticides ?

Bassin de l'Ardières

Viticulture majoritaire avec un gradient amont-aval d'occupation



Existant :
2014 : suivi ponctuel mi-juin (RCO)
Recherche de 250 substances
2015 : suivi ponctuel hebdomadaire sur juin

Outil déployé



POCIS

exposé 15j mi-juin 2014



TSP

exposé 4x7j en juin 2015

Réponse

Détection d'une vingtaine de substances pesticides non repérées dans l'échantillon ponctuel car inférieures à la limite de quantification

Bonne intégration des transferts rapides en crue et quantification de substances fortement adsorbées, non détectées en suivi ponctuel bien que recherchées

Bassin de La Seille

Maïs, céréales, vignes



Existant :
suivi ponctuel mensuel du captage de mai à novembre 2017
Recherche de plus de 400 substances



POCIS

exposé 2x15j en octobre 2017

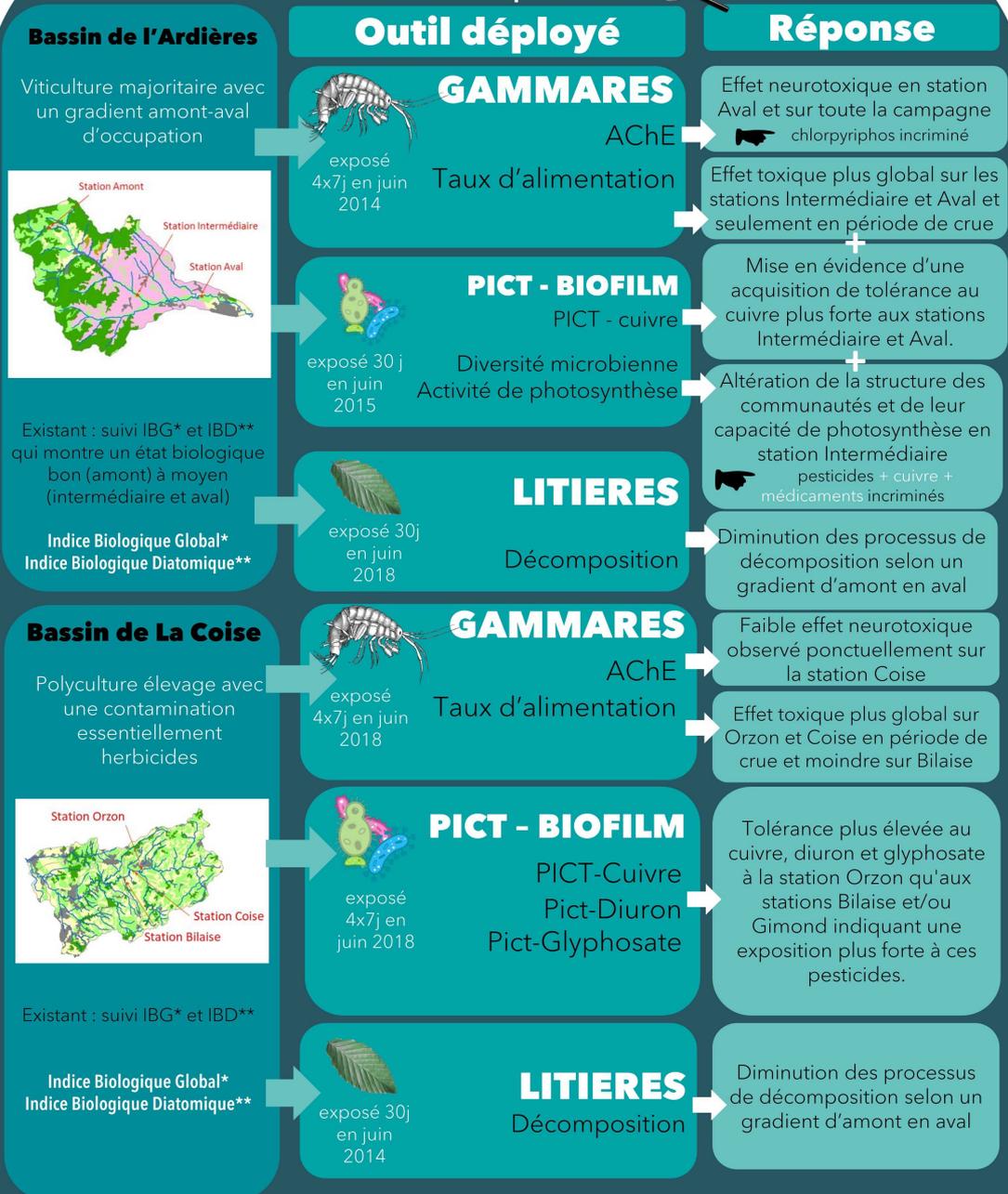
Détection de 7 substances non repérées par le suivi ponctuel car inférieures à la limite de quantification. Détection de 5 substances non recherchées dans le suivi ponctuel, validant l'élargissement de la gamme des substances à rechercher

Bilan : les outils testés peuvent améliorer le suivi ponctuel

Les échantillonneurs passifs, de par leur capacité d'intégration, permettent un diagnostic plus exhaustif et consolidé de la contamination en rendant mieux compte des substances fugaces, qui ne sont mobilisés qu'en crue, et des substances en très faible concentration, certains métabolites notamment. Ils peuvent également aider au pré-ciblage des substances les plus pertinentes à suivre pour la surveillance.

Fiche n°2

Peut-on rendre compte d'impacts biologiques sur le cours d'eau et des causes possibles ?



Bilan : les outils testés permettent bien de rendre compte d'un impact biologique et de causes possibles.

Les outils Gammarex et PICT peuvent rendre compte d'une altération et incriminer des substances spécifiques, l'outil gammarex peut également renseigner sur un impact toxique plus global invitant à des compléments de mesures chimiques pour en déterminer les causes possibles. L'outil litère alerte sur l'altération possible de fonctions essentielles de bon fonctionnement des écosystèmes du cours d'eau

Fiche n°3

Peut-on identifier les zones et période contributives à la contamination ?

	Outil déployé	Réponse
<p>Bassin des sources de la Vigne Grandes cultures</p>  <p>Existant : suivi ponctuel tous les 15 j en 2017 Recherche d'un large panel de substances</p>	<p>TSP POCIS MAX </p> <p>exposé 4x7j en février 2017</p>	<p>Montre une contribution plus marquée du sous bassin de l'Avre puis du Lamblore, puis du Buternay. Montre l'influence des périodes de crue sur la contamination</p>
<p>Bassin de La Seille Mais, céréales, vignes</p>  <p>Existant : suivi ponctuel mensuel de février à novembre 2017 du cours d'eau de la Madeleine. Recherche d'un large panel de substances</p>	<p>TSP POCIS MAX </p> <p>exposé 4x7j en juin et octobre 2017</p>	<p>Métolachlore surtout en juin avec des niveaux marqués et comparables sur toutes les stations. Chlortoluron et diuron surtout en octobre et uniquement en Aval.</p>
	<p>PICT - BIOFILM </p> <p>exposé 30 j en juin et Octobre 2017</p>	<p>Même si on observe des différences de niveaux de réponse entre les saisons, tolérance microbienne plus élevée au cuivre aux stations Intermédiaire et Aval.</p>
	<p>LITIERES </p> <p>exposé 30 j en juin et octobre 2017 Décomposition</p>	<p>Diminution des processus de décomposition plus marquée à la station Aval, avec un effet plus fort au printemps</p>
<p>Bassin du Charlet Grandes cultures</p>  <p>Existant : suivi ponctuel mensuel en 2017</p>	<p>GAMMARES </p> <p>exposé 4x7j en juin et octobre 2017 Taux d'alimentation Marqueurs de reproduction</p>	<p>L'outil cible quant à lui des effets plus marqués sur la station Amont : - Inhibition alimentaire en automne. - Reprotoxicité au printemps. Les autres stations sont moins impactées</p>
	<p>PICT - BIOFILM </p> <p>Exposé 30 j en juin 2017</p>	<p>Tolérance au glyphosate plus élevée à la station Amont : gradient de présence du glyphosate inverse de celui mesuré par les suivis ponctuels</p>
	<p>LITIERES </p> <p>exposé 30 j en juin 2017 Décomposition</p>	<p>Diminution des processus de décomposition plus marquée à la station Aval</p>

Bilan : les outils testés permettent une différenciation de la contamination dans l'espace et selon les saisons.

Les échantillonneurs passifs montrent leur capacité à intégrer les transferts en crue et hors crue. Les outils biologiques rendent également compte de processus intégrés sur la durée d'exposition. Ces outils permettent ainsi de mieux rendre compte de contaminations moyennes et donc de consolider les comparaisons de stations dans le temps (évolution de la contamination) et l'espace (contribution respective de sous bassins).

Fiche n°4

Est-il possible de rendre compte d'une évolution de la contamination suite à des changements de pratiques ? 🔍

Bassin de l'Ardières

Viticulture majoritaire avec un gradient amont-aval d'occupation



Interdiction du diuron fin 2008
Etat Initial avant 2008 :
Acquisition de tolérance des communautés vis-à-vis du diuron en Aval

Outil déployé



TSP

exposé 4x7 j en juin 2014

Réponse

Faibles concentrations en diuron et ses métabolites



PICT - BIOFILM
exposé 30 j en juin 2014

Perte d'acquisition de tolérance des communautés au diuron : réponse Aval identique à celle Amont

Bassin de La Coise

Polyculture élevage avec une contamination essentiellement herbicides



Interdiction de l'acétochlore en 2013
Etat initial mesuré avec les mêmes outils en 2014 : Gradient de contamination Orzon>Coise>Bilaise.
Acétochlore observé sur Orzon.
Pas d'effet neurotoxique.
Inhibition alimentaire des gammares sur toutes les stations mais seulement en période de crue et cohérente avec l'intensité des pics



TSP

exposé 4x7 j en juin 2018

Acétochlore n'est plus détecté sur aucune station mais présence de Métolachlore sur les 3 stations et plus marquée sur Orzon



POCIS-MAX

exposé 2x15 j en juin 2018

Acétochlore OA n'est pas détecté mais Métolachlore OA est détecté sur toutes les stations suivies



GAMMARES
AChE

exposé 4x7j en juin 2018

Taux d'alimentation

Faible effet neurotoxique observé ponctuellement sur la station Coise

Même constat qu'en 2014 d'une toxicité globale en période de crue

Bilan : les outils apportent des éléments de réponse à cette question

Les outils d'échantillonnage passif, de par leur capacité d'intégration et de pré-concentration permettent de suivre l'évolution de contamination liée à l'interdiction de substances, à leur produits de dégradation et à leurs produits de substitution. Le PICT rend compte d'une diminution d'usage d'une substance (ou famille) donnée tout en informant sur la résilience des communautés microbiennes.

3. Positionnement des outils et retours d'expérience

3.1 Positionnement des outils d'après les retours des opérationnels

Les outils [échantillonneurs passifs, outils de biomonitoring basés sur les communautés microbiennes et/ou les macro-invertébrés aquatiques] ont également fait l'objet d'un retour d'expérience de la part d'opérationnels impliqués dans le projet ou non, quant à l'intérêt qu'ils y trouvent et aux besoins d'appropriation ressentis. Pour cela, des entretiens à distance ont été organisés au printemps 2020 auprès d'un panel d'opérationnels synthétisé dans le Tableau 8 et que nous tenons à remercier particulièrement d'avoir répondu positivement à notre sollicitation. Les supports d'entretien sont présentés en Annexe 9.

Tableau 8 - Opérationnels auditionnés pour un retour d'expérience sur les outils

Nom	Structure	Partenaire du projet Impact-CE
Jean-Pierre Rebillard	Agence de l'Eau Adour-Garonne (AE AG)	
Dorothee Bolzan et Jean Prygiel	Agence de l'Eau Artois Picardie (AE AP)	
Audrey Pagès	Chambre d'agriculture Rhône	
Frédéric Barrez, Patrick Candido, Guillaume Couturier et Karine Charpentier	Eau de Paris	x
Justine Lagrévol	Syndicat Interdépartemental Mixte pour l'Aménagement de la Coise et ses affluents (SIMA Coise)	x
Alice Patisserie et Grégoire Thévenet	Syndicat Mixte des Rivières du Beaujolais (SMRB)	
Thibaud Pandelakis et Stéphane Kihl	Syndicat Mixte Veyle Vivante (SMVV)	
Anne-Gaëlle Touminet	Syndicat Mixte de Vallées de la Veyre et de l'Auzon (SMVVA)	x

La ville de Lons-le-Saunier, impliquée dans le projet Impact-CE, était très intéressée par les outils mais a estimé ne pas disposer de suffisamment de retours de la part des chercheurs sur les résultats pour répondre aux questions.

Les résultats des entretiens révèlent que la majorité des opérationnels du projet étaient satisfaits que leurs sites aient été retenus pour servir de base à l'expérimentation de nouvelles pratiques. Cela leur a notamment donné la possibilité de mieux connaître ces outils par l'interaction avec les chercheurs et surtout une mise en situation concrète accompagnée, d'évaluer la faisabilité d'application et d'obtenir des résultats complémentaires sur leur site. Les retours sur les relations avec les chercheurs et sur le déploiement des outils étaient globalement positifs. Cependant, les opérationnels notent tous qu'ils ont du mal à s'approprier

les résultats finaux, les retours des chercheurs ayant été jugés globalement insuffisants, même si les réunions de terrain ont été très appréciées. Le décalage temporel entre la mise en œuvre des campagnes de suivi et la date d'obtention de tous les résultats de mesures chimiques et biologiques peut expliquer en partie ce constat. Par ailleurs, les résultats de suivis plus légers autour d'un objectif de comparaison amont-aval de l'efficacité de zones tampons (cas de suivis parallèles avec le syndicat de la Veyle Vivante) ont été plus facilement appropriés. Ce sont les mises en œuvre conjointes sur le terrain par les chercheurs et les gestionnaires qui ont été jugées les plus formatrices.

Outils de mesure chimique

TSP-POCIS/POCIS-MAX : toutes les personnes interrogées ont estimé que ces outils étaient utiles pour avoir un suivi plus intégré dans le temps donc plus représentatif d'une contamination moyenne, facilitant la comparaison de stations dans l'espace ou le temps et ainsi la mise en œuvre et l'évaluation de plans d'action. Leur recours a aussi été jugé intéressant pour mettre en avant la présence de molécules non recherchées ou non retrouvées (e.g. en trop faible concentration pour être détectées et/ou quantifiées) par les suivis ponctuels classiques (suivis DCE notamment).

La distinction entre POCIS / TSP / POCIS-MAX a été plutôt compliquée à faire ressortir lors des entretiens, la plupart des personnes interviewées n'ayant pas exactement perçu les différences entre ces outils et la nécessité d'utiliser plusieurs outils plutôt qu'un seul. Seuls quelques gestionnaires comme Eau de Paris et le SMVV (ayant eu l'occasion de mettre en place des échantillonneurs passifs avec INRAE pour le suivi de l'efficacité de lagunes pour atténuer les transferts de pesticides) ont très bien perçu l'intérêt spécifique des TSP pour capter des épisodes de transfert rapide. Il apparaît donc que les différences entre ces outils doivent être mieux expliquées aussi bien du point de vue de leurs spécificités de mesure que de leurs contraintes spécifiques de mise en œuvre actuelles, chacun de ces outils étant très complémentaires mais ne disposant pas du même niveau d'opérationnalité.

L'interprétation des résultats en termes qualitatifs (pas de calibration) ou semi-quantitatifs (substances ayant fait l'objet d'une calibration) n'a pas semblé limitante pour un objectif de diagnostic d'impact et de comparaison de situations dans l'espace ou dans le temps. Il est tout de même ressorti un intérêt pour aller le plus possible vers du semi-quantitatif et donc une estimation la plus fiable possible des concentrations moyennes dans l'eau. Cela implique de calibrer les outils pour d'avantage de molécules, et notamment des produits de dégradation. Dans tous les cas, il est apparu important de renforcer la communication sur les différents niveaux d'interprétation (qualitatif, semi-quantitatif) pour éviter toute confusion et mauvaise utilisation des résultats. En particulier, au-delà des objectifs de diagnostic, la tentation d'extrapoler les résultats en termes quantitatifs (pour les comparer à des normes notamment) est grande et doit être évitée ou encadrée. La notion d'incertitude associée aux résultats devrait également être d'avantage communiquée.

La capacité de ces outils à mesurer une large gamme de molécules a été bien perçue et appréciée. Le POCIS-MAX a en général permis de faire ressortir un certain nombre de molécules plus polaires, dont des métabolites qui sont rarement recherchés ou retrouvés. Le

point négatif qui est presque toujours ressorti est la difficulté actuelle de ces outils à échantillonner le glyphosate et l'AMPA.

