

Document public



EvaLuation In situ de l'impact des produits phytosanitaires sur les eaux Souterraines et les Ecosystèmes associés de la plaine alluviale de l'Ariège : rapport année 1 du projet ELISE

Rapport final

BRGM/RP 62056-FR
Février 2013



EvaLuation In situ de l'impact des produits phytosanitaires sur les eaux Souterraines et les Ecosystèmes associés de la plaine alluviale de l'Ariège : rapport année 1 du projet ELISE

Rapport final

BRGM/RP 62056-FR
Février 2013

Étude réalisée dans le cadre des projets de Recherche du BRGM PDR11MPY01

BARAN N., AMALRIC L., SAPLAIROLES M., BLANCHET S., GAUTHIER L., IMFELD G., MAAZOUZI C., MARMONIER P., MOUCHET F., PISCART C., RIBERON A., VUILLEUMIER S.

Vérificateur :

Nom : Berho C.

Date : 07/03/2013

Approbateur :

Nom : Roubichou Ph.

Date : 23/02/2013

En l'absence de signature, notamment pour les rapports diffusés en version numérique, l'original signé est disponible aux Archives du BRGM.

Le système de management de la qualité du BRGM est certifié AFAQ ISO 9001:2008.

Mots-clés :

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante :

Baran N., Amalric L., Saplairoles M., Blanchet S., Gauthier L., Imfeld G., Maazouzi C., Marmonier P., Mouchet F., Piscart C., Riberon A., Vuilleumier S. (2013) – Evaluation in situ de l'impact des produits phytosanitaires sur les eaux souterraines et les écosystèmes associés de la plaine alluviale de l'Ariège : rapport année 1 du projet ELISE. Rapport final. BRGM/RP-62056-FR, 58 p., 43 ill.

Synthèse

Depuis de nombreuses années, des constats alarmants sur la qualité des eaux de la nappe alluviale de l'Ariège et de ses affluents sont établis. Un abandon progressif des ouvrages captant cette ressource pour un usage d'alimentation en eau potable est observé dans la plaine de l'Ariège, lié aux fortes teneurs en polluants azotés et/ou phytosanitaires. Ainsi aujourd'hui seuls 2 captages en eaux souterraines sur les 17 existants sont encore exploités. De nombreux captages AEP en eaux de surface, ressources particulièrement vulnérables, sont par conséquent utilisés en remplacement de ces puits.

Les résultats obtenus dans le cadre du projet TRANSPOLAR (projet de recherche financé par l'Agence de l'Eau Adour-Garonne, le Conseil Régional Midi-Pyrénées, les fonds européens FEDER et le BRGM sur la période 2008-2010) ont mis en évidence une contamination des eaux souterraines par les nitrates mais aussi par les produits phytosanitaires. Si l'atrazine et son métabolite, la dééthylatrazine, sont encore détectés sur de nombreux points d'eau malgré l'arrêt d'utilisation de l'atrazine depuis fin 2003, les chloroacétanilides sont également détectés dans de nombreux points d'eau et parfois avec des teneurs de plusieurs centaines de nanogrammes par litre. Parmi les chloroacétanilides (substances utilisées notamment pour le désherbage du maïs), le métolachlore apparaît comme la substance la plus utilisée mais aussi la plus fréquemment détectée (ou ses métabolites) dans les eaux souterraines.

L'objectif général du présent projet ELISE (EvaLuation In situ de l'impact des produits phytosanitaires sur les eaux Souterraines et les Ecosystèmes associés de la plaine alluviale de l'Ariège) est d'établir une caractérisation couplée (i) des mécanismes de transfert des produits phytosanitaires et notamment du métolachlore et de ses produits de dégradation vers les eaux souterraines et (ii) de leur impact sur la qualité chimique de la nappe ainsi que de leur impact écologique sur les micro et les macro-organismes des eaux souterraines et des écosystèmes associés.

En effet, les aspects en lien avec la biodiversité représentent également un volet important de la Directive Cadre européenne sur l'Eau (DCE) mentionnant que la qualité des eaux souterraines ne doit pas altérer la qualité des eaux de surface qu'elles alimentent et impacter les écosystèmes associés. La plaine alluviale de l'Ariège est à ce titre un excellent site d'étude puisque la nappe soutient les cours d'eau pendant une grande partie de l'année et que les échanges rivière-nappe sont extrêmement limités.

Le présent projet vise donc, sur une unité géographique et fonctionnelle bien décrite que représente la nappe alluviale de l'Ariège, à évaluer l'impact des produits phytosanitaires et leurs produits de dégradation sur les écosystèmes associés à cette nappe. Quatre axes majeurs peuvent être mentionnés et structurent le projet :

- Axe 1 : Développements d'outils analytiques.
- Axe 2 : Premiers éléments d'évaluation de l'impact bio-écologique sur les organismes souterrains et les écosystèmes associés par des approches de laboratoire.
- Axe 3 : Approche *in situ* de l'impact bio-écologique chez les organismes souterrains et les écosystèmes associés.
- Axe 4 : valorisation des résultats et communication.

Pour répondre à l'ambition du projet, le BRGM, coordonnateur du projet, s'est associé à l'Université de Strasbourg (UdS - UMR 7156 CNRS et UMR 7517 CNRS), au Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle (EcoLab - UMR 5245 CNRS/UPS/INP, Toulouse), au Laboratoire Evolution et Diversité Biologique (EDB - UMR 5174 Université Paul Sabatier, Toulouse), au Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Fluviaux (LEHNA, UMR 5023 CNRS Université Claude Bernard Lyon 1) et au Laboratoire d'Ecologie Expérimentale du CNRS (USR 2936, Moulis).

Le projet sera mené sur 3 années (novembre 2011 – novembre 2014). Le présent rapport concerne les activités de l'année 1 portant plus spécifiquement sur :

- le développement analytique permettant de rechercher en complément d'une quarantaine de molécules, les métabolites neutres du métolachlore et autres chloroacétanilides dans les eaux du monitoring mais aussi dans les échantillons provenant des expérimentations de laboratoire ;
- la reprise du monitoring de la qualité des eaux sur la base du réseau Transpolar complété par des points d'eau de surface ;
- la définition de protocoles expérimentaux pour les approches de laboratoire et in situ sur les différents organismes ;
- la mise en œuvre de ces protocoles pour des premières séries de tests ;
- la mise en œuvre de premières approches de géochimie et d'hydrogéologie pour améliorer la connaissance du fonctionnement de l'aquifère avec un effort particulier sur la caractérisation des échanges eau souterraine – eau de surface.