A aussi été discuté le fait que ces outils peuvent aussi échantillonner toute une gamme de substances ne relevant pas forcément d'usages agricoles (ex : résidus médicamenteux). Dans le cas des applications testées dans le cadre de ce projet, visant à mieux diagnostiquer l'impact des pratiques agricoles sur la qualité de l'eau, cela a été perçu par des animateurs de bassin (SMVVA) comme un élément possible de confusion dans le message à adresser aux agriculteurs pour les inciter à changer de pratiques. Cela a aussi été perçu par d'autres tels que la chambre d'agriculture comme un point positif à utiliser pour éviter la stigmatisation des agriculteurs et justifier d'actions plus concertées au niveau des différents acteurs impliqués dans la contamination chimique globale des cours d'eau.

Outils de mesure biologique

Les avis sur ces outils sont divers en fonction des situations de contamination et des objectifs visés. Certains n'y voient un intérêt que si l'on est capable de remonter aux substances à l'origine des effets observés, d'autres y trouvant un intérêt pour compléter les mesures chimiques. Dans ce dernier cas, deux types d'utilisation ont été suggérées : (i) donner une information sur la gravité des impacts réels en cas de contamination avérée par des substances chimiques, soit (ii) nuancer les réponses chimiques lorsqu'elles sont faibles par une vérification d'intégrité du compartiment biologique ; a notamment été exprimé l'intérêt de ces outils pour la sélection de stations pérennes de référence, dans la mesure où ils complèteraient le diagnostic chimique par des indicateurs écotoxicologiques ou écologiques.

Décomposition des litières : L'outil décomposition des litières est celui qui a suscité le moins de retour des opérationnels du projet. Très peu d'intervenants se souvenaient de l'outil et des résultats qu'il avait pu mettre en évidence. Un seul site (celui du Charlet) a bénéficié d'un accompagnement plutôt complet de la mise en place de cet outil par les chercheurs : explication sur le terrain, accompagnement sur les zones de poses, etc. Sur ce site, les différents participants ont été plutôt enthousiasmés par son utilisation, soulignant l'importance de la sensibilisation et de la formation des gestionnaires en situation réelle de terrain pour son déploiement. Cependant, il faut noter que des intérêts variés pour les résultats ont été exprimés : certains estimant que cet outil est peu pertinent pour un diagnostic d'impact agricole puisque pas assez spécifique des produits phytosanitaires et d'autres, au contraire, que son intérêt majeur consiste dans sa capacité à renseigner sur un état de santé global de l'écosystème à travers des indicateurs fonctionnels et non pas uniquement structuraux (comme c'est le cas des indicateurs DCE actuels). De fait, ce constat met en lumière l'importance de mieux cibler l'utilisation de l'outil en fonction des situations et des objectifs. Il a notamment été jugé plus pertinent d'y avoir recours pour diagnostiquer un impact chimique dans des situations peu à faiblement contaminées, là où les valeurs de concentrations ne seraient pas forcément informatives à elles seules d'un problème environnemental, ou pour un pré-diagnostic pour aider au choix des stations à suivre en priorité.

Indicateurs biocénétiques invertébrés : Il a été suggéré par un gestionnaire (AE AG) l'intérêt d'associer l'outil I₂M₂/outil de diagnostic pour compléter le diagnostic d'impact pesticides, le recours actuel à l'IBGN dans cet objectif étant jugé moins pertinent. Pour cela, a été exprimé un besoin de renforcer la communication sur l'outil I₂M₂/outil de diagnostic pour bien le distinguer de l'IBGN et en montrer la plus-value. Ce manque d'information semble notamment être un facteur de sa moindre utilisation. A noter que l'outil I₂M₂/outil de diagnostic a toutefois été estimé comme peu pertinent dans des hydrosystèmes très dégradés (AE AP) (cours d'eau chenalisé + pressions nitrates + HAP + pesticides) car pas assez discriminant pour identifier où porter les actions. Il n'était pas non plus assez sensible pour rendre compte d'améliorations en milieu très contaminé et donc peu incitatif pour encourager les acteurs à poursuivre leurs efforts.

PICT : La méthode PICT a connu la même problématique que la décomposition des litières lors des entretiens : peu de retours et une difficulté à bien se souvenir du procédé et de s'appropriier pleinement les résultats. Quand l'intérêt de l'outil était perçu, sa capacité à permettre d'identifier les molécules incriminées dans les perturbations biologiques observées a été jugée importante mais actuellement limitée, puisque seulement possible pour quelques molécules et alors que les besoins s'expriment souvent en termes d'impacts multi-substances. Le recours au PICT dans ce projet a en partie pallié l'impossibilité de disposer d'échantillonneur intégratif pour le glyphosate puisque cet outil a permis de rendre compte de différents niveaux d'imprégnation du milieu à cette substance à travers l'acquisition de tolérance induite. C'est l'aspect qui a eu l'air de générer le plus d'enthousiasme à un éventuel déploiement de cet outil.

Gammare encagés : L'outil a été plutôt bien perçu par l'ensemble des gestionnaires, notamment par sa simplicité de compréhension et d'utilisation (accompagnée par les chercheurs ou le prestataire BIOMAE) et par les résultats qu'il permettait d'acquérir. Cependant, sur la plupart des sites expérimentaux, il a été estimé que l'outil gammare n'a apporté qu'une confirmation des informations déjà acquises par les gestionnaires. Le déploiement de cet outil a donc été jugé décevant dans son optique de révéler de nouvelles informations sur les différents sites d'application. Néanmoins, cette confirmation de résultat a été plutôt bien reçue et a permis de consolider les approches et les pratiques de certains gestionnaires. On souligne que ces retours témoignent sans doute d'une insuffisance d'appropriation de l'ensemble des résultats par les gestionnaires, certaines réponses de l'outil gammare ayant donné des résultats d'impact toxique sur des sites jugés peu contaminés. Un gestionnaire (AE AP) a ainsi souligné la limite des résultats chimiques qui donnent des informations substance par substance et ne renseignent pas ou peu sur les effets cumulés observables sur les gammare encagés. A contrario, ils ont pu aussi observer des situations où des concentrations mesurées ne se traduisent pas toujours par les effets suspectés sur les gammare encagés du fait de facteurs limitant la biodisponibilité des molécules toxiques. C'est pourquoi il peut aussi être intéressant de réaliser des mesures de bioaccumulation dans les gammare jugées plus pertinentes pour prédire les effets que des mesures de concentrations dans l'eau (AE AP).

Remarques concernant tous les outils

- La difficulté de trouver des localisations adaptées pour les stations de mise en place des outils dans les cours d'eau a été relevée par plusieurs gestionnaires et un besoin d'appui pour ce choix est remonté (accessibilité, protection vis-à-vis des regards et du vandalisme). Ce problème est moins marqué pour les Gammare encagés, BIOMAE ayant développé des solutions pour limiter ces risques.
- Il a été évoqué l'importance d'associer des mesures hydrologiques (pluie et débit quand c'est possible) pour évaluer les variations interannuelles, quand on veut suivre une évolution de pratique ou l'efficacité d'actions correctives. Dans cet objectif, une mise en place et un suivi des outils sur toute une année culturale pour suivre au mieux la contamination, compte tenu de sa variabilité dans le temps, ont aussi été suggérés au cas par cas (a minima un relevé sur une échelle limnimétrique).
- Le coût de mise en œuvre de ces outils en lui-même ne semble pas rédhibitoire même s'il a pu orienter des gestionnaires à limiter le nombre de stations pour permettre des suivis spécifiques de ce type (AE AP a notamment réalisé des suivis avec des gammare encagés en raison de la faiblesse des peuplements piscicoles des cours d'eau de son bassin, avec 3 campagnes de mesure par an tous les 2 ans, mais sur un nombre restreint de stations). Toutefois, c'est surtout le fait de rajouter de nouveaux outils à un plan de suivi déjà chargé, compte tenu des moyens financiers et humains disponibles, qui semble le plus contraignant : les gestionnaires ne conçoivent un recours à ces outils que dans le cas où leurs contrôles ponctuels seraient allégés. Il semble donc essentiel de miser sur la complémentarité des outils et de bien cibler les outils à privilégier selon les objectifs et les stratégies de suivi.
- La nécessité de normalisation des outils (échantillonneurs passifs, décomposition de litières, ...) et des méthodes d'application ainsi qu'une harmonisation des stratégies de mise en œuvre sont apparues comme un préalable à leur diffusion auprès des opérationnels au-delà d'applications de recherche. Mis à part Eau de Paris (qui dispose d'un laboratoire conséquent), l'importance d'aiguiller les gestionnaires sur des organismes compétents pour l'analyse et l'interprétation des résultats des échantillonneurs passifs a été exprimée.
- Un besoin de formation et d'accompagnement à la prise en main des outils a été également de nombreuses fois évoqué, la formation sur le terrain étant apparue comme un plus incontestable pour faciliter l'appropriation des outils, méthodes et résultats. Lorsque cela est possible et pertinent, il a été suggéré d'impliquer d'avantage les agriculteurs dans la compréhension et la mise en œuvre des outils développés par les chercheurs pour évaluer la qualité de l'eau. Une telle démarche pourrait aboutir à une plus grande transparence et responsabilisation de tous les acteurs pour concilier qualité de l'eau et agriculture.
- Les outils qualité de l'eau « classiques » ne semblent pas un levier suffisant pour faire évoluer les pratiques des agriculteurs (témoignage de la Chambre d'agriculture et du

SMVB). Ils ne semblent pas « parler » suffisamment pour une prise de conscience du besoin de changer. En fait, il semblerait que des indicateurs plus informatifs de la vie biologique des cours d'eau pourraient être plus pertinents et plus positifs pour encourager la mise en place de pratiques plus respectueuses. Sauf cas particulier des bassins karstiques, où la présence de cours d'eau non pérennes rend plus délicat le recours à des indicateurs biologiques, il serait intéressant de tester ces nouveaux indicateurs auprès des acteurs locaux. La mise en place des PSE ou d'actions sur des sites pilotes (AAC) pourrait être un cadre intéressant dans ce sens.

- A plusieurs reprises, le besoin de dépasser le cadre de la surveillance DCE pour les états chimiques et écologiques des masses d'eau par une meilleure caractérisation des impacts biologiques a été exprimé. Cependant, sans évolution du cadre réglementaire, il apparaît difficile de créer un mouvement de fond vers ces outils.

Conclusion

Les différents entretiens menés confirment l'intérêt des opérationnels pour les outils chimiques intégratifs (POCIS/TSP) qui, en outre, paraissent simples d'utilisation. Cependant, pour rendre ces outils opérationnels, il est attendu de disposer rapidement d'informations sur les possibilités de se les procurer, d'une méthodologie validée de mise en œuvre et d'interprétation ainsi que de l'identification de laboratoires susceptibles de les analyser. L'outil gammames, reposant sur un certain nombre de protocoles normalisés, est déjà accessible via une prestation efficace qui est déjà opérationnelle sur le territoire (notamment via BIOMAE). Il fait par exemple aujourd'hui partie intégrante du réseau de surveillance de certains gestionnaires. En revanche, les autres outils évoqués (PICT et décomposition de litières) ont été jugés moins opérationnels : des limites aux déploiements de la méthode PICT liées essentiellement à la difficulté de son interprétation, ont été mises en avant, mais son potentiel reste une source d'intérêt important du fait de sa spécificité de réponse. Cependant une approche par famille de molécules ou par modes d'action semble une piste pertinente pour améliorer sa généricité. L'outil « décomposition des litières » a suscité un intérêt varié des opérationnels interrogés selon les situations de contamination (importante ou plus modérée à faible) et les objectifs visés (impact pesticide, pré-diagnostic ou impact fonctionnel plus global).

Un besoin de meilleur ciblage des outils à utiliser selon les situations et les objectifs est plus globalement apparu comme indispensable pour orienter les choix et optimiser les moyens disponibles. Pour la plupart des outils, l'accompagnement des opérationnels est ressorti comme nécessaire pour en faciliter l'appropriation. En cela, la normalisation des protocoles et la mise à disposition de méthodologies validées et harmonisées sont remontées comme des éléments clés pour en permettre le déploiement. Enfin, l'évolution du cadre réglementaire (DCE) ainsi que la reconnaissance et la promotion de ces dispositifs au niveau des politiques nationales sont également ressorties comme des leviers essentiels pour que ce déploiement soit soutenu, à la fois sur les plans stratégique et financier.

Les fiches suivantes constituent un support de communication possible à destination des opérationnels et du grand public qui synthétise le principe de chaque outil ainsi que sa

perception par les opérationnels, telle qu'évaluée à la suite des entretiens. Dans chacune de ces fiches, l'intérêt des opérationnels pour l'outil est symbolisé par un gradient allant du rouge (pas intéressé) au vert (très intéressé).

Echantillonneurs passifs

Echantillonneur passif – Impact-CE

TSP



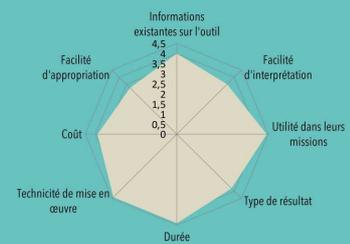
Il échantillonne en continu sur toute la période de son immersion 4 fois 7 jours

C'est un bâtonnet en silicone modifiée capable de retenir toute substance hydrophobe à moyennement hydrophile en solution

Il est plus réactif que le POCIS et donc plus efficace pour rendre compte des crues en tête de bassin versant et petites rivières dynamiques

23 PESTICIDES CALIBRES mesurés dans le projet

Avis des opérationnels du projet



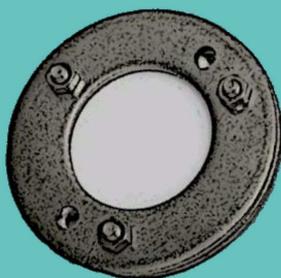
0 - Peu approprié / 6 - Très approprié



Intérêt perçu pour l'outil par les opérationnels du projet

Echantillonneur passif – projet Impact-CE

POCIS-MAX



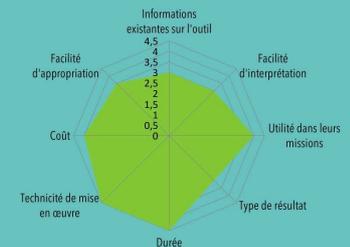
Il constitue une amélioration de l'outil POCIS pour les substances ionisables

Similaire au POCIS mais avec un polymère capable de retenir des substances plus hydrophiles dont des métabolites

Le Glyphosate fait partie des molécules hydrophiles ciblées par l'outil mais pas encore au point

17 PESTICIDES CALIBRES mesurés dans le projet

Avis des opérationnels du projet



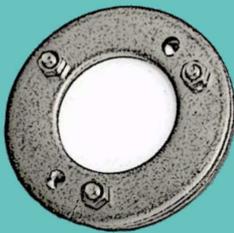
0 - Peu approprié / 6 - Très approprié



Intérêt perçu pour l'outil par les opérationnels du projet

Echantillonneur passif – projet Impact-CE

POCIS



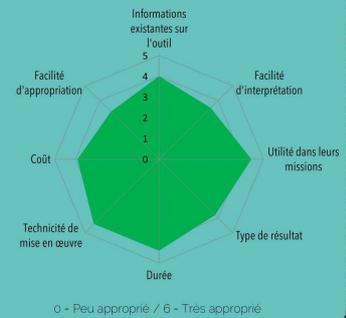
Il échantillonne en continu sur toute la période de son immersion
2 fois 15 jours

Ce sont deux membranes insérant un polymère capable de retenir toute substance en solution faiblement à moyennement hydrophobe

Il est testé à plus large échelle dans un objectif de surveillance (AQUAREF)

41 PESTICIDES CALIBRES mesurés dans le projet

Avis des opérationnels du projet

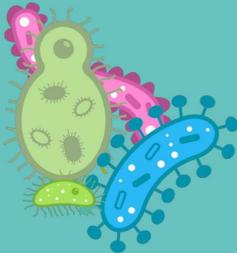


Intérêt perçu pour l'outil par les opérationnels du projet

Indicateurs biologiques

Bioindication – Impact-CE

PICT-BIOFILM



Il s'agit de déposer dans la rivière des substrats artificiels sur lesquels vont se développer des communautés microbiennes autochtones puis de mesurer, après 1 mois, l'adaptation de ces communautés à des substances spécifiques

Le PICT* est basé sur la capacité d'adaptation des communautés microbiennes induite par l'exposition à une substance toxique dans une rivière

INDICATEUR mesuré :

- niveau de tolérance des communautés microbiennes vis-à-vis d'un pesticide ciblé

**Pollution-Induced Community Tolerance*

Mesure de la tolérance

- Les communautés microbiennes autochtones sont prélevées et leur réponse à des concentrations croissantes de différents pesticides cibles est évaluée en laboratoire en mesurant un ou plusieurs fonctions microbiennes appropriées (photosynthèse, activité enzymatique) lors de tests dose-réponse.
- L'acquisition de tolérance mesurée témoigne de l'exposition préalable à ce pesticide ou à des pesticides de même mode d'action dans le cours d'eau.
- Cet outil prometteur est encore en phase de développement.

Intérêt perçu pour l'outil par les opérationnels du projet

Biomonitoring actif – Impact-CE

GAMMARES



Il s'agit de transplanter des organismes 7 jours dans le cours d'eau puis d'analyser des marqueurs de toxicité

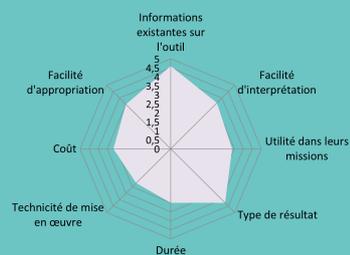
Ce sont des gammares engagés selon un protocole normalisé et un référentiel d'interprétation des résultats

Cet outil est déjà déployé pour la surveillance globale des cours d'eau

INDICATEURS mesurés :

- Une enzyme marqueur de neurotoxicité spécifique de certains insecticides
- Le taux d'alimentation indiquant une toxicité plus globale
- Indicateurs de reprotoxicité (exposition 1 mois)

Avis des opérationnels du projet

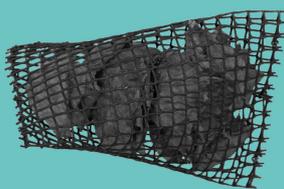


Cet indicateur plus complexe est utilisé en collaboration avec un bureau d'étude.
0 = Peu approprié / 6 = Très approprié

Intérêt perçu pour l'outil par les opérationnels du projet

Bioindication – Impact-CE

LITIÈRES VEGETALES



Il s'agit de placer des feuilles mortes durant 1 mois dans le cours d'eau afin d'en mesurer la décomposition par les micro-organismes et les invertébrés

La décomposition des feuilles mortes par les micro-organismes (mailles fines) et macro-invertébrés (mailles larges) informe sur le fonctionnement écologique du cours d'eau

Cet outil requiert une référence comparative.

Il est déjà déployé dans des études ponctuelles pour la bioindication globale des cours d'eau

INDICATEUR mesuré :

- La perte de masse foliaire

Améliorations en cours

Les scientifiques travaillent également à la mise au point de substrats artificiels dans l'eau et le sédiment afin de disposer d'un outil standardisé pour mesurer les altérations.

L'intérêt de l'outil* est apparu insuffisamment exploité dans les études d'impact des pesticides car jugé pas assez spécifique de ces substances

* Résultats issus des retours d'expérience des gestionnaires sur sites du projet (10 personnes interviewées au total)

Intérêt perçu pour l'outil par les opérationnels du projet

3.2 Positionnement des outils d'après les résultats d'Impact-CE

Le bilan sur l'utilisation de chaque outil est abordé de différentes manières. Tout d'abord le Tableau 9 récapitule les informations nécessaires à l'orientation des opérationnels dans la sélection des outils selon le contexte, la question posée et les moyens techniques nécessaires. Les colonnes du tableau sont les suivantes :

- Niveau de diagnostic : indique si l'indicateur permet de rechercher une molécule en particulier, une famille de pesticides (ex : insecticides), un mode d'action particulier (ex : neurotoxicité, inhibition de la photosynthèse) ou un type de pression (notamment discrimination entre types de perturbations chimiques/physiques) ou donne une image de l'état général du cours d'eau (intégrant l'impact des pesticides mais aussi d'autres pressions chimiques ou physiques).
- Contexte : indique dans quel type de situation il est pertinent de déployer l'outil. Pour l'ensemble des outils, il convient d'éviter les mises hors d'eau (assecs) ou les épisodes de crues.
- Intégration chimique et biologique : indique sur quel niveau de spécificité chimique ou de niveau d'organisation biologique l'indicateur est basé (e.g. du niveau infra-individuel à l'écosystème).
- Intégration temporelle.
- Situation de référence nécessaire ? : indique s'il est nécessaire de prévoir dans le déploiement de l'indicateur une comparaison avec une station de référence (i.e. non impactée) pour l'interprétation de la réponse en termes de diagnostic. Cette référence peut être soit une mesure dans un cours d'eau peu contaminé (témoin), soit s'appuyer sur la disponibilité d'une valeur théorique attendue (valeurs de référence associées à l'indicateur intégrant la variabilité environnementale).
- Les colonnes Littérature utile et Normes indiquent une sélection des ouvrages/articles ou normes relatifs aux différents outils.
- Possibilité de recours actuel à l'outil : indique si l'outil est à l'heure actuelle plutôt orienté vers des finalités de recherche, s'il peut être déployé via des prestations de service ou si des formations à destination des opérationnels sont disponibles.

La Tableau 10 quant à lui dresse un bilan des atouts et limites de chaque outil en vue d'une application opérationnelle. Il indique, le cas échéant, la disponibilité d'opérateurs spécialisés dans le déploiement des outils, ainsi que les études récentes, en cours ou à venir visant au développement de ces outils ou à l'amélioration de leur opérationnalité. La Figure 82 permet de visualiser les caractéristiques de chaque outil vis-à-vis de leur niveau d'opérationnalité et de spécificité.

Tableau 9 - Récapitulatif des caractéristiques des différents outils pour une application en cours d'eau non stagnant. La signification de chaque colonne est explicitée dans le texte.

Outils	Niveau de diagnostic	Contexte d'application	Intégration chimique et biologique	Intégration temporelle	Situation de réf. nécessaire ?	Littérature utile	Normes	Possibilités de recours actuel à l'outil
TSP	Molécule	Colonne d'eau	Molécules avec $-1,7 < \log P < 5,5$	1 semaine	Non	Margoum et al. (2013) Martin et al. (2016) Martin (2016)		Guides AQUAREF pour faciliter l'appropriation des outils par les laboratoires d'analyse et les opérationnels
POCIS	Molécule	Colonne d'eau en condition de courant suffisante	Molécules avec $0,1 < \log P < 4,1$	2 semaines	Non	Lissalde et al. (2014)		Lardy-Fontan et al. (2018a,b) Mathon et al. (2017)
POCIS-MAX			Molécules avec $-1,9 < \log P < 3,8$			Fauvelle et Mazzella (2013)		Ghestem et al. (2015) (https://www.aquaref.fr/search/node/%C3%A9chantillonneurs%20passifs)
PICT	Molécule/mode d'action	Benthos et sédiments	Communautés microbiennes	plusieurs semaines à plusieurs mois	Oui	Tlili et al. (2016) Pesce et al. (2016)		Déploiement possible par les scientifiques dans le cadre de projets de recherche appliquée
Potentiel génétique et potentiel dégradant	Molécule	Sédiments	Communautés microbiennes	plusieurs mois	Non	Pesce et al. (2009) Pesce et al. (2013) Petrić et al. (2011)	ISO 11063, ISO 14239, ISO 17601	Solutions commerciales en développement dans les sols : Aurea (https://aurea.eu)
Gammare encagés (activité AchE)	Famille (insecticides neurotoxiques)	Colonne d'eau entre 7 et 20 °C	Moléculaire	semaine	Réf théorique et seuils disponibles	Xuereb et al. (2009)	AFNOR XP T90-721 AFNOR XP T90-722-1	Outils proposés par le prestataire BIOMAE (https://biomae.fr)
Gammare encagés (inhibition alimentaire, reprotoxicité)	Type de pression (micropolluants)	Colonne d'eau entre 7 et 20 °C	Individu	~ mois	Réf théorique et seuils disponibles	Maltby et al. (2002) Coulaud et al. (2011) Geffard et al. (2010) Chaumot et al. (2020)	AFNOR XP T90-721 AFNOR XP T90-722-2 AFNOR XP T90-722-3 Brevet FR3020464	
Décomposition des litières	Global	Benthos	Écosystème	~ mois	Oui	Gessner et Chauvet (2002) Bärlocher et al. (2020)		Une partie des outils proposée par le prestataire HYFE (hyfe@ecomail.fr)
Communautés microbiennes associées aux litières	Famille (fongicides) à global	Benthos	Communautés microbiennes	~ mois	Oui	Bärlocher et al. (2020)		
Décomposition de substrats artificiels et bandes de coton	Global	Benthos et sédiments	Écosystème	~ mois	Oui	Tiegs et al. (2007) Colas et al. (2019) Pesce et al. (2020)	ISO 18311 (pour les sols)	
I ₂ M ₂	Global	Benthos en cours d'eau peu profonds	Communautés d'invertébrés	6 mois	Réf théorique disponible	Mondy et al. (2012)	AFNOR NF T90-333 AFNOR NF T90-388	Outils proposés par la plupart des bureaux d'étude en hydrobiologie
Outil de diagnostic invertébrés	Type de pression (pesticides)	Benthos en cours d'eau peu profonds	Communautés d'invertébrés	6-12 mois	Non	Mondy et Usseglio-Polatera (2013)	AFNOR NF T90-333 AFNOR NF T90-388	

Tableau 10 - Principaux avantages et verrous à l'utilisation des différents outils pour le diagnostic de l'état (chimique et biologique) des cours d'eau vis-à-vis des contaminations par les pesticides.

Outils	Intérêts principaux identifiés	Verrous identifiés et développements récents/en cours/à venir
TSP	Outils intégratifs capables de fournir une information quantitative sur la concentration en pesticides et en autres contaminants organiques dans le milieu	Les recherches actuelles visent à améliorer la robustesse de la quantification des niveaux de concentration dans le milieu, ainsi qu'à élargir la gamme de molécules recherchées
POCIS		
POCIS-MAX		
PICT	Outils biologiques permettant de détecter une exposition à des molécules spécifiques ou des familles de molécules, y compris une exposition historique n'ayant plus cours au moment du déploiement	Des recherches sont nécessaires pour mieux comprendre l'effet de l'environnement à différentes échelles spatio-temporelles (ex : mécanismes de co-tolérance pour le PICT, ancienneté de l'exposition). Un coût et des contraintes sont associées à la mesure du potentiel dégradant (manipulation de radioéléments)
Potentiel génétique et potentiel dégradant		
Biomonitoring actif par encagement de gammares	Gamme d'outils reposant sur des protocoles normalisés, et permettant de détecter des contaminations spécifiques par certains insecticides (AchE) ou de révéler plus largement la présence de micropolluants (inhibition alimentaire, reprotoxicité) via leur impact biologique témoignant d'une altération générale de la qualité du cours d'eau.	Les développements en cours visent à élargir la gamme de biomarqueurs afin de cibler de nouvelles substances (approches protéomiques)
Décomposition de la matière organique (litières végétales, substrats artificiels et bandes de coton)	Outils « low-tech » permettant de mettre en évidence des impacts écologiques à l'échelle de l'écosystème puisqu'ils impliquent des communautés de micro-organismes et d'invertébrés acteurs d'un processus écosystémique majeur.	L'opérationnalité de ces outils pourrait être encore améliorée par la normalisation des protocoles, ainsi que par la définition de valeurs théoriques de référence (travaux en cours). Pour les substrats artificiels, des recherches sont nécessaires pour mieux comprendre la réponse de l'indicateur aux variations des conditions environnementales
Communautés microbiennes associées aux litières	La biomasse fongique et la diversité des hyphomycètes aquatiques a montré un bon potentiel pour révéler des contaminations par les fongicides.	La réponse des différents outils aux conditions environnementales est trop peu maîtrisée à ce jour pour une utilisation comme bioindicateurs.
I ₂ M ₂	Ces indices biocénétiques, basés sur les communautés de macro-invertébrés, reposent sur des protocoles normalisés. L'I ₂ M ₂ est la méthode nationale réglementaire pour la caractérisation du compartiment « invertébrés aquatiques » en cours d'eau peu profonds	Les développements actuels tendent à généraliser les outils de diagnostic à une gamme plus importante de compartiments (diatomées : Larras et al. 2017 ; poissons : Dézérald et al. 2020), incluant des approches multi-compartiments, ou permettant une caractérisation plus fine des pressions (Alric et Usseglio-Polatera 2020)
Outil de diagnostic invertébrés		

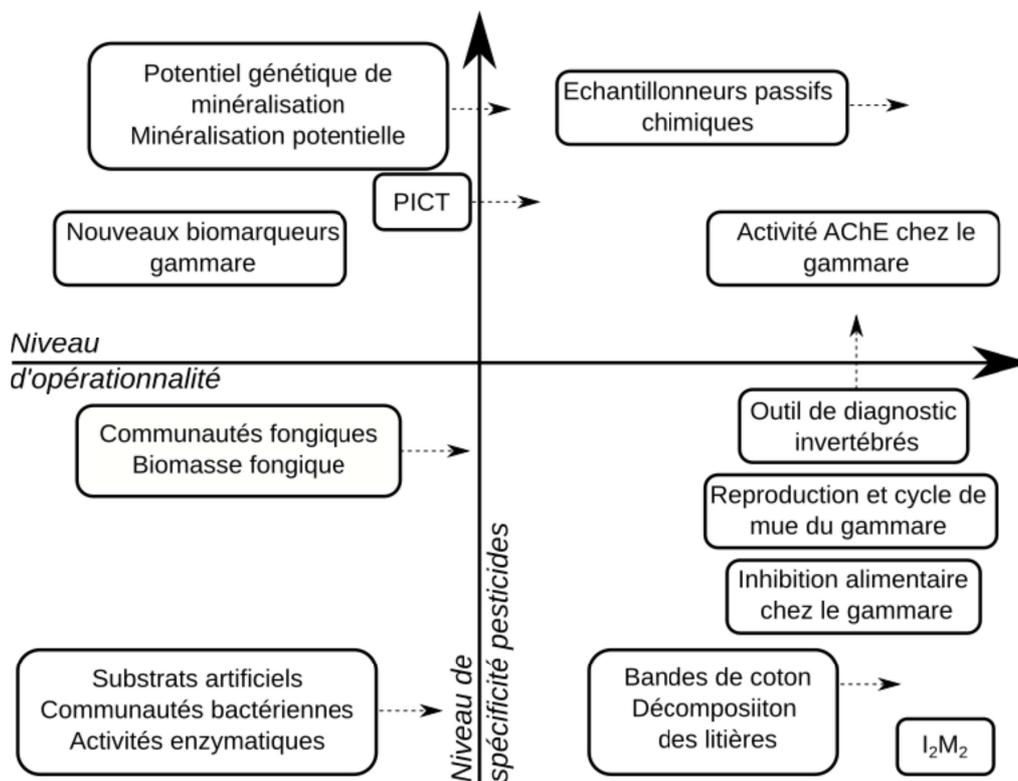


Figure 82 - Positionnement des outils selon leur niveau d'opérationnalité et leur spécificité. Le niveau d'opérationnalité intègre le recul scientifique sur les protocoles et l'utilisation de l'outil comme bio-indicateur, la maîtrise de l'effet des facteurs environnementaux (potentiellement confondants), l'existence d'opérateurs pouvant les mettre en œuvre et la normalisation des protocoles utilisés. Le niveau de spécificité indique si l'outil vise une molécule en particulier (en haut de l'axe), un type ou une famille de molécules, ou une altération biologique plus globale impliquant d'autres types de pressions. Les flèches en pointillés indiquent les améliorations en cours ou à venir visant à l'amélioration de ces outils.

4. Bilan et perspectives

Le projet Impact-CE a mis en évidence l'apport spécifique de divers outils intégratifs permettant d'obtenir une vision plus avisée de l'impact chimique et biologique des produits phytosanitaires sur les cours d'eau. Ces outils n'ont certes pas vocation à remplacer les suivis par échantillonnage ponctuel qui donnent, quant à eux, une vision instantanée plus quantitative de cette contamination. Ils apportent, en revanche, des informations plus représentatives dans le temps, ce qui en fait de meilleurs outils que l'échantillonnage ponctuel pour hiérarchiser les bassins contributifs à la contamination. Ils sont également plus robustes pour rendre compte d'évolutions interannuelles de pratiques, même s'il peut rester délicat de dissocier l'effet de changements limités de pratiques de celui de variations climatiques importantes, comme cela a été le cas dans le cadre de la comparaison inter-annuelle sur le site de la Coise.

Il serait donc intéressant de tester ou mobiliser ce set d'indicateurs pour mesurer l'effet d'actions de remédiation telles que la mise en place de zones tampons par exemple et d'évolution de pratiques agricoles - comparaison ante/post - dans des situations plus variées et plus tranchées en termes de changements que sur ce site d'étude. Réaliser une telle comparaison implique cependant de pouvoir disposer d'un diagnostic suffisamment fin des pratiques, usages agricoles et aménagements (zones tampon) afin de caractériser au mieux l'état initial et l'état évalué, et de pouvoir rendre compte de leurs évolutions aux échelles d'intérêt. La BNVD est intéressante pour rendre compte des ventes de phytosanitaires mais elle est en limite d'utilisation sur les tailles de bassins étudiés (entre 2 et 135 km²). Le recours au RPG, si besoin via l'outil RPG Explorer (Martin P. et Martin L., 2019) pour rendre compte de façon plus exhaustive des cultures et des rotations, peut fournir un proxy des pressions liées aux cultures à ces échelles, mais pour faire le lien avec les traitements chimiques effectifs, le recours à des enquêtes sur les types de protection phytosanitaires, voire les quantités réelles appliquées, serait également à envisager. Pour cela, il apparaît indispensable de travailler en forte concertation avec les structures locales (chambres d'agriculture, syndicats de rivières ou gestionnaires de la qualité de l'eau, notamment) pouvant apporter des éléments d'information dans ce sens. Il sera également important de bien identifier en parallèle les autres sources de contamination (station d'épuration, bâtis, ...) pouvant générer des impacts sur les écosystèmes aquatiques et d'adapter le choix des outils et indicateurs biologiques aux pressions suspectées. Enfin, des données complémentaires sur la pluviométrie et la débitmétrie – ou à défaut limnimétries – sur la période de suivi seront utiles afin de rendre compte de l'influence des conditions hydro-météorologiques.