Sommaire

1. Contexte et objectifs de l'étude	9
1.1. CONTEXTE DE L'ETUDE	9
1.2. OBJECTIF DU PROJET	10
1.3. LE PARTENARIAT	13
2. Développements analytiques et monitoring.....	15
2.1. DEVELOPPEMENTS ANALYTIQUES	15
2.2. MONITORING	15
2.2.1. Protocole mis en œuvre	15
2.2.2. Résultats.....	18
2.3. CARACTERISATION DU FONCTIONNEMENT HYDRODYNAMIQUE.....	20
3. Etude des amphibiens	23
3.1. TESTS DE LABORATOIRE DE TOXICITE AIGUE, CHRONIQUE ET GENETIQUE.....	23
3.1.1. Modèle biologique : L'amphibien <i>Xenopus laevis</i>	23
3.2. PARAMETRES ECOTOXICOLOGIQUES MESURES (END-POINTS BIOLOGIQUES).....	24
3.2.1. Approches mises en œuvre.....	24
3.2.2. Protocole d'exposition des larves et conditions expérimentales contrôles négatif et positif	27
3.2.3. Concentrations de S-métolachlore	29
3.2.4. Résultats.....	29
3.3. EXPOSITION EN LABORATOIRE DU MODELE AMPHIBIEN <i>Xenopus laevis</i> DANS DES EAUX DE SURFACE DU SITE D'ETUDE.....	30
3.4. DISTRIBUTION SPATIALE DES ESPECES SUR LA PLAINE	33
3.5. DISCUSSION SUR LES 1ERS ESSAIS REALISES SUR LES AMPHIBIENS	36
4. Etude des macro-organismes souterrains	39
4.1. TESTS DE LABORATOIRE DE TOXICITE AIGUE.....	39
4.2. EXPOSITION IN SITU DE SENTINELLES.....	42
4.3. DISTRIBUTION SPATIALE DES ESPECES SUR LA PLAINE	42
4.4. PREMIERES CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	45

4.5. VALIDATION MOLECULAIRE DES TAXONS DE LA FAUNE SOUTERRAINE	45
4.5.1.Extraction d'ADN.....	46
4.5.2.Amplification de l'ADN.....	47
4.5.3.Etude des dissimilarités génétiques et des identifications	48
4.5.4.Conclusion et perspectives à court terme	50
5. Approche microbiologique	51
5.1. ETUDE STRUCTURELLE DE FLORE BACTERIENNE PAR APPROCHE BIOMOLECULAIRE	51
5.1.1.Développement du protocole d'empreinte moléculaire (PCR - T-RFLP) .	51
5.1.2.Application du protocole d'empreinte moléculaire (PCR - T-RFLP) sur des échantillons de nappe	52
5.2. BIOINDICATEURS MICROBIENS DU METABOLISME DU METOLACHLORE	54
5.3. PREMIERES CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	55
6. Premières conclusions et perspectives du projet	57
7. Bibliographie	59

Liste des illustrations

Illustration 1 - Nombre total de quantification et nombre de points d'eau ayant présenté au moins une quantification (données mars 2009 à décembre 2010, limites de quantification fonctions des molécules)	10
Illustration 2 - Structure générale du projet ELISE	12
Illustration 3 - Liste des substances recherchées dans les eaux souterraines (à gauche : acétanilides avec en vert, métabolites du métolachlore, en bleu : métabolites de l'acétochlore ; en orange : métabolites de l'alachlore et en blanc : métabolites pouvant être commun ; à droite : molécules neutres et glyphosate + AMPA).....	16
Illustration 4 - Localisation des points d'eau sélectionnés pour le suivi de la qualité de la nappe alluviale et des eaux de surface.....	17
Illustration 7 - Précipitations annuelles enregistrées à Cugnaux (bleu), Montaut (vert) et Pamiers (violet) et moyennes annuelles sur la période 1995-2011.....	19
Illustration 9 - Localisation des points d'eau souterraine et de surface échantillonnés en période de basses eaux 2012 (septembre-octobre) destinées notamment à l'analyse des isotopes du strontium.....	20
Illustration 10 – Localisation des points de prélèvements complémentaires au réseau de suivi mensuel de la qualité	22
Illustration 12 - Xenopus laevis adultes, male à droite et femelle à gauche	23
Illustration 14 - Accouplement de 2 adultes Xenopus laevis (amplexus).....	24
Illustration 16 - Photographie d'une larve au stade 50 pour mesure de sa taille	25