Les résultats confirment également que, grâce à leur capacité d'accumulation, les échantillonneurs passifs peuvent mettre en évidence des substances « non vues » par les mesures ponctuelles car présentes en très faible quantité, comme des produits de dégradation, ou seulement mobilisées de manière fugace, lors des crues. Ils montrent aussi la plus-value de mettre en regard des informations chimiques et biologiques pour affiner le diagnostic d'impact, en asseoir la pertinence en termes de causes possibles et apporter des informations complémentaires en termes de qualité et de bon fonctionnement des écosystèmes.

En perspectives, il semble essentiel que ces outils puissent être mieux connus et appropriés par les gestionnaires de terrain, par le biais de formations mais aussi d'accompagnement. Des initiatives dans ce sens se mettent en place, notamment dans le cadre du réseau AQUAREF pour les échantillonneurs passifs en appui à l'amélioration de la surveillance pour la DCE, qui pourraient être élargies aux objectifs de diagnostics et d'évaluation de plans d'action. En ce qui concerne les outils biologiques, il existe une plus grande hétérogénéité en terme de niveau d'aboutissement et de spécificité des outils testés vis-à-vis de l'impact des produits phytosanitaires, mais tous semblent pouvoir apporter des informations utiles pour les gestionnaires.

Ce travail a permis d'identifier différentes utilisations possibles de ces outils mais ne saurait être exhaustif. Les retours d'expérience des acteurs de terrain présentés dans la synthèse mettent en avant des intérêts divers des gestionnaires pour ces derniers selon les milieux et objectifs visés. En concertation avec les opérationnels impliqués dans le projet Impact-CE, les résultats ont permis de formaliser des éléments d'aide à la meilleure compréhension et utilisation de ces outils (tableaux de

synthèse 8 et 9, fiches). Toutefois leur déploiement plus large doit passer par des efforts renforcés de normalisation des outils eux-mêmes et des protocoles de leur utilisation ainsi que par des actions de communication et de formation. Il doit également passer par une meilleure reconnaissance de ces outils au niveau des orientations de suivi nationales et européennes, pour une meilleure appréciation des risques et évaluation des plans d'actions correctives.

Du point de vue de la recherche, cette boîte à outils est aussi appelée à évoluer et à s'enrichir, par exemple, à travers une meilleure prise en compte de la diversité des modes d'actions des substances dans l'évaluation de leurs impacts et un élargissement des espèces ou des communautés considérées, pour encore améliorer la représentativité des outils vis-à-vis de la vie au sein des cours d'eau. Par ailleurs, il paraît essentiel pour un diagnostic d'impact plus global de combiner les indicateurs biocénétiques avec des indicateurs (qui restent à renforcer) permettant de juger de la bonne réalisation des fonctions essentielles des écosystèmes aquatiques. Enfin, il semble également important de soutenir le développement d'indicateurs qui permettent d'évaluer les effets sur le long terme ainsi que de réaliser des diagnostics précoces d'altération.

VIII. RÉFÉRENCES

1. Normes citées dans le texte

- AFNOR NF T90-333 : « Qualité de l'eau - Prélèvement des macro-invertébrés aquatiques en rivières peu profondes » (2016)
- AFNOR XP T90-722 : « Qualité de l'eau - Mesures moléculaires, physiologiques et comportementales chez le gammare (crustacé amphipode) » (2020)
- AFNOR NF T90-388 : « Qualité de l'eau - Traitement au laboratoire d'échantillons contenant des macro-invertébrés de cours d'eau » (2020)
- AFNOR XP T90-721 : « Encagement in situ de gammares pour la mesure de la bioaccumulation de substances chimiques » (2019)
- ISO 11063 : « Soil quality - Method to directly extract DNA from soil samples » (2012)
- ISO 14239 : « Soil quality - Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions » (2017)
- ISO 17601 : « Soil quality - Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative PCR from DNA directly extracted from soil » (2016)
- ISO 18311 : « Soil quality -- Method for testing effects of soil contaminants on the feeding activity of soil dwelling organisms - Bait-lamina test » (2016)

2. Documents cités dans le texte

- AH2D – Environnement (2008) Étude préalable à la DUP des périmètres de protection des sources de la Vigne (28) – Étude d'environnement et de vulnérabilité du bassin d'alimentation des captages – Phase 1 : Contexte naturel et délimitation du bassin d'alimentation, 93 pp
- Alric B., Usseglio-Polatera P. (2020) Diagnostic écologique multi-compartiments des cours d'eau. Action 5 : outil diagnostique « multi-compartiments » et action 6 : modèles évaluant spécifiquement le risque d'impact des cours d'eau par certaines substances chimiques particulières, Rapport Université de Lorraine (LIEC) pour l'OFB, novembre 2020, 76 p.
- Archambault V., Dumont B. (2010) L'indice biologique global normalisé (IBGN): principes et évolution dans le cadre de la directive cadre européenne sur l'eau. Sciences Eaux & Territoires, INRAE, pp. 36–39
- Baldy V., Chauvet E., Charcosset J.-Y., Gessner M. O. (2002) Microbial dynamics associated with leaves decomposing in the mainstem and floodplain pond of a large river. *Aquatic Microbial Ecology* 28, 25–36

- Bärlocher F. (2005a) Leaf mass loss estimated by the litter bag technique. In: Methods to study litter decomposition (eds: Graça MAS, Bärlocher F, Gessner MO), Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 37–42
- Bärlocher F. (2005b) Sporulation by aquatic hyphomycetes. In: Methods to study litter decomposition (eds: Graça MAS, Bärlocher F, Gessner MO), Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 185-188
- Bärlocher F., Gessner M. O, Graça M.A.S. (2020) Methods to study litter decomposition – A practical guide. Springer International Publishing, 604 pp.
- Baudoin J. M., Guérolde F., Felten V., Chauvet E., Wagner P., Rousselle P. (2008) Elevated aluminium concentration in acidified headwater streams lowers aquatic hyphomycete diversity and impairs leaf-Litter breakdown. *Microbial Ecology* 56, 260–269
- Bernard M. (2019). Déploiement large échelle du POCIS pour l'évaluation de la contamination par les pesticides dans les eaux de surface : apports et complémentarité dans le cadre des réseaux de surveillance du bassin Adour-Garonne. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, 296 pp.
- Besse J.P., Coquery M., Lopes C., Chaumot A., Budzinski H., Labadie P., Geffard O. (2013) Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters : Towards the determination of threshold values. *Water Research* 47, 650–660
- Brosed M., Lamothe S., Chauvet E. (2016) Litter breakdown for ecosystem integrity assessment also applies to streams affected by pesticides. *Hydrobiologia* 773, 87–102
- Bundschuh M., Zubrod J. P., Kosol S., Maltby L., Stang C., Duester L., Schulz R. (2011) Fungal composition on leaves explains pollutant-mediated indirect effects on amphipod feeding. *Aquatic Toxicology* 104, 32–37
- Chaumot A., Coulaud R., Adam O., Quéau H., Lopes C., Geffard O. (2020) *In situ* reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 1—Gauging the confounding influence of temperature and water hardness. *Environmental Toxicology and Chemistry* 39, 667–677
- Chaumot A., Geffard O., Armengaud J., Maltby L. (2015) Gammarids as reference species for freshwater monitoring. In : *Aquatic Ecotoxicology: Advancing tools for dealing with emerging risks* (eds : Mouneyrac C., Amiard-Triquet C., Amiard J-C.), Academic Press, pp. 253–280
- Chéron S., Heudre D., Bonninau C., Morin S., Guérolde F., Felten V., Laviale M. (2019). Evaluation du potentiel tératogène du glyphosate sur les diatomées benthiques d'eau douce : le cas d'un petit cours d'eau vosgien (La Cleurie). Communication orale. 38^{ème} colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française
- Colas F., Baudoin J.-M., Gob F., Tamisier V., Valette L., Kreutzenberger K., Lambrigot D., Chauvet E. (2017) Scale dependency in the hydromorphological control of a stream ecosystem functioning. *Water Research* 115, 60–73

- Colas F., Woodward G., Burdon F.J., Guérolde F., Chauvet E., Cornut J., Cébron A., Clivot H., Danger M., Danner M. C., Pagnout C., Tiegs S. D. (2019) Towards a simple global-standard bioassay for a key ecosystem process: organic-matter decomposition using cotton strips. *Ecological Indicators* 106, 105466
- Cornet S., Franceschi N., Bauer A., Rigaud T., Moret Y. (2009) Immune depression induced by acanthocephalan parasites in their intermediate crustacean host: Consequences for the risk of super-infection and links with host behavioural manipulation. *International Journal for Parasitology* 39, 221–229
- Coulaud R., Geffard O., Xuereb B., Lacaze E., Quéau H., Garric J., Charles S., Chaumot A. (2011) *In situ* feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Research* 45, 6417–6429
- Crouzet O., Batisson I., Besse-Hoggar P., Bonnemoy F., Bardot C., Poly F., Bohatier J., Mallet C. (2010) Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: A dose-effect microcosm approach. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 193–202
- Dang C. K., Gessner M. O., Chauvet E. (2007) Influence of conidial traits and leaf structure on attachment success of aquatic hyphomycetes on leaf litter. *Mycologia* 99, 24–32
- Dézérald O., Mondy C. P., Dembski S., Kreutzenberger K., Reyjol Y., Chandesris A., Valette L., Brosse S., Toussaint A., Belliard J., Merg M.-L., Usseglio-Polatera P. (2020) A diagnosis-based approach to assess specific risks of river degradation in a multiple pressure context: Insights from fish communities. *Science of the Total Environment* 734, 139467
- Duan Y., Liu P., Li J., Wang Y., Li J., Chen P. (2014) Molecular responses of calreticulin gene to *Vibrio anguillarum* and WSSV challenge in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Fish & Shellfish Immunology* 36, 164–71
- Duarte S., Pascoal C., Alves A., Correia A., Cássio F. (2007) Copper and zinc mixtures induce shifts in microbial communities and reduce leaf litter decomposition in streams. *Freshwater Biology* 53, 91–101
- Farkas R., Daniš P., Medved'ová L., Mechler B. M., Knopp J. (2002) Regulation of cytosolic malate dehydrogenase by juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*. *Cell Biochemistry and Biophysics* 37, 37–52
- Faugère J., Gouveia D., Ayciriex S., François A., Chaumot A., Almunia C., Armengaud J., Lemoine J., Geffard O., Degli Esposti D., Salvador A. (2020) High-multiplexed monitoring of protein biomarkers in the sentinel *Gammarus fossarum* by Targeted Scout-MRM assay, a new vision for ecotoxicoproteomics. *Submitted*
- Fauvelle V., Mazzella N. (2013) Application du POCIS pour l'échantillonnage des pesticides acides dans les eaux de surface : proposition d'une résine échangeuse d'anions comme phase réceptrice. Aquaref, fiche ME-152 – Echantillonnage passif des herbicides anioniques, 7 pp

- Ferreira V., Castagneyrol B., Koricheva J., Gulis V., Chauvet E., Graça M.A.S. (2015) A meta-analysis of the effects of nutrient enrichment on litter decomposition in streams: Nutrient enrichment and litter decomposition. *Biological Reviews* 90, 669–688
- Ferreira V., Koricheva J., Duarte S., Niyogi D. K., Guérol F. (2016) Effects of anthropogenic heavy metal contamination on litter decomposition in streams – A meta-analysis. *Environmental Pollution* 210, 261–270
- Geffard O., Xuereb B., Chaumot A., Geffard A., Biagiatti S., Noel C., Abbaci K., Garric J., Charmantier G., Charmantier-Daures M. (2010) Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: application for reproductive toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29, 2247-2259
- Gessner M. O. (2005) Ergosterol as a measure of fungal biomass In: *Methods to study litter decomposition* (eds: Graça MAS, Bärlocher F, Gessner MO), Springer, Dodrecht, The Netherlands, pp. 189-195
- Gessner M. O., Chauvet E. (2002) A case for using litter breakdown to assess functional stream integrity. *Ecological Applications* 12, 498–510
- Gessner M.O., Chauvet E. (1993) Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 502–507
- Ghestem J.P., Togola A., Lardy-Fontan S., Guigues N., Tixier C., Larose A., Miège C. (2015) Recommandations pour garantir la qualité des données de surveillance par échantillonnage passif. Rapport AQUAREF, 45pp.
- Gouveia D., Chaumot A., Charnot A, Almunia C., François A., Navarro L. Armengaud J., Salvador A., Geffard O. (2017) Ecotoxic-Proteomics for aquatic environmental monitoring : first *in situ* application of a new proteomics – based multibiomarker assay using caged amphipods. *Environmental Science and Technology*. 52, 13417–13426
- Grenier H., Gouy V., Pesce S., Assoumani A., Margoum C., M. Coquery, A. Larrose, A. Dabrin, Geffard O., Chaumot A., Jubeaux G., Mazzella N., Morin S. (2014) Evaluation de la qualité chimique et biologique des cours d'eau vis-à-vis des produits phytosanitaires : Intérêts et limites des capteurs échantillonneurs passifs et d'outils d'évaluation d'impact biologique. Irstea, 82 pp
- Groebe K., Hayess K., Klemm-Manns M., Schwall G., Wozny W., Steemans M., Peters A. K., Sastri C., Jaeckel P., Stegmann W., Zengerling H., Schopf R., Poznanovic S., Stummann T. C., Seiler A., Spielmann H., Schratzenholz A. (2010) Protein biomarkers for *in vitro* testing of embryotoxicity. *Journal of Proteome Research* 9 5727–5738
- Gulis V., Marvanová L., Descals E. (2005) An illustrated key to the common temperate species of aquatic hyphomycetes In: *Methods to study litter decomposition* (eds: Graça MAS, Bärlocher F, Gessner MO), Springer, Dodrecht, The Netherlands, pp. 153–167
- Hieber M. G., Gessner M. O. (2002) Contribution of stream detritivores, fungi and bacteria to leaf breakdown based on biomass estimates. *Ecology* 83, 1026–1038

- Huang Y., Hui K., Jin M., Yin S., Wang W., Ren Q. (2016) Two endoplasmic reticulum proteins (calnexin and calreticulin) are involved in innate immunity in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Scientific Reports* 6, 27578
- Ingold C. T. (1942) Aquatic hyphomycetes of decaying alder leaves. *Transactions of the British Mycological Society* 25, 339–417
- Janssens L., Stoks R. (2014) Chronic predation risk reduces escape speed by increasing oxidative damage: A deadly cost of an adaptive antipredator response. *PloS One* 9, e101273
- Kampfraath A. A., Hunting E. R., Mulder C., Breure A. M., Gessner M. O., Kraak M. H. S., Admiraal W. (2012) DECOTAB: A multipurpose standard substrate to assess effects of litter quality on microbial decomposition and invertebrate consumption. *Freshwater Science* 31, 1156–1162
- Kratz, W. (1998) The bait-lamina test: General aspects, applications and perspectives. *Environmental Science and Pollution Research* 5, 94–96
- Kunz P., Kienle C., Gerhardt A. (2010). *Gammarus spp.* in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: toward integrated multilevel tests. In : *Reviews of environmental contamination and toxicology*, Volume 205 (ed : Whitacre DM), Springer, New York, pp. 1–76
- Lardy-Fontan S. et al. (2018a) Mise en place de l'Assurance Qualité pour les échantillonneurs intégratifs passifs - Projet de Guide Technique d'Accréditation pour les opérations d'échantillonnage et d'analyse des Échantillonneurs Intégratifs Passifs dans les eaux. Rapport AQUAREF, 29p.
- Lardy-Fontan S. et al. (2018b) Former les acteurs de la surveillance aux Échantillonneurs Intégratifs Passifs (EIP). Rapport d'avancement AQUAREF, 19p.
- Larras F., Coulaud R., Gautreau E., Billoir E., Rosebery J., Usseglio-Polatera P. (2017) Assessing anthropogenic pressures on streams: A random forest approach based on benthic diatom communities. *Science of the Total Environment* 586, 1101–1102
- Le Dréau M., Chaumot A., Foulquier A., François A., Geffard O., Margoum C., Pesce S., Martin C., Mazzella N., Gouy V. (2015) Outils intégratifs pour évaluer l'impact des pratiques phytosanitaires sur les cours d'eau. *Innovations agronomiques* 46, 51–61
- Le Dréau M., Margoum M., Guillemain C., Martin A., Liger L., Mazzella N., Gouy V. (2018) Les échantillonneurs passifs pour évaluer la contamination en pesticides des eaux de surface : intérêts et limites actuelles au transfert opérationnel vers les gestionnaires. Actes du 48ème congrès du Groupe Français des Pesticides, 30 mai-1er juin 2018, Limoges
- Legendre P., Legendre L. (1998) *Numerical Ecology*, Elsevier, Amsterdam, 852 pp
- Lissalde S., Mazzella N., Mazellier P. (2014) Polar organic chemical integrative samplers for pesticides monitoring: Impacts of field exposure conditions. *Science of the Total Environment* 488/489, 188–196

- Lopes C., Chaumot A., Xuereb B., Coulaud R., Jubeaux G., Quéau H., François A., Geffard O. (2020) *In situ* reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 2– Evaluating the relevance of using a molt cycle temperature-dependent model as a reference to assess toxicity in freshwater monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39, 678–691
- Maltby L., Clayton S. A., Wood R. M., McLoughlin N. (2002) Evaluation of the *Gammarus pulex in situ* feeding assay as a biomonitor of water quality: Robustness, responsiveness, and relevance. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 361–368
- Margoum C., Guillemain C., Yang X., Coquery M. (2013) Stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of pesticides in water samples: Method validation and measurement uncertainty. *Talanta* 116, 1–7
- Martin A. (2016). Développement de matériaux innovants à base d'élastomère de silicone pour l'échantillonnage passif de pesticides dans les eaux de surface et de subsurface. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon I
- Martin A., Margoum C., Jolivet A., Assoumani A., Moujahid B. E., Randon J., Coquery M. (2018) Calibration of silicone rubber rods as passive samplers for pesticides at two different flow velocities: modelling of sampling rates under water boundary layer and polymer control. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37, 1208–1218
- Martin A., Margoum C., Randon J., Coquery M. (2016) Silicone rubber selection for passive sampling of pesticides in water. *Talanta* 160, 306–313
- Martin P., Martin L. (2019) RPG Explorer : un outil pour comprendre les dynamiques d'occupation des terres agricole. PollDiff'Eau, Lille, France
- Mathon B., Togola A., Mazzella N., Lardy-Fontan S., Dabrin A., Allan I., Ghestem J.-P., Tixier C., Gonzalez J.-L., Dherret L., Yari A., Richard L., Moreira A., Eon M., Delest B., Noel-Chery E., El Mossaoui M., Alasonati E., Miège C. (2017) Surveillance prospective – évaluation de la pertinence des échantillonneurs intégratifs passifs (EIP) pour la surveillance des milieux aquatiques – Campagnes *in situ* mises en œuvre. Rapport AQUAREF, 23 pp.
- Mazzella N., Coquery M., Miège C., Berho C., Ghestem J.-P., Togola A., Gonzalez J.-L., Tixier C., Lardy-Fontan S. (2011) Applicabilité des échantillonneurs passifs dans le cadre de la DCE. Rapport Aquaref, 80 pp.
- Mondy C. P., Usseglio-Polatera P. (2013) Using conditional tree forests and life history traits to assess specific risks of stream degradation under multiple pressure scenario. *Science of the Total Environment* 461/462, 750–760
- Mondy C.P., Villeneuve B., Archaimbault V., Usseglio-Polatera P. (2012) A new macroinvertebrate-based multimetric index (I_2M_2) to evaluate ecological quality of French wadeable streams fulfilling the WFD demands: A taxonomical and trait approach. *Ecological Indicators* 18, 452–467

- Moshtaghi A., Rahi M. L., Mather P. B., Hurwood D. A. (2017) Understanding the genomic basis of adaptive response to variable osmotic niches in freshwater prawns: A comparative intraspecific RNA-Seq analysis of *Macrobrachium australiense*. *Journal of Heredity* 108, 544–552
- Muthukrishnan S., Merzendorfer H., Arakane Y., Yang Q. (2019) Chitin organizing and modifying enzymes and proteins involved in remodeling of the insect cuticle. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1142, 83–114
- Naldéo (2012, 2014, 2016). Suivi de la qualité des eaux captage de Villevieux. Rapports du bureau études Naldéo, année 2011-2012, 2013-2014, 2015-2016
- Nilsson A. N. (2005) Aquatic insects of north Europe: a taxonomic handbook - Volume 1/2, Apollo Books, Stenstrup, Denmark
- Pabst M. J., Habig W. H., Jakoby W. B. (1974) Glutathione S-Transferase A – A novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration. *The Journal of Biological Chemistry* 249, 7140–7148
- Pascoal C., Cássio F., Marvanová L. (2005) Anthropogenic stress may affect aquatic hyphomycete diversity more than leaf decomposition in a low-order stream. *Archiv für Hydrobiologie* 162, 481–496
- Pesce S., Bardot C., Lehours A. C., Batisson I., Bohatier J., Fajon C. (2008) Effects of diuron in microcosms on natural riverine bacterial community composition: new insight into phylogenetic approaches using PCR-TTGE analysis. *Aquatic Sciences* 70, 410–418
- Pesce S., Campiche S., Casado-Martinez C., Ahmed A. M., Bonnineau C., Dabrin A., Lyautey E., Ferrari B. J. D. (2020) Towards simple tools to assess functional effects of contaminants on natural microbial and invertebrate sediment communities. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 6680–6689
- Pesce S., Ghiglione J. F., Martin-Laurent F. (2017) Microbial communities as indicators of ecosystem recovery following chemical pollution. *In : Microbial Ecology* (Cravo-Laureau C., Duran R., Cagnon C. & Lauga B. eds), Springer, pp. 227–250
- Pesce S., Margoum C., Foulquier A. (2016) Pollution-induced community tolerance for *in situ* assessment of recovery in river microbial communities following the ban of the herbicide diuron. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 221, 79–86
- Pesce S., Margoum C., Montuelle B. (2010) *In situ* relationships between spatio-temporal variations in diuron concentrations and phototrophic biofilm tolerance in a contaminated river. *Water Research* 44, 1941–1949
- Pesce S., Margoum C., Rouard N., Foulquier A., Martin Laurent F. (2013) Freshwater sediment pesticide biodegradation potential as an ecological indicator of microbial recovery following a decrease in chronic pesticide exposure : A case study with the herbicide diuron. *Ecological Indicators* 29, 18–25

- Pesce S., Margoum C., Rouard N., Martin Laurent F., Montuelle B. (2009) Adaptation microbienne aux changements spatio-temporels d'exposition aux pesticides en cours d'eau. 39^{ème} congrès du groupe français des pesticides, Mai 2009, Toulouse, France
- Petric I., Philippot L., Abbate C., Bispo A., Chesnot T., Hallin S., Laval K., Lebeau T., Lemanceau P., Leyval C., Lindström K., Pandard P., Romero E., Sarr A., Schloter M., Simonet P., Smalla K., Wilke B.-M., Martin-Laurent F. (2011) Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 « Soil quality – Method to directly extract DNA from soil samples. *Journal of microbiological methods* 84, 454–460
- Phyt'eauvergne (2014) Eau et produits phytosanitaires - Qualité des eaux en Auvergne - 2004 – 2012
- Rasmussen J. J., Wiberg-Larsen P., Baattrup-Pedersen A., Monberg R. J., Kronvang B. (2012) Impacts of pesticides and natural stressors on leaf litter decomposition in agricultural streams. *Science of the Total Environment* 416, 148–155
- Romaní A. M., Fischer H., Mille-Lindblom C., Tranvik L. J. (2006) Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter : differential extracellular enzyme activities. *Ecology* 87, 2559–2569
- Rossi F., Artigas J., Mallet C. (2017) Recovery assessment of leaf-associated fungal communities in polluted streams. *Freshwater Biology* 62, 1207–1219
- Schäfer R. B., Caquet T., Siimes K., Mueller R., Lagadic L., Liess M. (2007) Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. *Science of the Total Environment* 382, 272–285
- SMVVA (2015). Ruisseau du Charlet. Etat des lieux dans le cadre de la phase de présélection du Contrat Territorial. 97 pp
- Solé M., Fetzer I., Wennrich R., Sridhar K. R., Harms H., Krauss G. (2008) Aquatic hyphomycete communities as potential bioindicators for assessing anthropogenic stress. *Science of The Total Environment* 389, 557–565
- Tachet H., Richoux P., Bournaud M., Usseglio-Polatera P. (2010) Invertébrés d'eau douce : systématique, biologie, écologie. CNRS éditions. Paris, 607 pp
- Tiegs S. D., Clapcott J. E., Griffiths N. A., Boulton A. J. (2013) A standardized cotton-strip assay for measuring organic-matter decomposition in streams. *Ecological Indicators* 32, 131–139
- Tiegs S. D., Langhans S. D., Tockner K., Gessner M. O. (2007) Cotton strips as a leaf surrogate to measure decomposition in river floodplain habitats. *Journal of the North American Benthological Society* 26, 70–77
- Tlili A., Berard A., Blanck H., Bouchez A., Cássio F., Eriksson K. M., Morin S., Montuelle B., Navarro E., Pascoal C., et al. (2016). Pollution-induced community tolerance (PICT): towards an ecologically relevant risk assessment of chemicals in aquatic systems. *Freshwater Biology* 61, 2141–2151

- Törne E. (1990). Assessing feeding activities of soil-living animals. I. Bait-lamina-tests. *Pedobiologia* 34, 89–101
- Ville de Lons-le-Saunier (2012). Résultats de la campagne de prélèvements d'eaux brutes superficielles (Sept. 2011- Aout 2012) sur le bassin d'alimentation du captage d'eau potable de Villevieux. 33 pp
- Waldrop M. P., Zak D. R., Sinsabaugh R. L., Gallo M., Lauber C. (2004) Nitrogen deposition modifies soil carbon storage through changes in microbial enzymatic activity. *Ecological Applications* 14, 1172–1177
- Wallace J. B., Eggert S. L., Meyer J. L., Webster J. R. (1997) Multiple trophic levels of a forest stream linked to terrestrial litter inputs. *Science* 277, 102–104
- Waringer J., Graf W. (2011) Atlas of the central european Trichoptera larvae. Erik Mauch Verlag, 468 pp.
- Xuereb B., Chaumot A., Mons R., Garric J., Geffard O. (2009a). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. *Aquatic Toxicology* 93, 225–233
- Xuereb B., Lefèvre E., Garric J., Geffard O. (2009b) Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicology* 94, 114–122

IX. ANNEXES

Annexe 1 - Liste des outils mis en œuvre. Les outils plus prospectifs sont en italique

Outil	Paramètres mesurés	Équipe responsable
Outils de mesure chimique : échantillonneurs passifs		
TSP, POCIS, POCIS-Max	<ul style="list-style-type: none"> - Masses de substances accumulées sur l'échantillonneur et concentrations estimées dans l'eau pour les substances bénéficiant d'une calibration - <i>Masses de substances accumulées sur l'échantillonneur et concentrations estimées dans l'eau pour substances polaires - -</i> - <i>Évaluation de l'intérêt d'une approche analytique suspectée</i> 	INRAE UR Rivery (LAMA) et UR EABX (CARMA)
Outils de biomonitoring actif : échelle des individus		
Gammarés engagés	<ul style="list-style-type: none"> - Mesure de l'inhibition de l'AcHé, de l'inhibition de l'alimentation et de la perturbation de la mue - <i>Évaluation de la possibilité de compléter les biomarqueurs mesurés sur le gammaré par des biomarqueurs ciblant d'autres modes d'action insecticide</i> 	INRAE UR Rivery (Ecotox)
Outils de biomonitoring passif : échelle des communautés microbiennes et invertébrés		
Communautés périphtiques naturelles	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Test PICT (herbicides présentant différents modes d'action) pour 3 à 4 substances organiques de référence et le cuivre (par rapport à ses usages fongicides) choisis comme « représentatives » de certains modes d'action (hypothèse de co-tolérance)</i> 	INRAE UR Rivery (EMA)
Communautés de macro-invertébrés et microbiennes benthiques	<ul style="list-style-type: none"> - Décomposition de litière dans la colonne d'eau avec des mailles fines et des mailles larges : - Mesure des taux de sporulation (comme mesure d'activité fongique), identification morphologique des spores (comme mesure de la structure et de la composition des communautés fongiques) - Détermination de la biomasse mycélienne - Détermination des densités et biomasse et identification des invertébrés détritivores - <i>Mesures d'activités d'enzymes extracellulaires impliquées dans la dégradation des principaux polymères des litières végétales: lignine (activité laccase), hemicellulose (activité β-xylosidase) et cellulose (activité cellobiohydrolase)</i> - <i>Détermination de la structure des communautés bactériennes (approches moléculaires par PCR-DGGE)</i> 	<p>CNRS (Ecolab)</p> <p>Université Blaise Pascal (LMGE)</p>
Communautés microbiennes benthiques	<ul style="list-style-type: none"> - Décomposition de substrats artificiels (inspirés des modèles Decotab et Bait Lamina - Décomposition de substrats artificiels (bandes de coton) dans la colonne d'eau : mesure de la résistance à l'étirement 	<p>INRAE UR Rivery (EMA)</p> <p>Université de Lorraine (LIEC)</p>
Communautés microbiennes du sédiment	<ul style="list-style-type: none"> - Quantification du potentiel génétique dégradant de pesticides vis-à-vis de substances de la famille des urées substituées (diuron, isoproturon, linuron) (ISO 11063), (mesure de l'abondance de gènes microbiens codant des enzymes de dégradation à partir de l'ADN extrait des sédiments) 	UMR Agroécologie, INRAE Dijon, en lien avec le projet IMPEC (Programme Pesticides APR 2011)

Annexe 2 - Équipes de recherche et personnel impliqués dans le projet

Organisme	Équipes
INRAE, Lyon Villeurbanne	<p>Riverly <i>Pollutions Diffuses (PollDiff)</i> Véronique Gouy Guy le Hénaff Clotaire Catalogne Nadia Carluer Lucie Liger Matthieu Le Dréau Vincent Tardy Camille Legrand</p> <p><i>Laboratoire de Chimie des Milieux Aquatiques (LAMA)</i> Christelle Margoum Céline Guillemain Aymeric Dabrin Lysiane Dherret Matthieu Masson Corine Brosse Myriam Arhror</p> <p><i>Ecotoxicologie Microbienne Aquatique (EMA)</i> Stéphane Pesce Chloé Bonnineau Bernadette Volat Bernard Motte Christophe Rosy Anaïs Charton</p> <p><i>Ecotoxicologie (Ecotox)</i> Arnaud Chaumot Olivier Geffard Adeline François Nicolas Delorme Hervé Quéau Laura Garnerio Patrice Noury Davide Degli Espoti</p>
INRAE, Bordeaux	<p>UR Ecosystèmes aquatiques et changements globaux : <i>Contaminants Anthropiques et Réponses des Milieux Aquatiques (CARMA)</i> Nicolas Mazzella Soizic Morin Brigitte Delest Aurélie Moreira</p>
Université de Lorraine, Metz	<p>Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC) – UMR 7360 : François Guérolde Philippe Usseglio-Polatera Jérémy Jabiol Jonathan Bouquerel Quentin Bachelet Philippe Wagner</p>
CNRS Toulouse	<p>Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement (Ecolab) – UMR 5245 : Eric Chauvet Sylvain Lamothe Didier Lambrigot</p>
Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand	<p>Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (LMGE) – UMR 6023 : Joan Artigas Florence Donnadiou</p>
INRAE, Dijon	<p>UMR 1347 Agroécologie : Fabrice Martin-Laurent Jérémy Béguet Marion Devers-Lamrani Nadine Rouard</p>

Annexe 3 - Contacts locaux sur les sites d'application

Organisme	Interlocuteur	Site
SIMA Coise (St Galmier)	Justine Lagrevol Yves Piot	Coise, Monts du Lyonnais
Syndicat Mixte des Vallées de la Veyre et de l'Auzon (SMVVA), St Saturnin	Anne Gaëlle Touminet	Charlet, plaine de la Limagne
Eau de Paris	Frédéric Barrez	AAC de La Vigne (Bassin parisien)
Ville de Lons-le-Saunier	Christine Combe	AAC de Lons-le-Saunier

Annexe 4 - Liste des molécules recherchées par type d'échantillonneur, nature, propriétés et données de toxicité (NOEC) pour les poissons (F), les invertébrés (I) et les algues (A).