Illustration 18 - Micronoyaux. Frottis sanguin de Xénope (à gauche) (certains micronoyaux sont indiqués par une flèche). Schématisation de l'apparition d'un micronoyau au cours d'une mitose dans un érythrocyte du sang circulant (à droite).....	26
Illustration 20 - Formule de détermination des rangs de la médiane, du quartile inférieur QI et du quartile supérieur QS. Dédutions des valeurs de M, QI et QS.	26
Illustration 22 - a) Larve de Xénope en vue dorsale (haut) et latérale (bas : illustration Nieuwkoop et Faber, 1956) au stade 50 de la table de développement, b) Détail du membre postérieur de la larve de Xénope au stade 50, constriction à la base (source Centre de Biologie du Développement).....	28
Illustration 24 - Ponction intracardiaque d'une larve de Xénope au stade 54.....	28
Illustration 26 - Représentation graphique du Taux de mortalité chez les larves de Xénope exposées à 0,01 – 0,1 – 1 et 10mg/L de S-métolachlore. T ⁻ : Témoin négatif (eau standardisée, ISO 2006).....	29
Illustration 28 - Taux de croissance chez les larves de Xénope exposées à 0,01 – 0,1 – 1 – 10 mg/L de S-métolachlore en eau standardisée (ISO, 2006) ; Témoin : eau standardisée (ISO, 2006). Les histogrammes en rouge correspondent à une concentration à laquelle est observée une inhibition de croissance significative par rapport au T-29	
Illustration 30 - Fréquence pour mille des érythrocytes micronuclées (EMN‰) chez les larves de Xénope exposées à un gradient de concentration de S-métolachlore de 0,01 – 0,1 – 1 – 10 mg/L en comparaison avec les larves du témoin négatif en eau standardisée (ISO, 2006) ; T ⁻ : eau standardisée (ISO, 2006) – T ⁺ : 40mg/L de CP en eau standardisée (ISO, 2006). * : génotoxicité significative par rapport au T ⁻	30
Illustration 32 - Zones d'échantillonnage.....	31
Illustration 33 - Eaux prélevées sur chaque site et stockées en erlenmyer (2L).....	31
Illustration 35 - Liste des paramètres analysés pour les eaux utilisées pour l'exposition ex situ des xénopes	32
Illustration 37 - Représentation graphique du Taux de mortalité des larves de Xénope exposées aux eaux prélevées sur le site non contaminée (00), intermédiaire (01) et contaminée (02). T ⁻ : eau standardisée.....	32
Illustration 39 - Taux de croissance des larves de Xénope exposées aux eaux prélevées sur le site non contaminée (00), intermédiaire (01) et contaminée (02) par rapport aux larves du témoin négatif T ⁻ en eau standardisée (ISO, 2006)	33
Illustration 41 - Fréquence pour mille des érythrocytes micronuclées (EMN‰) aux eaux prélevées sur le site non contaminée (00), intermédiaire (01) et contaminée (02) chez les larves de Xénope ; Histogramme rouge : condition génotoxique par rapport au T ⁻ , T ⁺ : eau standardisée (ISO, 2006) – T ⁺ : CP 40 mg/L.....	33
Illustration 42 - Nombre d'amphibiens (urodèles en vert foncé et anoures en vert clair) adultes, juvéniles et nombre de pontes d'amphibiens repérées sur le site « non contaminé » (00), le site intermédiaire (01) et le site « contaminé » (02).....	34
Illustration 43 - Résultat de l'analyse statistique comparant le nombre d'individus adultes repérés sur le site non contaminé (00), le site intermédiaire (01) et le site contaminé (02) .	34
Illustration 44 - Résultat de l'analyse statistique comparant le nombre de pontes repérées sur le site « non contaminé » (00), intermédiaire (01) et « contaminé » (02)	35
Illustration 45 - Moyenne des tailles des femelles et des mâles de tritons palmés en centimètre, mesure prise du museau au cloaque (MC) et du museau à la queue (MQ) sur le site « non contaminé » (00) et « contaminé » (02).....	35
Illustration 46 - Résultat de l'analyse statistique comparant la moyenne des tailles des tritons palmés en centimètres, mesure prise du museau au cloaque (MC) et du museau à la queue (MQ) sur le site non contaminé (00) et contaminé (02)	35

Illustration 47 - Survie (%) des individus de <i>Gammarus pulex</i> et d' <i>Asellus aquaticus</i> en fonction de la concentration en S- métolachlore (SMOC), après exposition pendant 96 heures. L'intersection des deux lignes rouge donne la CL50-96H correspondant à la mortalité de 50% des individus exposés.....	40
Illustration 48 - CL50-96h du S-métolachlore pour les cinq espèces étudiées à 11°C. *: valeur estimée. ** valeur non déterminée du fait de la survie des 100% des individus après 96 heures d'exposition.	40
<i>Illustration 50 - Evolution de la CL50 au cours du temps à 11°C chez Gammarus pulex, Gammarus fossarum, Asellus aquaticus et Niphargus rhenorhodanensis.....</i>	<i>41</i>
Illustration 52 - Evolution de la CL50 au cours du temps à 11°C et 15°C chez <i>Gammarus pulex</i> et <i>Niphargus rhenorhodanensis</i>	41
Illustration 54 - Système d'encagement des sentinelles exposées in situ	42
Illustration 56 - Diagramme de Piper correspondant aux points analysés en avril 2008 (les points échantillonnés en janvier pour 2012 pour l'analyse de la diversité des macro-organismes ont été cerclés en noir).....	43
Illustration 58 - Localisation des points d'eau souterraine échantillonnés en janvier 2012 pour inventaire des espèces souterraines	44
Illustration 60 - Recette et cycle utilisés afin d'amplifier le gène COI.....	47
Illustration 62 - Recette et cycle utilisés afin d'amplifier le gène 28S.....	48
Illustration 64 - Arbre représentant les liens phylogénétiques (selon un fragment du gène 28S) entre les spécimens récoltés sur le terrain et séquencés dans ce projet (entre guillemets, le numéro indique le numéro du spécimen et les codes correspondent à ceux des stations) et ceux disponibles sur GeneBank.....	49
Illustration 66 - Filtration in situ d'eau de nappe en vue de l'étude	52
Illustration 68 - Résultats représentatifs pour une série d'isolements d'ADN à partir de filtres correspondant au prélèvement d'environ 1L d'eau de nappe sur différents points (campagnes de mai et de décembre 2012).	53
Illustration 70 - Electrophorèse en gel d'agarose 1 % montrant les fragments de gène de l'ARN ribosomique 16S obtenus par amplification PCR de l'ADN extrait d'échantillons d'eau de nappe avec les amorces 27f marquée et 927r.	53
Illustration 72 - Parcelles échantillonnées en avril 2012	54
Illustration 74 - Exemple d'évolution temporelle du métolachlore dans des cultures d'enrichissement bactériennes sur la base de sols agricoles de grausse. Alive : cultures vivantes ; CTRL : contrôle stérile	55

1. Contexte et objectifs de l'étude

1.1. CONTEXTE DE L'ETUDE

Depuis de nombreuses années, des constats alarmants sur la qualité des eaux de la nappe alluviale de l'Ariège et de ses affluents sont établis. Un abandon progressif des ouvrages captant cette ressource pour un usage d'alimentation en eau potable est observé dans la plaine de l'Ariège, lié aux fortes teneurs en polluants azotés et/ou phytosanitaires. Ainsi aujourd'hui seuls 2 captages en eaux souterraines sur les 17 existants sont encore exploités. De nombreux captages AEP en eaux de surface, ressources particulièrement vulnérables, sont par conséquent utilisés en remplacement de ces puits.

La Directive Cadre sur l'Eau (DCE) établit un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau. Chaque district géographique doit être doté d'un plan de gestion en vue notamment d'améliorer la qualité des masses d'eau souterraine. Les résultats de l'état des lieux, rédigés en mars 2004, identifiaient cette masse d'eau (n°5019) comme sensible au regard des pollutions par les produits phytosanitaires et présentant un risque fort de non-atteinte du bon état des eaux pour 2015. L'actualisation en cours de l'état des lieux pour la préparation du prochain SDAGE confirme ce constat, et identifie un risque fort de non-atteinte du bon état des eaux pour 2021. La plaine est également classée en zone vulnérable vis-à-vis de la Directive Nitrates.

Les mesures de qualité effectuées dans le cadre des différents réseaux de connaissance (DIREN Midi-Pyrénées et Agence de l'Eau Adour-Garonne) et d'usage (DDASS) indiquent une contamination de la nappe alluviale par les nitrates et les produits phytosanitaires.

Un Groupe Départemental Phytosanitaires a été mis en place en Ariège en 2005. Il s'agit d'une déclinaison à un niveau local du Groupe Régional d'Action de Midi-Pyrénées pour la réduction de la pollution des eaux par les phytosanitaires (GRAMIP). Les orientations régionales sont ainsi déclinées en actions ou programmes adaptés aux territoires. Au titre de la protection des eaux souterraines, une Zone d'Action Prioritaire (ZAP) a été définie en « Basse Ariège et Basse Vallée de l'Hers » en 2005 afin de mettre en place des mesures de lutte contre les pollutions par les phytosanitaires. Une des actions de la ZAP fixe pour objectif de participer à la reconquête de la potabilité des eaux de la nappe alluviale de l'Ariège.

Les travaux menés dans le cadre du projet TRANSPOLAR (projet de recherche financé par l'Agence de l'Eau Adour-Garonne, le Conseil Régional Midi-Pyrénées, les fonds européens FEDER et le BRGM sur la période 2008-2010), ont permis d'améliorer la connaissance du transfert des produits phytosanitaires utilisés en agriculture vers et dans les eaux souterraines de la nappe alluviale de l'Ariège (Baran et al., 2009, 2010, 2011 ; Baran et Saplairoles, 2012).

L'opération TRANSPOLAR s'appuie sur des expérimentations *in situ* (suivi de parcelles expérimentales en 2009), de laboratoire (étude des processus de sorption et dégradation sur des sols et des solides de la zone non saturée, actions 2010) et contient surtout un important volet destiné à comprendre l'hydrodynamique et le fonctionnement hydrogéologique de la nappe (caractérisation géochimique et isotopique, datation des eaux souterraines, suivi de la qualité, etc.). Le projet contient également un important volet de caractérisation pédologique et de connaissance des pratiques culturales passées et actuelles, réalisé en collaboration avec l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan.

Les résultats obtenus dans le cadre du projet TRANSPOLAR ont mis en évidence une contamination des eaux souterraines par les nitrates mais aussi par les produits phytosanitaires. Si l'atrazine et son métabolite, la dééthylatrazine, sont encore détectés sur de nombreux points d'eau malgré l'arrêt d'utilisation de l'atrazine depuis fin 2003, les chloroacétanilides sont également détectés dans de nombreux points d'eau et parfois avec des teneurs de plusieurs centaines de nanogrammes par litre. Parmi les chloroacétanilides (substances utilisées notamment pour le désherbage du maïs), le métolachlore apparaît comme la substance la plus utilisée mais aussi la plus fréquemment détectée (ou ses métabolites) dans les eaux souterraines. La vaste campagne sur toute la plaine visant à caractériser la contamination des eaux souterraines à l'échelle de la masse d'eau réalisée en avril 2008 et le suivi mensuel sur 16 points instauré en mars 2009 et poursuivi jusque décembre 2010 révèlent les très fortes variabilités spatiales et temporelles de la contamination.

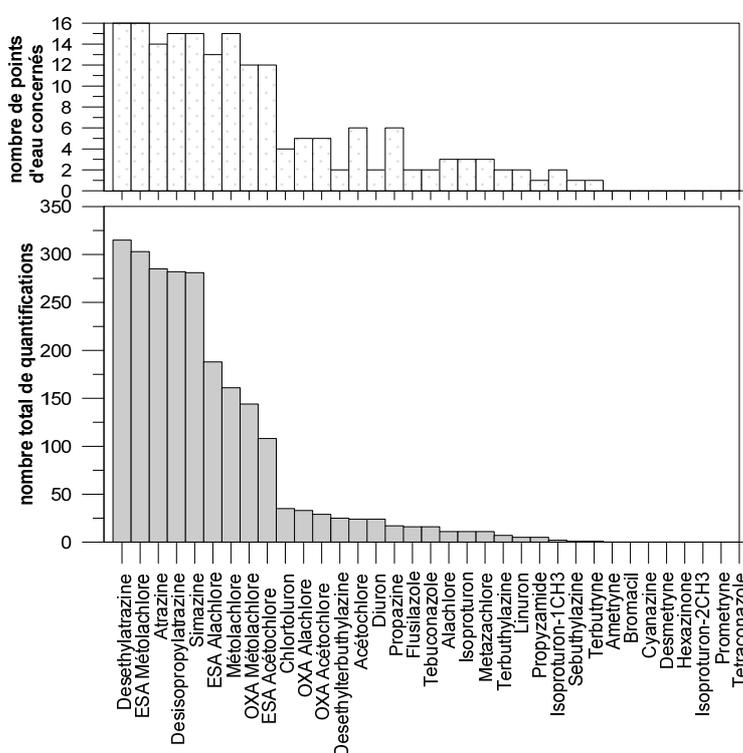


Illustration 1 - Nombre total de quantification et nombre de points d'eau ayant présenté au moins une quantification (données mars 2009 à décembre 2010, limites de quantification fonctions des molécules)

Après ces premiers résultats encourageants, il est apparu indispensable d'évaluer également l'impact de la qualité des eaux en termes de produits phytosanitaires et leurs produits de dégradation/transformation sur les écosystèmes associés.