Molécule	Classe	Famille chimique	log Kow	TSP	POCIS	P-MAX	NOEC_F	NOEC_I	NOEC_A
2,4-D	H	Aryloxyacides	-0,82			X	27,2	46,2	100
3,4-dichloroaniline	Métabolite Herbicide	Amine	2,69	X			0,005	0,005	1
Acétochlore	H	Chloroacétamide	4,14	X	X		0,13	1,9	0,00059
Acétochlore OA	Métabolite de l'Acétochlore	-	-			X		120	32
Alachlore	H	Chloroacétamide	3,09		X		0,19	0,22	0,02
Atrazine	H	Triazine	2,7	X	X		2	0,25	0,1
Azoxystrobine	F	Strobuline	2,5	X	X		0,147	0,044	0,8
Bentazone	H	Diazinone	-0,46			X	48	101	25,7
Boscalide	F	Amide	2,96	X			0,125	1,3	
Carbaryl	I	Carbamate	2,36		X		0,21	0,25	
Carbendazime	F	Benzimidazole	1,48	X	X		0,0032	0,0015	
Carbofuran	I	Carbamate	1,8		X		0,0022	0,008	3,2
Chlorfenvinphos	I	Organophosphoré	3,8	X			0,03	0,0001	1
Chlorpyriphos-ethyl	I	Organophosphoré	4,7	X			0,00014	0,0046	0,043
Chlorpyriphos-methyl	I	Organophosphoré	4	X			0,005	1E-05	
Chlorsulfuron	H	Sulonylurées	-0,99			X	32	12	
Chlortoluron	F	Urée substituée	2,5	X	X		0,4	16,7	0,001
Cyproconazole	F	Triazole	3,09		X		0,65	0,023	0,021
DCPMU	Métabolite du Diuron	-	-	X	X				
DCPU	Métabolite du Diuron	-	2,35		X				
DEA (Déséthyl atrazine)	Métabolite de l'atrazine	Triazine	1,51		X				
DET (Déséthyl terbuthylazine)	Métabolite du terbuthylazine	-	2,3		X		0,09	0,019	
DIA (Désisopropyl atrazine)	Métabolite de l'atrazine	Triazine	1,15		X				
Dicamba	H	Acide benzoïque	-1,88			X	180	97	25
Dichloprop	H	Aryloxyacides	2,29			X			180
Diclofop	H	Aryloxyacides	1,61			X	16	0,0156	
Diflufenicanil	H	Amide	4,2	X			0,015	0,052	0,0001
Dimethachlore	H	Chloroacétamide	2,17		X		0,85	2,3	
Dimethanamide-P	H	Chloroacétamide	1,89		X		2,5	1,25	
Dimethoate	I	Organophosphoré	0,71		X		0,4	0,04	32
Diméthomorphe	F	Morpholine	2,68	X	X		0,056	0,22	9,8

Annexe 4 (suite)

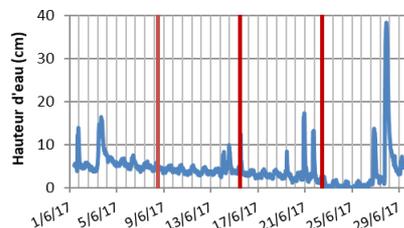
Molécule	Classe	Famille chimique	log Kow	TSP	POCIS	P-MAX	NOEC_F	NOEC_I	NOEC_A
Fenoprop	H	Aryloxyacides	3,8			X			
Flufénoxuron	I	Urée substituée	5,11	X			0,00082	7E-05	
Flurtamone	H	Pyridazinone	3,2		X		0,63	0,071	
Flusilazole	F	Triazole	3,87		X		0,023	0,27	1
Hexazinone	H	Triazinone	1,17		X			50	
Imidaclopride	I	Néonicotinoïde	0,57		X		9,02	1,8	10
Iodosulfuron	H	Sulonylurées	1,6			X			
Ioxynil	H	Benzonitrile	2,2			X	3,2	0,013	
IPPMU	Métabolite de l'Isoproturon	-	-		X				
IPPU	Métabolite de l'Isoproturon	-	-		X				
Irgarol (cybutryne)	Biocide, antifouling	Triazine	3,95		X				
Isoproturon	H	Urée substituée	2,5	X	X		1	0,12	0,052
Kresoxim-méthyl	F	Strobilurine	3,4		X		0,013	0,032	
Linuron	H	Urée substituée	3	X	X		0,1	0,18	0,01
MCPA	H	Aryloxyacides	-0,81			X	15	50	60
Mecoprop	H	Aryloxyacides	-0,19			X	109	22	56
Mésotrione	H	Tricétone	0,11			X	12,5	180	
Metazachlore	H	Chloroacétamide	2,49		X		2,15	0,1	0,34
Methomyl	I	Carbamate	0,09		X		0,0076	0,0016	
Métolachlore	H	Chloroacétamide	3,4	X	X			0,707	
Métolachlore OA	Métabolite du Métolachlore	-	-			X			
Metoxuron	H	Urée	1,6		X				0,017
Metsulfuron-méthyl	H	Sulonylurées	-1,87			X			
Nicosulfuron	H	Sulonylurées	0,61			X	10	5,2	7,8
Norflurazon	H	Pyridazinone	2,45	X	X				
Norflurazon-desméthyl	Métabolite du Norflurazon	Pyridazinone	-	X	X				
Procymidone	F	Imide	3,3	X			0,48	0,99	
Pyrimicarb	I	Carbamate	1,7		X		18	0,0009	50
Simazine	H	Triazine	2,3	X	X		0,7	2,5	0,6
Spiroxamine	F	Morpholine	2,89	X	X		0,014	0,1	0,0002
Sulcotrione	H	Tricétone	-1,7			X	3,2	75	
Tébuconazole	F	Triazole	3,7	X	X		0,012	0,01	0,1

Annexe 5 - Résultats des suivis par échantillonneurs passifs sur chaque site

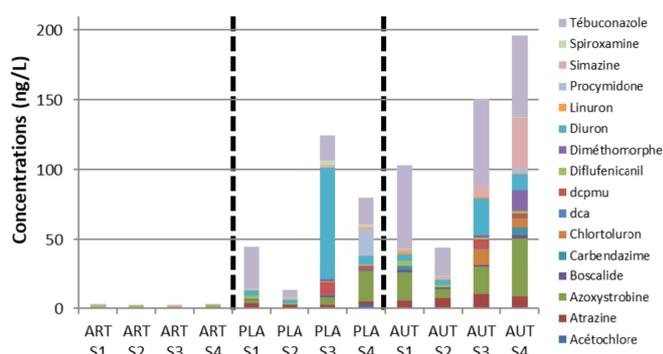
CHARLET :

Campagne du 01/06 au 29/06/17 :

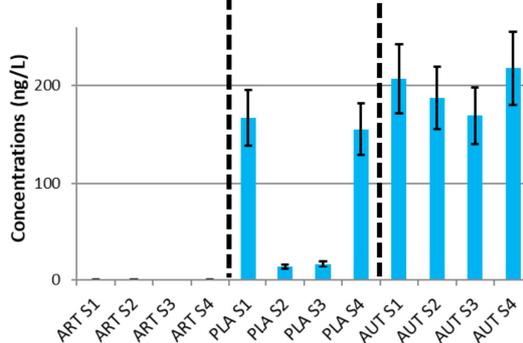
Hauteur d'eau à Authezet - Irstea



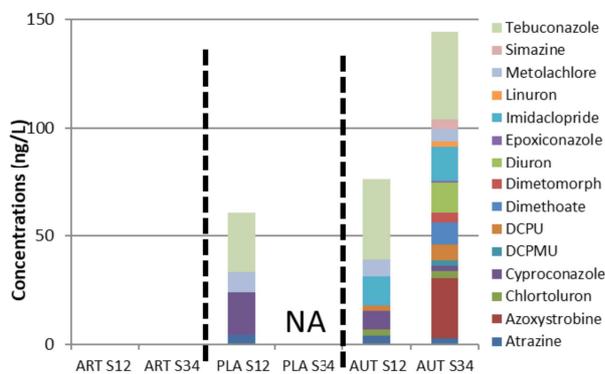
TSP (hors métolachlore)



Métolachlore

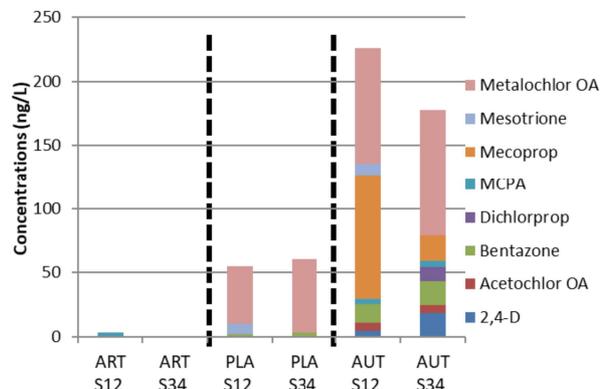


POCIS HLB



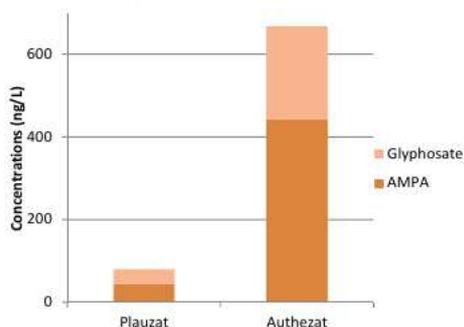
Plauzat S34 : mauvaise désorption du PRC

POCIS MAX



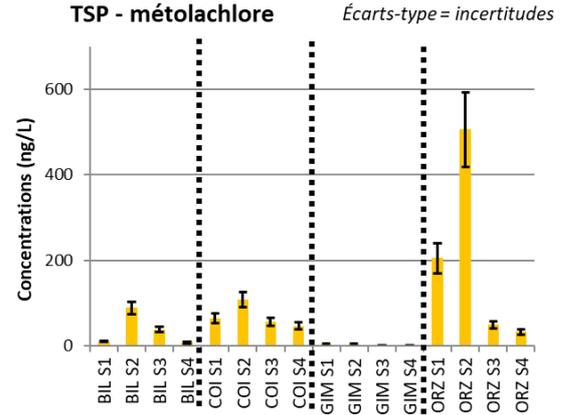
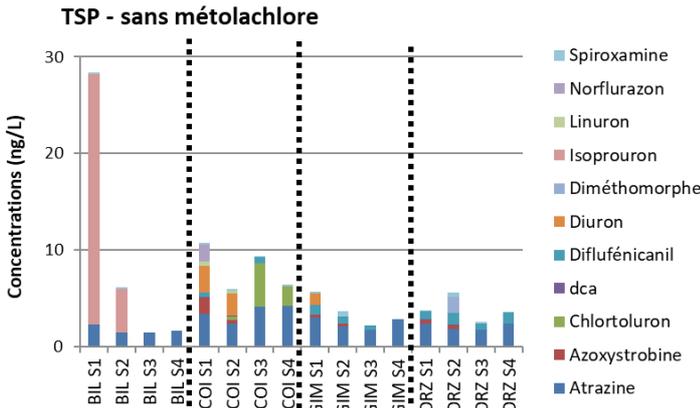
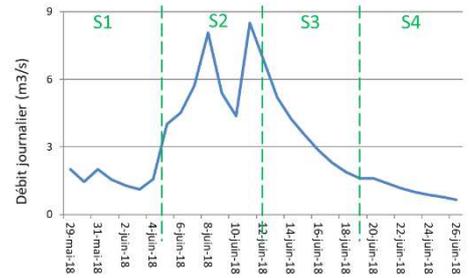
Mesures ponctuelles de glyphosate et AMPA réalisés par le SMVVA :

Echantillons ponctuels (SMVVA – 19/06/2017)

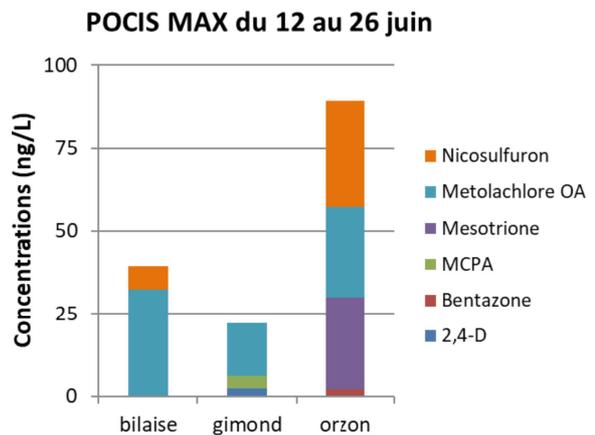
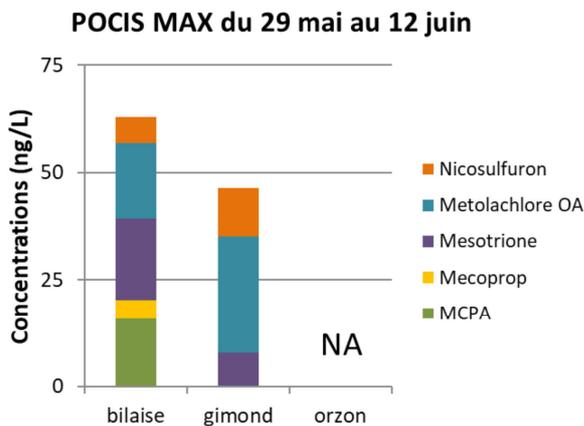
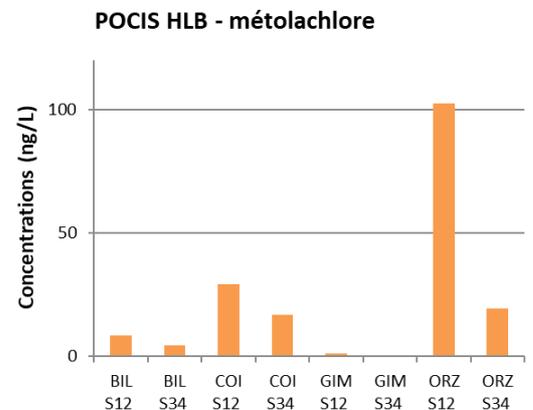
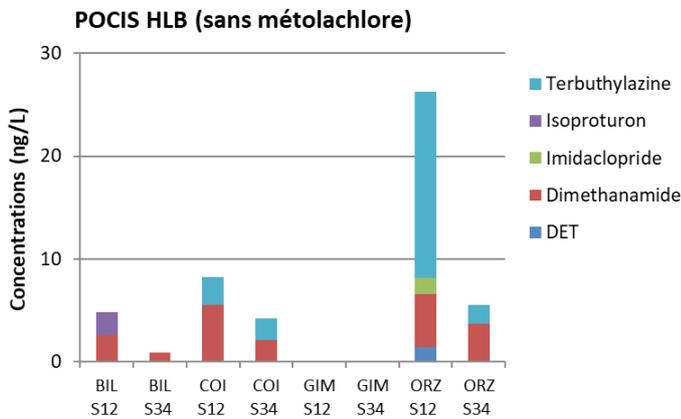


COISE 2018 :
Campagne du 29/05 au 26/06/2018

Débits de la Coise à Saint-Médard-en-Forez
 Station K0673310 – DREAL Rhone-Alpes



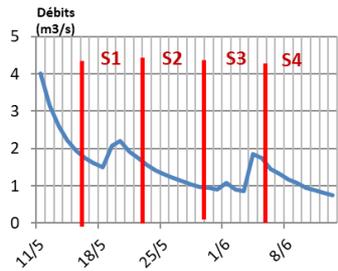
S1 = 29/05 au 05/06 ; S2 = 05/06 au 12/06 ; S3 = 12/06 au 19/06 ; S4 = 19/06 au 26/06



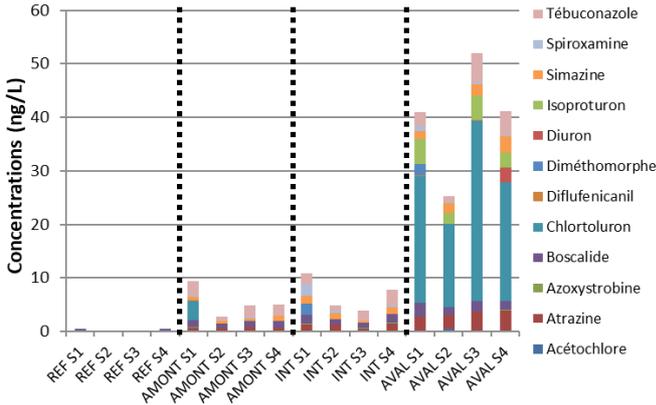
LONS-LE-SAUNIER

Campagne printemps = du 16/05 au 13/06/17

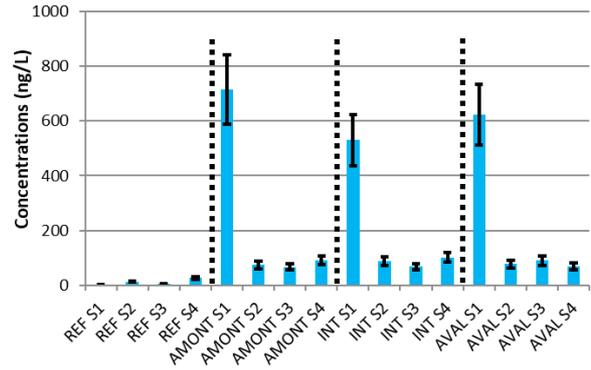
Débites de la Seille = DREAL Bourgogne



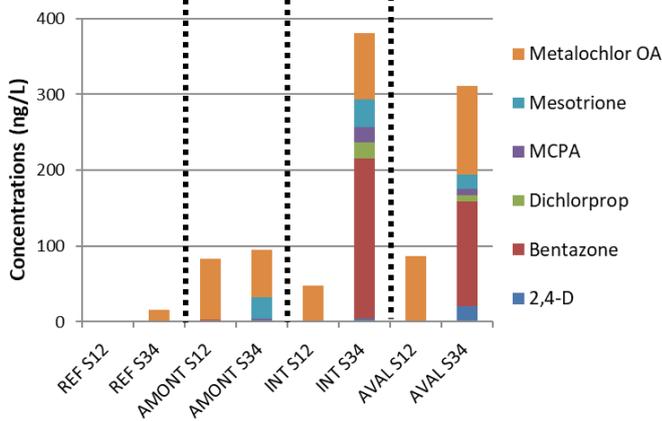
Printemps : TSP (hors métolachlore)