1.2. OBJECTIF DU PROJET

L'objectif général du présent projet ELISE (EvaLUation In situ de l'impact des produits phytosanitaires sur les eaux Souterraines et les Ecosystèmes associés de la plaine alluviale de l'Ariège) est d'établir une caractérisation couplée (i) des mécanismes de transfert des produits phytosanitaires et notamment du métolachlore et de ses produits de dégradation vers les eaux souterraines et (ii) de leur impact sur la qualité chimique de la nappe ainsi que de leur impact

écologique sur les micro et les macro-organismes des eaux souterraines et des écosystèmes associés.

En effet, les aspects en lien avec la biodiversité représentent également un volet important de la DCE mentionnant que la qualité des eaux souterraines ne doit pas altérer la qualité des eaux de surface qu'elles alimentent et impacter les écosystèmes associés. La plaine alluviale de l'Ariège est à ce titre un excellent site d'étude puisque la nappe soutient les cours d'eau pendant une grande partie de l'année et que les échanges rivière-nappe sont extrêmement limités.

Le programme ELISE vise donc, sur une unité géographique et fonctionnelle bien décrite que représente la nappe alluviale de l'Ariège, à évaluer l'impact des produits phytosanitaires et produits de dégradation sur les écosystèmes associés à cette nappe.

Après une compilation des données existantes permettant de calibrer de manière optimale les protocoles expérimentaux qui vont être mis en œuvre, le projet s'articule autour de 4 axes majeurs :

- **Axe 1 : Développements d'outils analytiques.** Ces développements permettront la recherche du métolachlore et de ses différents métabolites ainsi que d'autres métabolites neutres des chloroacétanilides et d'autres substances phytosanitaires déjà mises en évidence dans le cadre de TRANSPOLAR dans le milieu naturel (eau et solides) mais aussi d'assurer le bon déroulement des expérimentations de laboratoire menées sur les micro- et macro-organismes.
- **Axe 2 : Premiers éléments d'évaluation de l'impact bio-écologique sur les organismes souterrains et les écosystèmes associés par des approches de laboratoire.** Les premières expérimentations menées en conditions contrôlées de laboratoire concerneront à la fois les micro-organismes souterrains, des macro-organismes correspondant à des espèces sentinelles souterraines et un modèle amphibien (xénope) ainsi que des espèces amphibiennes représentatives de la plaine alluviale.
- **Axe 3 : Approche *in situ* de l'impact bio-écologique chez les organismes souterrains et les écosystèmes associés.** En s'appuyant sur la caractérisation hydrogéologique de la plaine et la connaissance des processus de transfert des solutés vers la nappe, le suivi temporel de sa qualité et les résultats obtenus en laboratoire, l'impact bio-écologique sera recherché à nouveau sur les micro et macro-organismes souterrains ainsi que sur les amphibiens.
- **Axe 4 : valorisation des résultats et communication.** La communication des résultats obtenus sera effectuée à destination de la communauté scientifique mais aussi des acteurs locaux.

La structuration générale du projet est présentée dans le schéma de l'illustration 2.



Illustration 2 - Structure générale du projet ELISE

Les caractères innovants du projet sont :

- Le travail en synergie de laboratoires aux compétences complémentaires (analytiques, hydrogéologiques et biologiques),
- Une approche couplée visant à caractériser à la fois l'impact sur les écosystèmes souterrains, à ce jour très rarement étudié, et les écosystèmes associés,
- Un changement d'échelle du laboratoire au terrain afin de caractériser en conditions contrôlées de laboratoire les impacts et les processus puis une mise en application et une recherche des impacts en conditions naturelles sur un système aquifère,

- Une évaluation en conditions réelles qui permet d'approcher le problème de l'exposition longue durée/faibles doses/mélanges,
- Une évaluation portant à la fois sur une molécule mère, le métolachlore, et ses produits de dégradation,
- Une prise en compte de l'existence des isomères du métolachlore et l'évaluation de l'impact de l'énantiométrie sur la biodégradation et/ou l'impact écologique.

Les actions relevant de l'année 1 sont :

- le développement analytique permettant de rechercher en complément d'une quarantaine de molécules, les métabolites neutres des chloroacétanilides dont le métolachlore dans les eaux du monitoring mais aussi dans les échantillons provenant des expérimentations de laboratoire ;
- la reprise du monitoring de la qualité des eaux sur la base du réseau Transpolar complété par des points d'eau de surface ;
- la définition de protocoles expérimentaux pour les approches de laboratoire et in situ sur les différents organismes ;
- la mise en œuvre de ces protocoles pour des premières séries de tests ;
- la mise en œuvre de premières approches de géochimie et d'hydrogéologie pour améliorer la connaissance du fonctionnement de l'aquifère avec un effort particulier sur la caractérisation des échanges eau souterraine – eau de surface.

1.3. LE PARTENARIAT

Le projet ELISE est soutenu financièrement par l'Agence de l'Eau Adour-Garonne, les fonds européens Feder et le BRGM.

Les partenaires techniques et scientifiques sont :

- Le BRGM, coordonnateur du projet
- Université de Strasbourg (UdS) - UMR 7156 CNRS et UMR 7517 CNRS
- Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle – EcoLab- UMR 5245 CNRS/UPS/INP, Toulouse
- Laboratoire Evolution et Diversité Biologique EDB - UMR 5174 Université Paul Sabatier, Toulouse
- Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Fluviaux LEHNA, UMR 5023 CNRS Université Claude Bernard Lyon 1
- Laboratoire d'Ecologie Expérimentale du CNRS, USR 2936, Moulis

2. Développements analytiques et monitoring

La rédaction de ce chapitre est assurée par le BRGM.

2.1. DEVELOPPEMENTS ANALYTIQUES

Le suivi de la qualité des eaux souterraines conduit dans le cadre du projet Transpolar ayant révélé l'occurrence du métolachlore et plus largement des chloroacétanilides, il paraissait important d'inclure le suivi des métabolites de ces substances en afin d'avoir une vision plus complète du devenir des chloroacétanilides. Si les métabolites dits ioniques (acide éthane sulfonique et acide oxanilique de l'acétochlore, de l'alachlore et du métolachlore) étaient déjà recherchés, les métabolites neutres spécifiques d'une molécule ou communs à plusieurs molécules devaient être intégrés. L'objectif du développement analytique était donc d'élargir la liste des substances recherchées tout en partant du protocole existant et déjà validé.

Pour pallier à l'absence de standards disponibles auprès des fournisseurs habituels du laboratoire du BRGM, l'ICOA (Institut de Chimie Organique et Analytique - UMR 7311 - Université d'Orléans / CNRS, équipe de S. Routier) a réalisé la synthèse des composés manquants. Ainsi plusieurs métabolites neutres des chloroacétanilides ont été préparés.

L'extraction des métabolites neutres des acétanilides est maintenant réalisée à l'aide d'un système d'extraction en phase solide Gilson® GX 274 ASPEC sur des cartouches Oasis HLB (Waters®). Le volume d'échantillon percolé est de 1 L. Tous les composés sont analysés par un système UPLC de chez Waters® couplé à un Waters Quattro-Premier XE/Q (MSMS). Les limites de quantification varient selon les molécules entre 5 et 20 ng/L ; les incertitudes analytiques ont également été déterminées. Les valeurs sont en adéquation avec les objectifs de monitoring du projet. L'illustration 3 récapitule l'ensemble des molécules recherchées dans les eaux souterraines. Cette recherche implique la mise en œuvre de 3 techniques analytiques différentes (une pour les molécules neutres, une pour les métabolites acides et une pour le glyphosate et l'AMPA.)

2.2. MONITORING

2.2.1. Protocole mis en œuvre

La carte de l'illustration 4 indique la localisation des points d'eau suivis dans le cadre du projet ELISE. Ce monitoring comprend 15 des 16 ouvrages choisis pour le suivi mensuel effectué de mars 2009 à décembre 2010 dans le cadre du programme Transpolar dont les critères de sélection des ouvrages sont reportés en détail dans le rapport BRGM/RP58033-FR. Le point numéroté 75 a été retiré du suivi pour des raisons d'autorisation d'accès. A ce réseau, ont été ajoutés les points portant les numéros 78 (en remplacement du point 75), et 230 (source) et deux points de suivi en eaux de surface le numéro 60 bis, (mare localisée à proximité du puits n°60, à environ 45 mètres) et le 224 bis (situé à 3,7 km du puits n°224). Au total, **19 points d'eau sont donc suivis mensuellement**. Pour les eaux souterraines, le suivi a repris en mars 2012 alors que les prélèvements des eaux de surface ont démarrés en juillet 2012 (après leur sélection basée sur l'étude des amphibiens).

XI Metolachlore

XII 2-Hydroxymetolachlore

XIII Deschloro metolachlore

XIV Metolachlor morpholinone

XVI Deschloroacethylmetolachlor

XVIII Metolachlore OXA

XIX Metolachlore ESA

XXV 2-Ethyl-6-methyl-2-Chloroacetanilide

XXVI 2-Hydroxy-2'-ethyl-6'-methylacetanilide

XXVII 2'-Ethyl-6'-methylacetanilide

XXVIII 2-Ethyl-6-methyl aniline

XX Acetochlore

XXI Acetochlor hydroxy

XXII Deschloroacetochlor

XXIII Acetochlore OXA

XXIV Acetochlore ESA

I Alachlore

II Alachlor hydroxy

III Deschloroalachlor

IV 2-Chloro-2'-6'-diethylacétanilide

V 2-Hydroxy-2', 6'-diethylacetanilide

VI 2-Hydroxy-2, 6-diethylN-methylacetanilide

VII 2,6'-Diethylacetanilide

VIII 2,6-Diethylaniline

X Alachlore ESA

IX Alachlore OXA

Ametryne

Atrazine

Chlortoluron

Cyanazine

Desethylatrazine

Desethylterbutylazine

Desmetryne

Desisopropylatrazine

Diuron

Hexazinon

Isoproturon

Isoproturon-1CH3

Isoproturon-2CH3

Linuron

Metazachlore

Prometryne

Propazine

Propyzamide

Sebutylazine

Simazine

Terbutylazine

Terbutryne

Glyphosate

AMPA

Illustration 3 - Liste des substances recherchées dans les eaux souterraines (à gauche : acétanilides avec en vert, métabolites du métolachlore, en bleu : métabolites de l'acétochlore ; en orange : métabolites de l'alachlore et en blanc : métabolites pouvant être commun ; à droite : molécules neutres et glyphosate + AMPA)

Le mode opératoire appliqué est le suivant :

- Mesure du niveau piézométrique avant pompage,
- Purge de l'ouvrage par pompage à débit moyen (environ 2 m³/h) jusqu'à stabilisation des mesures de pH et de conductivité,
- Relevé des paramètres physico-chimiques non conservatifs de terrain (pH, température, conductivité, oxygène dissous et potentiel d'oxydo-réduction),
- Prélèvements des échantillons d'eau pour analyse en appliquant le protocole suivant :