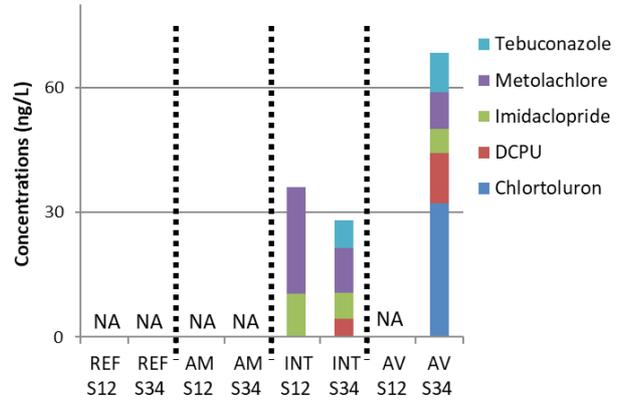
Métolachlore



Printemps : POCIS MAX



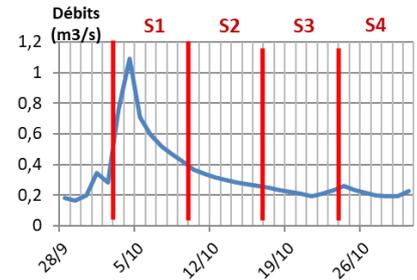
Printemps : POCIS HLB



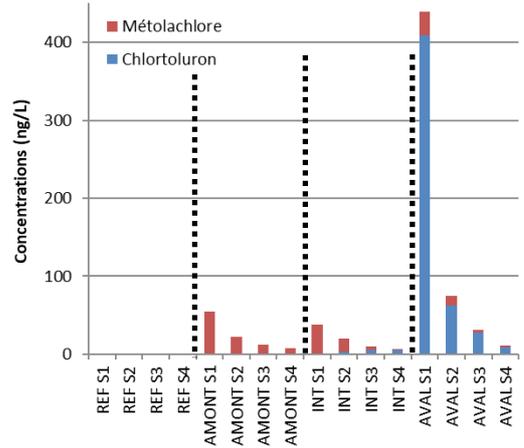
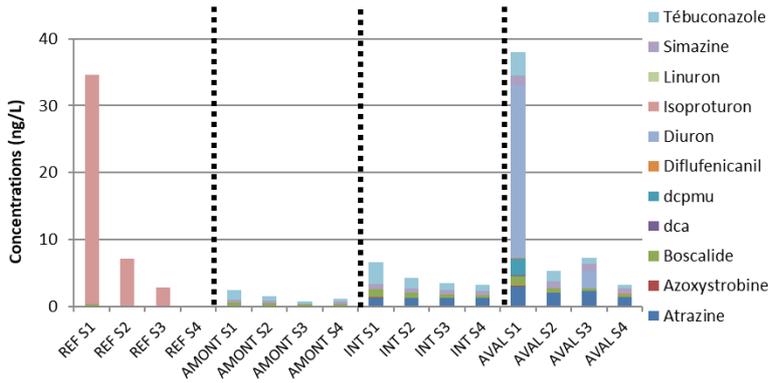
LONS-LE-SAUNIER

Campagne automne = du 03/10 au 30/10/17

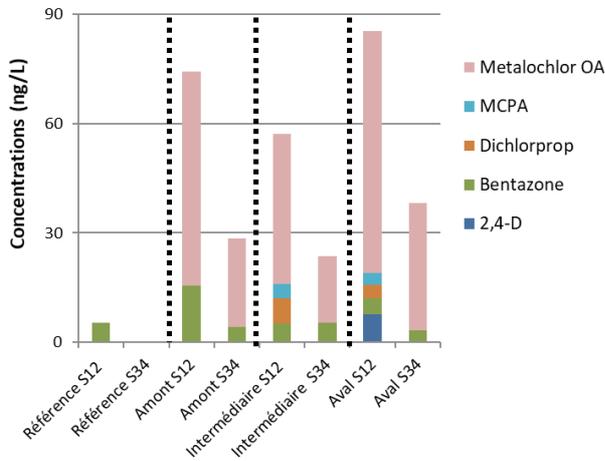
Débits de la Seille = DREAL Bourgogne



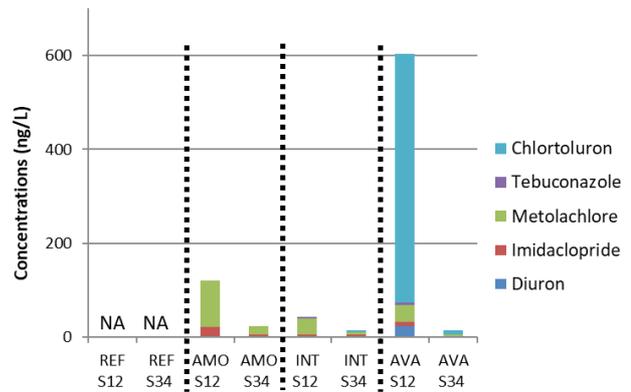
Automne : TSP (hors métolachlore et chlortoluron)



POCIS MAX

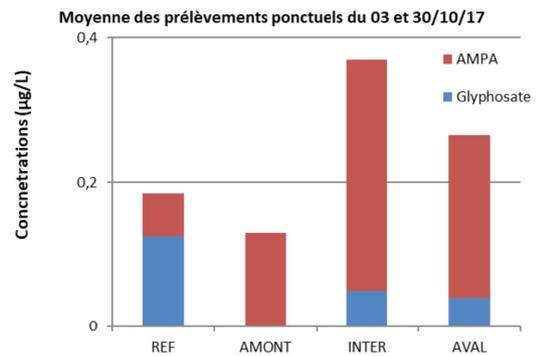
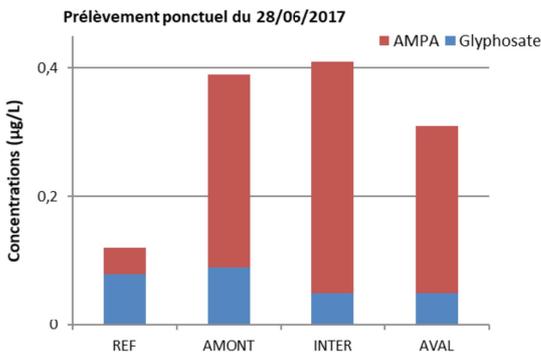


POCIS HLB



POCIS HLB : mauvaise désorption des PRC pour les POCIS de la station de référence

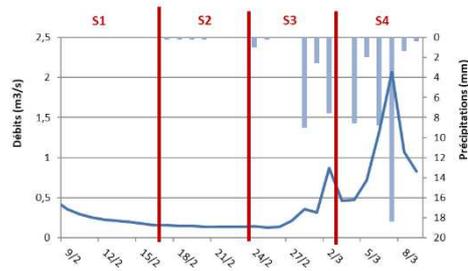
Analyse ponctuelle du glyphosate :



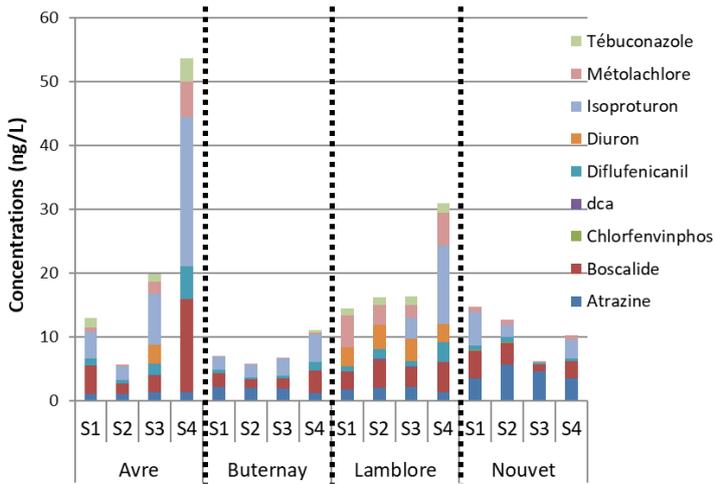
SOURCES DE LA VIGNE

Campagne du 09/02 au 09/03/2017 :

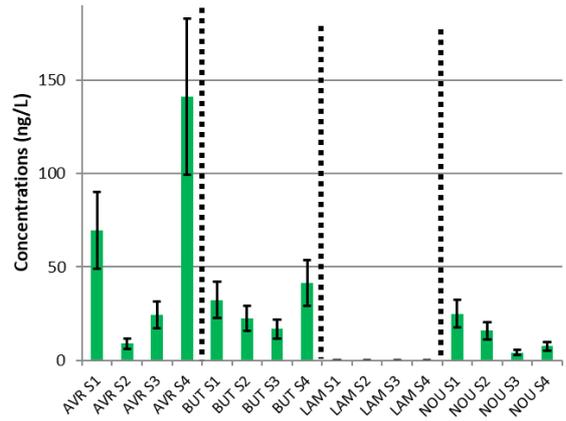
Débites de l'Avre à saint Christophe sur Avre (DREAL Haute Normandie, station H9202020)
Pluviométrie = Météo France (Station n°28206001 à Laons)



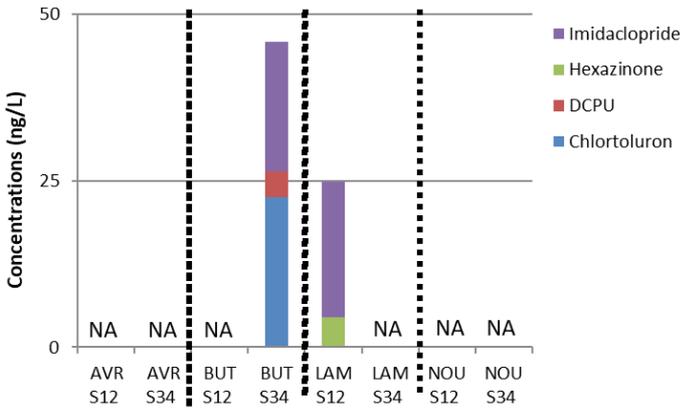
TSP – 25 substances recherchées - hors chlorotoluron



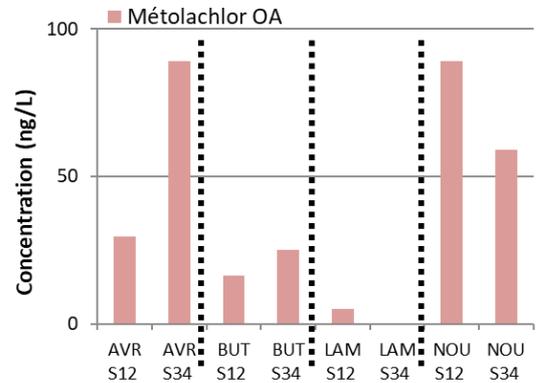
Chlorotoluron



POCIS HLB - 44 molécules recherchées



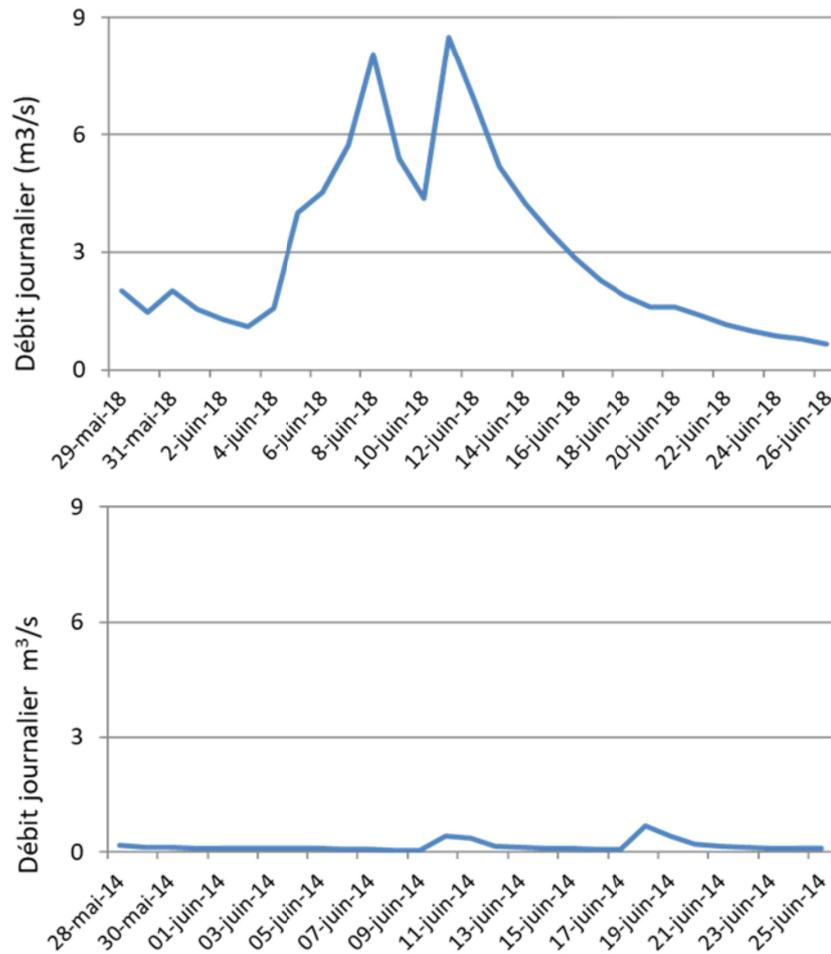
POCIS MAX – 17 molécules recherchées



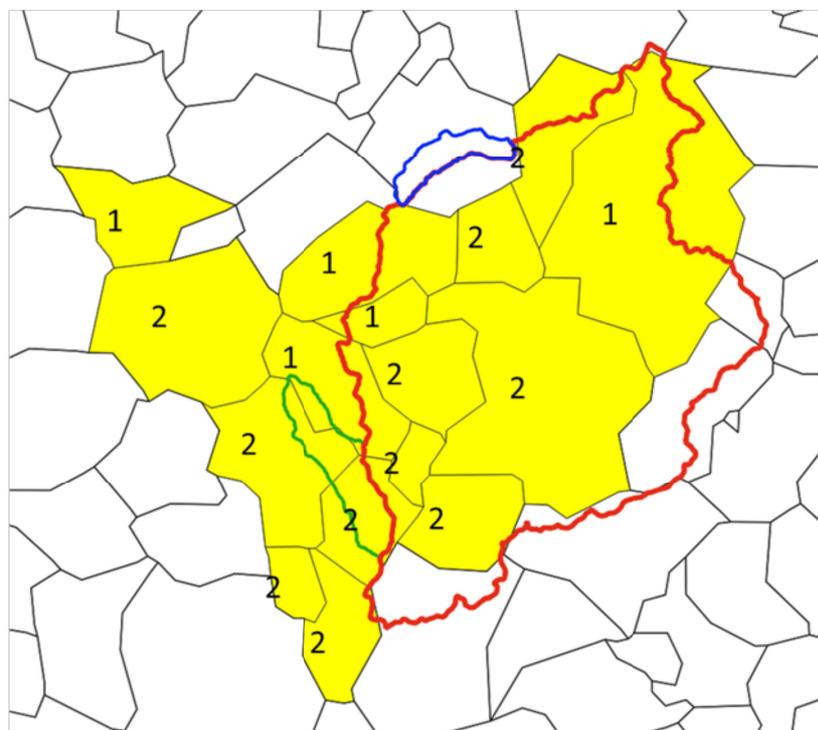
➔ POCIS HLB : mauvaise désorption des PRC pour 6/8 POCIS (taux de désorption < 20%)

Annexe 6 - Suivi des débits à la station de Saint-Médard-en-Forez
Station K0673310 – DREAL Rhone-Alpes-EauFrance en juin 2014 et
2018.

Débits de la Coise à Saint-Médard-en-Forez
Station K0673310 – DREAL Rhone-Alpes



Annexe 7 - Couverture spatiale des communes de la BNVD prises en compte pour le calcul des quantités de produits vendus sur la zone d'étude du bassin de la Coise.



- Limite de commune Communes de la BNVD retenues
- 1 ou 2 : communes affectées au même code postal
- Limite du bassin en amont de la station sur la Coise
(contient le bassin de l'Orzon)
- Limite du bassin en amont de la station sur la Gimond
- Limite du bassin en amont de la station sur le Bilaise

Annexe 8 - Liste et quantités totales des principales substances vendues¹ (au-delà d'1 kg au moins sur une des deux années) ou recherchées lors du suivi chimique en 2014 et 2018 (nr : non recherchée).

¹ données de vente issues de la BNVD pour les codes postaux 69590 et 42140 recouvrant 16 communes sur le bassin de la Coise représentées en Annexe 7.