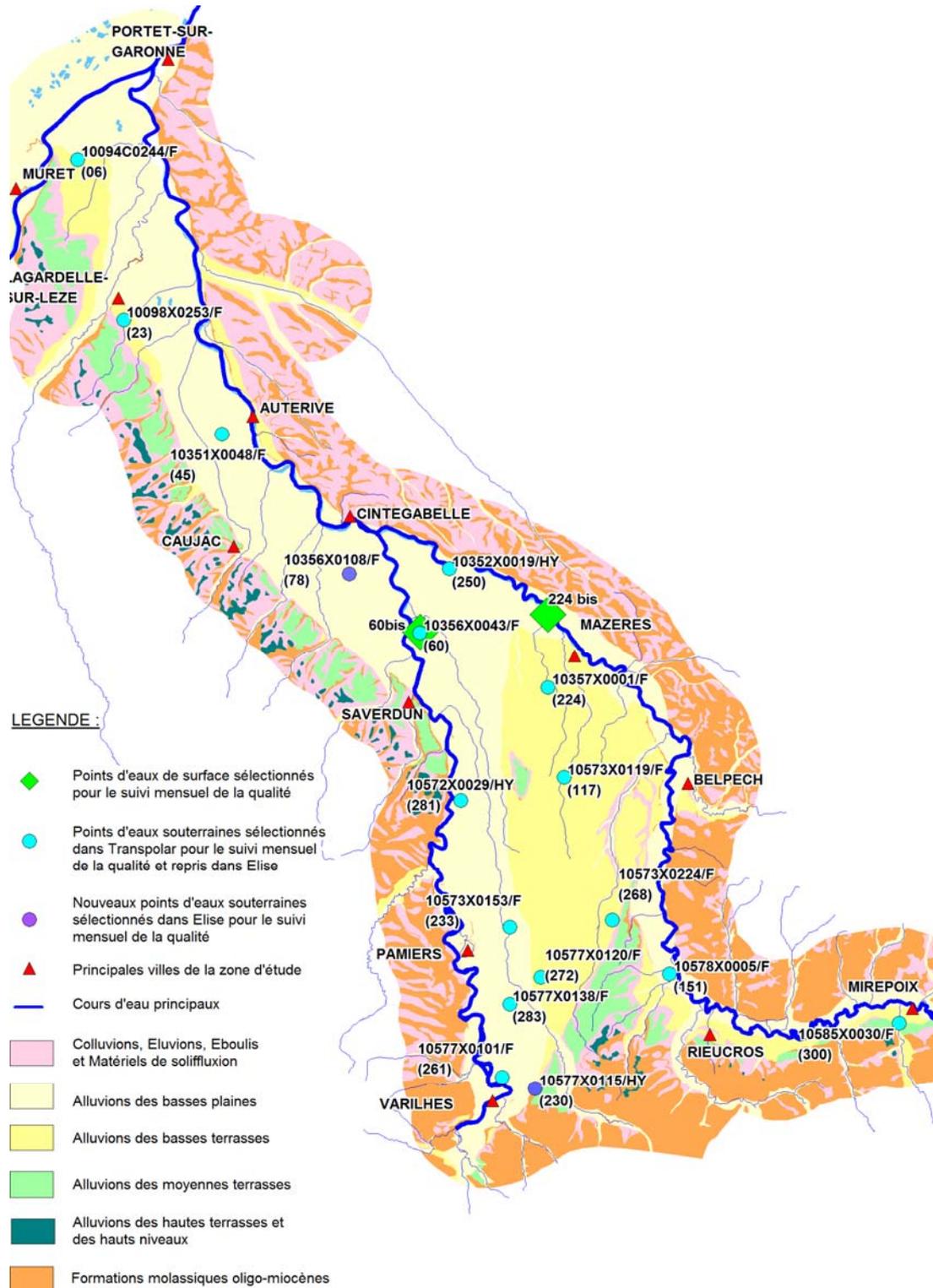


Illustration 4 - Localisation des points d'eau sélectionnés pour le suivi de la qualité de la nappe alluviale et des eaux de surface

- Pour le dosage des anions : rinçage (3 fois) des flacons de 125 mL en propylène par une eau filtrée puis échantillonnage de 125 mL d'eau filtrée in situ à l'aide d'une seringue munie d'un filtre à 0,45 µm,

- Pour le dosage des cations : rinçage (3 fois) des flacons de 50 mL en propylène par un eau filtrée puis échantillonnage de 125 ml d'eau filtrée in situ à l'aide d'une seringue munie d'un filtre à 0,45 µm. Acidification de l'eau par de l'acide nitrique (HNO₃) jusqu'à obtention d'un pH inférieur à 2. Contrôle du pH à l'aide de bandelettes,
 - Pour le dosage des pesticides : rinçage (3 fois) des flacons de 1000 mL en verre ambré avec bouchon en téflon par une eau brute puis échantillonnage,
- Conservation à 4°C et expédition au laboratoire.

Les analyses des éléments majeurs et des teneurs en pesticides ont été réalisées par le laboratoire du BRGM (direction LAB accréditée COFRAC). Les analyses physico-chimiques sont faites selon les normes NF EN ISO/CEI 17025 et NF EN ISO 9001-2000.

Le développement analytique réalisé dans le cadre du projet a permis d'ajouter à la liste des substances recherchées dans le cadre du projet Transpolar, **les métabolites neutres des chloroacétanilides**. Le glyphosate et son métabolite AMPA ont également été inclus à ce suivi.

2.2.2. Résultats

Situation piézométrique

Les données de précipitations enregistrées par MétéoFrance dans les stations de Cugnaux (bleu), Montaut (vert) et Pamiers (violet) depuis 1995, permettent de décrire le contexte pluviométrique dans lequel s'effectue le suivi de la qualité de la nappe et plus largement de l'étude (Illustration 5).

Depuis 2005, les cumuls annuels sont plutôt inférieurs à la moyenne voire équivalents à la moyenne établie sur la période 1995-2011. L'année 2011 apparaît particulièrement déficitaire pour les stations de Cugnaux et Montaut (Nord et partie centrale de la zone d'étude).

L'ensemble des données n'étant pas encore disponible pour l'année 2012, le cumul n'est pas présenté mais 2012 s'annonce également comme une année déficitaire. On notera toutefois que le mois de décembre a été fortement pluvieux.

Ce contexte déficitaire enregistré depuis plusieurs années se traduit par des niveaux d'eau bas en automne 2012 correspondant aux niveaux les plus bas enregistrés depuis 2009 pour la plupart des points du monitoring (à l'exception des points 60 et 272).

Données qualité de l'eau

A ce jour, les données complètes disponibles portent sur les campagnes de mars à octobre 2012. Le développement analytique spécifique aux métabolites neutres ayant été effectué en 2 étapes, 8 nouvelles molécules ont été intégrées depuis mars 2008 à la liste Transpolar auxquelles s'ajoutent 10 autres métabolites depuis octobre 2012.