Substance	Quantité totale appliquée en substance kg		Quantification		LQ ng/L	LQ ng/L
	2018	2014	2018	2014	2018	2014
2,4-d	34,9	58,2	oui	nr	2,65	-
2,4-mcpa	156,2	284,3	oui	nr	2,40	-
aclonifen	6,0	20,0	nr	nr	-	-
aminopyralid	14,7	8,0	nr	nr	-	-
aminotriazole	0,0	12,0	nr	nr	-	-
azoxystrobine	4,7	8,6	oui	oui	0,28	0,20
bacillus thuringiensis	0,2	0,0	nr	nr	-	-
benoxacor	16,9	10,8	nr	nr	-	-
bentazone	21,6	4,8	oui	nr	2,09	-
benzovindiflupyr	7,3	0,0	nr	nr	-	-
bifenox	0,0	8,0	nr	nr	-	-
bixafen	1,3	3,4	nr	nr	-	-
boscalide	25,5	11,9	non	non	4,58	1,07
bromoxynil	46,3	23,3	nr	nr	-	-
bromoxynil octanoate	47,6	92,8	nr	nr	-	-
carboxine	2,0	1,0	nr	nr	-	-
carfentrazone ethyl	1,9	0,6	nr	nr	-	-
chlormequat chlorure	0,0	3,0	nr	nr	-	-
chlorothalonil	17,0	10,5	nr	nr	-	-
chlorpyriphos-ethyl	0,0	2,5	non	non	4,86	0,23
chlorpyriphos-methyl	1,4	4,4	non	oui	1,13	0,29
chlorotoluron	86,5	60,0	oui	non	0,33	12,68
clopyralid	43,7	0,0	nr	nr	-	-
cloquintocet-mexyl	9,6	3,2	nr	nr	-	-
cypermethrine	2,0	3,1	nr	nr	-	-
cyproconazole	1,4	4,1	non	non	1,13	5,00
cyprosulfamide	20,8	12,6	nr	nr	-	-
dicamba	53,4	37,0	non	nr	3,92	-
dichlorprop-p	99,6	34,7	non	nr	2,59	-
diclofop methyl	0,0	7,6	non	nr	1,92	-
diflufenicanil	7,7	11,4	oui	oui	0,34	0,29
dimethachlore	2,8	0,0	non	non	1,22	5,00

Substance	Quantité substance kg		Quantification		LQ ng/L	LQ ng/L
	2018	2014	2018	2014	2018	2014
dimethenamide-p (dmta-p)	347,8	413,1	oui	oui	0,77	5,00
dimethoate	0,0	0,4	non	non	2,19	5,00
dimethomorphe	1,5	0,0	oui	non	1,84	2,14
diquat	2,0	2,0	nr	nr	-	-
dithianon	0,0	1,4	nr	nr	-	-
dodine	0,0	2,0	nr	nr	-	-
epoxyconazole	18,0	26,9	non	non	0,88	5,00
ethephon	0,0	5,5	nr	nr	-	-
ethoprophos	6,0	0,0	nr	nr	-	-
fenoxaprop-p-ethyl	0,0	2,9	nr	nr	-	-
fenpropidine	12,5	2,7	nr	nr	-	-
fenpropimorphe	3,0	2,5	nr	nr	-	-
florasulame	3,1	2,5	nr	nr	-	-
fluazifop-p-butyl	1,4	0,3	nr	nr	-	-
Fludioxonil	2,9	3,0	nr	nr	-	-
fluroxypyr	98,0	68,2	nr	nr	-	-
flurtamone	2,5	0,0	non	non	0,99	5,00
fluxapyroxad	7,1	19,7	nr	nr	-	-
foramsulfuron	3,8	0,0	nr	nr	-	-
glufosinate ammonium	9,8	3,8	nr	nr	-	-
glyphosate	644,1	578,5	nr	nr	-	-
imidaclopride	0,0	1,4	oui	oui	1,23	5,00
Ioxynil	0,0	0,0	non	nr	1,18	-
isoproturon	0,0	65,0	oui	non	1,13	5,00
isoxaben	11,8	35,1	nr	nr	-	-
isoxadifen-ethyl	2,8	2,9	nr	nr	-	-
isoxaflutole	27,9	21,0	nr	nr	-	-
linuron	0,0	2,3	oui	non	0,16	5,00
mancozebe	7,7	15,0	nr	nr	-	-
mecoprop-p (mcpp-p)	0,0	15,3	oui	nr	2,93	-
mefenpyr-diethyl	0,5	1,6	nr	nr	-	-
mepiquat-chlorure	0,0	3,1	nr	nr	-	-
mesotrione	102,4	66,3	oui	nr	-	-
metaldehyde	2,3	2,0	nr	nr	-	-
metazachlore	10,0	9,0	non	non	1,23	5,00
metirame-zinc	1,6	3,2	nr	nr	-	-

Substance	Quantité substance kg		Quantification		LQ min ng/L	LQ min ng/L
	2018	2014	2018	2014	2018	2014
metrafenone	1,1	0,0	nr	nr	-	-
metribuzine	2,7	0,6	nr	nr	-	-
metsulfuron-methyl	4,5	5,6	non	nr	3,97	-
napropamide	2,8	0,0	nr	nr	-	-
nicosulfuron	31,2	21,2	oui	nr	6,16	-
pendimethaline	115,5	139,0	nr	nr	-	-
picolinafen	4,3	0,8	nr	nr	-	-
pinoxaden	19,5	10,0	nr	nr	-	-
propamocarbe	3,1	0,7	nr	nr	-	-
propiconazole	4,0	1,2	nr	nr	-	-
propyzamide	6,5	0,0	nr	nr	-	-
prosulfocarbe	297,6	280,0	nr	nr	-	-
prosulfuron	6,1	12,8	nr	nr	-	-
prothioconazole	36,9	17,7	nr	nr	-	-
pyraclostrobine	18,1	3,5	nr	nr	-	-
pyridate	0,0	1,4	nr	nr	-	-
pyrimicarbe	0,0	0,0	non	non	1,25	5,00
pyrosulame	4,0	0,7	nr	nr	-	-
quinmerac	5,0	3,5	nr	nr	-	-
sedaxane	1,5	1,3	nr	nr	-	-
s-metolachlore	337,5	216,6	oui	oui	1,49	0,15
spinosad	3,0	0,0	nr	nr	-	-
spiroxamine	0,0	9,0	oui	oui	0,12	0,12
sulcotrione	3,0	21,0	non	nr	4,46	-
tebuconazole	14,4	3,4	non	oui	4,26	1,24
tembotrione	5,5	5,8	nr	nr	-	-
terbuthylazine	46,2	0,0	oui	non	0,73	5,00
thiaclopride	0,2	1,4	nr	nr	-	-
thiencarbazone-methyl	11,9	6,3	nr	nr	-	-
thifensulfuron-methyle	11,0	6,0	nr	nr	-	-
thiocyanate d'ammonium	0,0	3,6	nr	nr	-	-
thirame	20,9	16,7	nr	nr	-	-
tribenuron-methyle	1,9	1,5	nr	nr	-	-
triclopyr	128,0	77,3	nr	nr	-	-
trifloxystrobine	7,2	2,4	nr	nr	-	-
tritosulfuron	4,9	0,0	nr	nr	-	-

FICHE ENTRETIEN

Opérationnels du projet

QUESTIONS GENERALES SUR LE PROJET

Votre opinion générale sur ce projet :

Comment jugez-vous la mise en place du projet et vos relations avec les chercheurs ?

OUTILS UTILISES :

- TSP
- POCIS
- POCIS MAX
- GAMMARES
- LITIERES
- PICT
- I²M²

Lesquels souhaiteriez utiliser s'il était disponible rapidement ?

Remarques à ajouter sur le projet :

QUESTIONS DÉTAILLÉES SUR LES OUTILS

(UNE FICHE PAR OUTIL)

<i>Pour chaque critère, veuillez noter l'outil avec les notes indiquées (1 = Peu approprié / 5 = Tout à fait approprié)</i>						
Intérêt pour l'outil avant l'utilisation (1 à 5)						
Information actuelle sur l'outil	Vous estimez que le projet vous a permis d'améliorer la connaissance de cet outil de manière :					
	<u>Remarque :</u>					
Appropriation des résultats acquis sur votre site avec cet outil	Vous estimez que le niveau d'information en retour sur les résultats acquis sur votre site est :					
	<u>Remarque :</u>					
Résultats acquis sur les autres sites avec cet outil	Souhaiteriez-vous disposer d'informations sur les résultats acquis sur les autres sites et si oui, sous quelles formes ?	OUI		NON		
	<u>Détaillez :</u>					
Utilité pour votre mission	Les données obtenues par l'outil sont exploitables et pertinentes dans le cadre de votre mission :					
	<u>Remarque :</u>					
Gamme de substances (GS) ou gamme d'impact (GI)	Les GS/GI mesurées correspondent à ce que vous souhaitez identifier de manière :					
	<u>Remarque :</u>					
	Le temps de pose dans le cours d'eau nécessaire à la collecte de données par l'outil est pour vous :					

Durée d'exposition	<u>Remarque :</u>				
Technicité	Les compétences techniques et matérielles de votre structure pour utiliser l'outil sont :				
	<u>Remarque :</u>				
Praticabilité	La prise en main de l'outil par votre structure s'est faite de manière :				
	<u>Remarque :</u>				
Coût (ordre de grandeur)	Le coût financier pour acquérir et utiliser cet outil par rapport à l'information acquise :				
	<u>Remarque :</u>				
Facilité de compréhension et d'interprétation des résultats	Les compétences de votre structure pour interpréter les résultats obtenus par l'outil sont :				
	<u>Remarque :</u>				
Intérêt pour l'outil avant l'utilisation (1 à 5)					

FICHE ENTRETIEN

Non opérationnels du projet

Dans quelle mesure êtes-vous aujourd'hui impliqués dans le contrôle ou le suivi des pesticides en milieu aquatiques ? (Outils, méthodes, etc.)

Présentation succincte du projet : objectifs et outils déployés.

Comment percevez-vous ce projet de recherche IMPACT-CE dans votre problématique ?

Quels intérêts voyez-vous à ces outils en lien direct ou indirect avec votre profession ?
Lesquels vous intéressent le plus et pourquoi ?

Quelles limites vous semblent apparaître à l'usage de tels dispositifs ?

Voyez-vous des utilisations annexes ou d'autres publics que les agences de l'eau susceptibles d'être intéressé par ces outils ?

Quelles questions avez-vous sur ces outils dont il vous semble important qu'elles aient une réponse lors de leur présentation dans le projet Impact-CE ?

Array of microbial indicators, a promise for a better monitoring of pesticide effects on stream biological quality

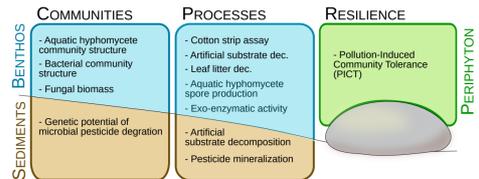
J Jabiol¹, J Artigas², J Béguet³, C Bonnineau⁴, E Chauvet⁵, M Devers³, F Guérold⁶, M Le Dérou⁴, C Legrand⁴, C Margoum⁴, F Martin-Laurent³, N Mazzella⁷, S Pesce⁴, N Rouard³ & V Gouy⁴

¹HYFE Hydrobiologie et Fonctionnement des Ecosystèmes, Elven, ²Laboratoire Micro-organismes : Génome et Environnement (LMGE), Université Clermont-Auvergne
³UMR Agroécologie, INRAE, Dijon, ⁴UR Riverly, INRAE, Villeurbanne, ⁵Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement, Toulouse
⁶Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), Metz, ⁷UR EABX INRAE, Cestas

Introduction

Freshwater contamination by pesticide residues is a major ecological and health issue. It is characterized by a cocktail of a large number of active compounds, each of them often found at very low and temporally fluctuating concentrations. This makes their quantification and ecological impacts assessment highly challenging and costly. During the last decade, the development of pesticide integrative samplers improved the monitoring of water chemical quality through the determination of time-weighted average concentrations over an exposure period, leading to a better representativeness of measurements. However, scientists and water managers still need to go beyond the estimation of pesticide concentrations and take into account the ecological effects on exposed aquatic communities. Microbial communities provide a broad array of structural and functional metrics that may help to diagnose the ecological impacts of stream contamination by pesticide residues.

In this study, we evaluated 10 of such metrics that involved either periphytic communities, microbial communities associated with benthic decomposing organic matter, as well as sediment microbial communities, and are based on microbial community characterization, measurements of microbial processes, or their resilience to pesticide contamination. They were deployed in 10 streams located in 3 catchments, as well as at 2 seasons in 4 out of the 10 streams. Streams were selected in different agrosystems representative of a wide pesticide contamination gradient, as evidenced by pesticide quantification using composite silicone rubber and POCIS integrative chemical samplers (1) (66 molecules targeted).



Results

PERIPHYTON PICT (2)
 Community tolerance increases with pesticide concentration for both metolachlor and glyphosate (but analyses not performed in all catchments)
 No clear pattern for diuron (but low stream concentrations since diuron ban)

Litter decomposition (3) (fine mesh litter bags)
 Does not vary along the pesticide contamination, but total decomposition does
 Mostly useful if combined with coarse mesh litter bags

ARTIFICIAL SUBSTRATES Cotton-strip decomposition (4)
 No relationship between tensile strength loss and pesticide contamination (but many cotton strips lost during the experiment)
 Positive effect of temperature and nutrients

Fungal biomass (ergosterol) (3)
 Significantly decreased with fungicide concentration ($R^2 = 0.41$)
 High temporal dynamics can make the value difficult to interpret

ALDER LITTER Aquatic hyphomycete sporulation (3)
 Number of fungal species decreased with cumulated fungicide concentration ($R^2 = 0.66$)
 No effect on the presence/absence of dominant species
 Sporulation rates are difficult to interpret due to large temporal variability

ARTIFICIAL SUBSTRATES Artificial substrates decomposition (5)
 No clear relationship between decomposition and water contamination
 A bell curve in the sediments suggests higher decomposition rates in both reference and highly contaminated sites (probably related to a confounding effect of OM availability)

Organic matter degrading enzymatic activity (3)
 No overall pattern between enzymatic activity and pesticide contamination
 Decreased phenoloxidase activity along the contamination gradient

Bacterial community (DGGE) (3) No effect of the contamination on OTU species richness
 Distinct OTU compositions occur along the contamination gradient

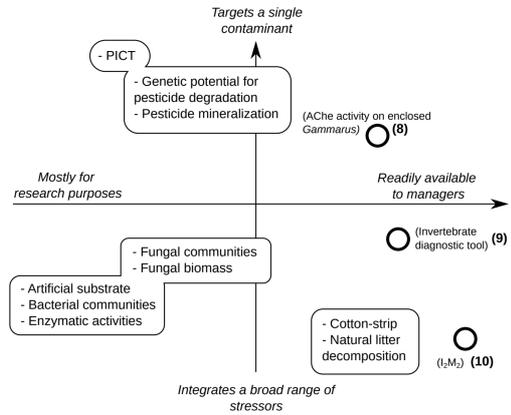
SEDIMENTS Pesticide degradation potential (6) All communities are able to mineralize glyphosate, isoproturon and diuron, though to different extent
 Mineralization rates are not necessarily related to measured field concentrations but reveal a past exposure
 Genetic potential for pesticide degradation (7) Genetic potential for the degradation of the prohibited diuron is not detected
 Genetic potential is not always related to mineralization rates nor to measured field concentrations

Discussion

The concomitant deployment of 10 biological indicators in streams located along a well-characterized pesticide contamination gradient allowed identifying their respective advantages and disadvantages, as well as the needs for further studies. Our main conclusions are the following:

- Litter and cotton strip decomposition are cost-efficient and operational tools that rely on extensive literature data. However, they integrate the effects of multiple stressors, and cannot detect nor quantify the effect of specific stressors.
- Microbial tools that target specific contaminants are very promising, and rely on well-established methodologies and normalized protocols. However further research and cost reduction would be needed before they can be extensively used as bio-indicators.
- Microbial activities and communities associated with leaf litter revealed encouraging patterns (e.g. fungicide-specific responses). However, extensive research is needed to make them suitable for bio-indication. To date, the difficulty of interpretation and their relatively high costs dedicate them to fundamental research purposes.

Microbial communities and processes offer great opportunities to bio-indication, from tools that are able to target specific molecules (PICT, pesticide degradation) to cost-efficient integrative indicators (OM decomposition), highlighting their complementarity rather than redundancy. However, they have been neglected for a long time (except diatom communities) and remain a step behind invertebrate-based indicators in terms of operability (symbolized by white circles on the figure). Large-scale studies continue to be necessary when aiming at standardizing results across environmental contexts and providing bio-indication tools to end-users.



Literature

(1) Grenier et al. (2014) *Irstea*, 82 pp.
 (2) Tlili et al. (2016) *Freshw Biol* 61, 2141–2151
 (3) Graça et al. (2020) *Springer Intern Pub*, 604 pp.
 (4) Tiegs et al. (2007) *J N Am Benthol Soc* 26, 70–77
 (5) Pesce et al. (2020) *Environ Sci Pollut Res* 27, 79–86
 (6) Pesce et al. (2009) *39eme congrès du groupe français des pesticides*
 (7) Petrić et al. (2011) *J Microb Meth* 84, 454–4606
 (8) Xuereb et al. (2009) *Aquat Toxicol* 93, 225–233
 (9) Mondy & Usseglio-Polatera (2013) *Sci Total Environ* 461/462, 750–760
 (10) Mondy et al. (2012) *Ecol Indic* 18, 452–467