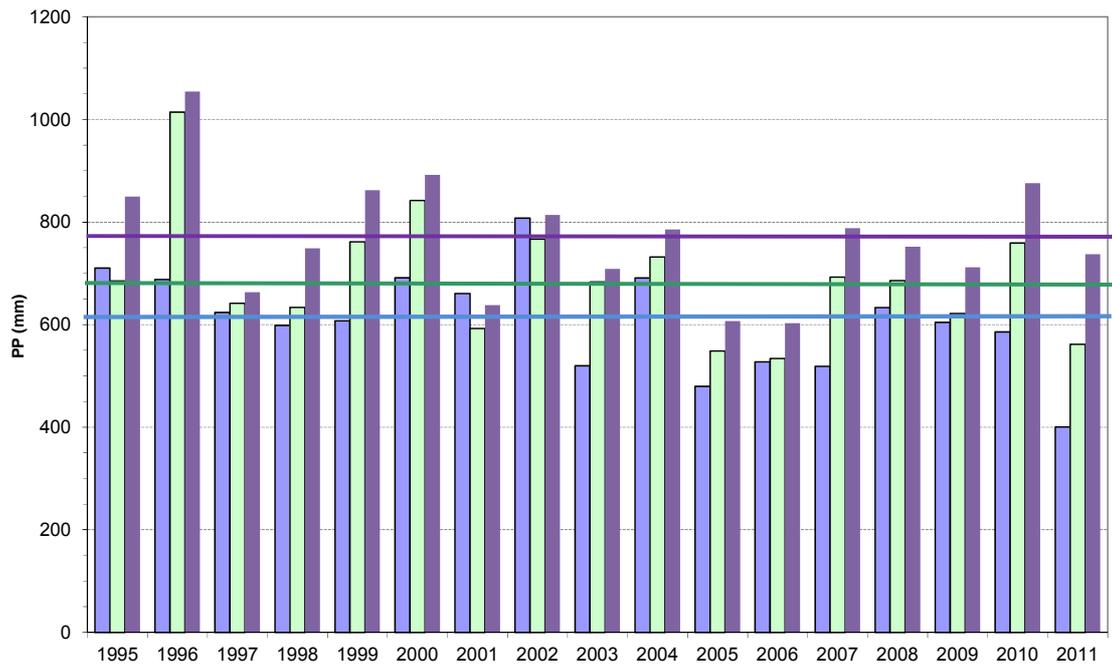


Illustration 5 - Précipitations annuelles enregistrées à Cugnaux (bleu), Montaut (vert) et Pamiers (violet) et moyennes annuelles sur la période 1995-2011.

Pour les eaux souterraines, ces premiers résultats montrent que 3 nouvelles substances ont été quantifiées au moins une fois sur un des points d'eau. Il s'agit de l'hydroxymétolachlore, le métolachlore morpholinone et le deschlorométolachlore. L'hydroxymétolachlore a été quantifié sur 5 points, le métolachlore morpholinone sur 2 points et le deschlorométolachlore sur un seul point. Le point 151 apparait comme celui ayant le plus de quantifications pour ces 3 molécules mais aussi les teneurs les plus importantes. Lors de la campagne d'octobre 2012, l'hydroxyalchlore a également été quantifié sur ce point 151 (0.011 µg/L) alors qu'aucune autre des 10 substances nouvellement recherchées n'a été quantifiée sur aucun des points.

Pour les 2 points d'eau de surface suivis depuis juillet 2012, l'hydroxymétolachlore, le métolachlore morpholinone et le deschlorométolachlore ont également été quantifiés avec des teneurs faibles (maximum de 0.023 µg/L pour le deschlorométolachlore pour le point 224bis et 0.046 µg/L pour le métolachlore morpholinone pour le point 60 bis). En plus de ces 3 substances, l'hydroxyacétolchlore a été retrouvé (0.011 µg/L) lors de sa première recherche en octobre 2012 au point 224bis.

En ce qui concerne les métabolites ESA et OXA toujours recherchés, l'ESA métolachlore a été quantifié au moins 5 fois sur les 17 points d'eau souterraine (8/8 pour 11 des points et 7/7 pour 1 point) alors que l'OXA métolachlore l'est un peu moins souvent (9 points sur 17 présentent au moins une quantification dont un seul point 8 fois sur 8). Le métolachlore a été quantifié au moins 1 fois sur chacun des 17 points dont 3 présentent une quantification systématique.

Il convient de noter qu'outre ces molécules, d'autres substances ont été recherchées et quantifiées dans les eaux souterraines. Ainsi pour les chloroacétanilides, les métabolites ESA acétolchlore, ESA alachlore et OXA alachlore ont été quantifiés ainsi que l'acétolchlore et l'alachlore. Le diméthénamide a été quantifié sur 1 point d'eau, le métazachlore dans 2 points d'eau.

Des triazines et leurs métabolites sont également quantifiés ainsi que certaines urées mais de façon plus sporadique. Le glyphosate et son métabolite AMPA intégrés à ce suivi ont été quantifiés (au moins 1 fois sur 10 des points pour le glyphosate et sur 6 points pour l'AMPA). Enfin, le tébuconazole apparaît comme le conazole, sur les 3 recherchés, quantifié dans le plus de points (4).

Le nombre de campagnes de mesures effectuées dans le cadre du projet ELISE et pour lesquelles les résultats sont disponibles à ce jour étant restreint, les résultats ne sont pas détaillés ici. Une présentation fine sera réalisée dans le prochain rapport pour lequel les données relatives à plus d'une année hydrologique auront été acquises.

2.3. CARACTERISATION DU FONCTIONNEMENT HYDRODYNAMIQUE

Afin de compléter la connaissance du fonctionnement hydrodynamique de la plaine, un volet relatif à la caractérisation des éventuelles relations eau de surface - eau souterraine est entrepris à partir d'une approche géochimique et isotopique. L'objectif recherché est de mettre en évidence l'influence d'un compartiment hydrologique sur l'autre en termes de qualité des eaux lors de situations hydrologiques contrastées (hautes et basses eaux).

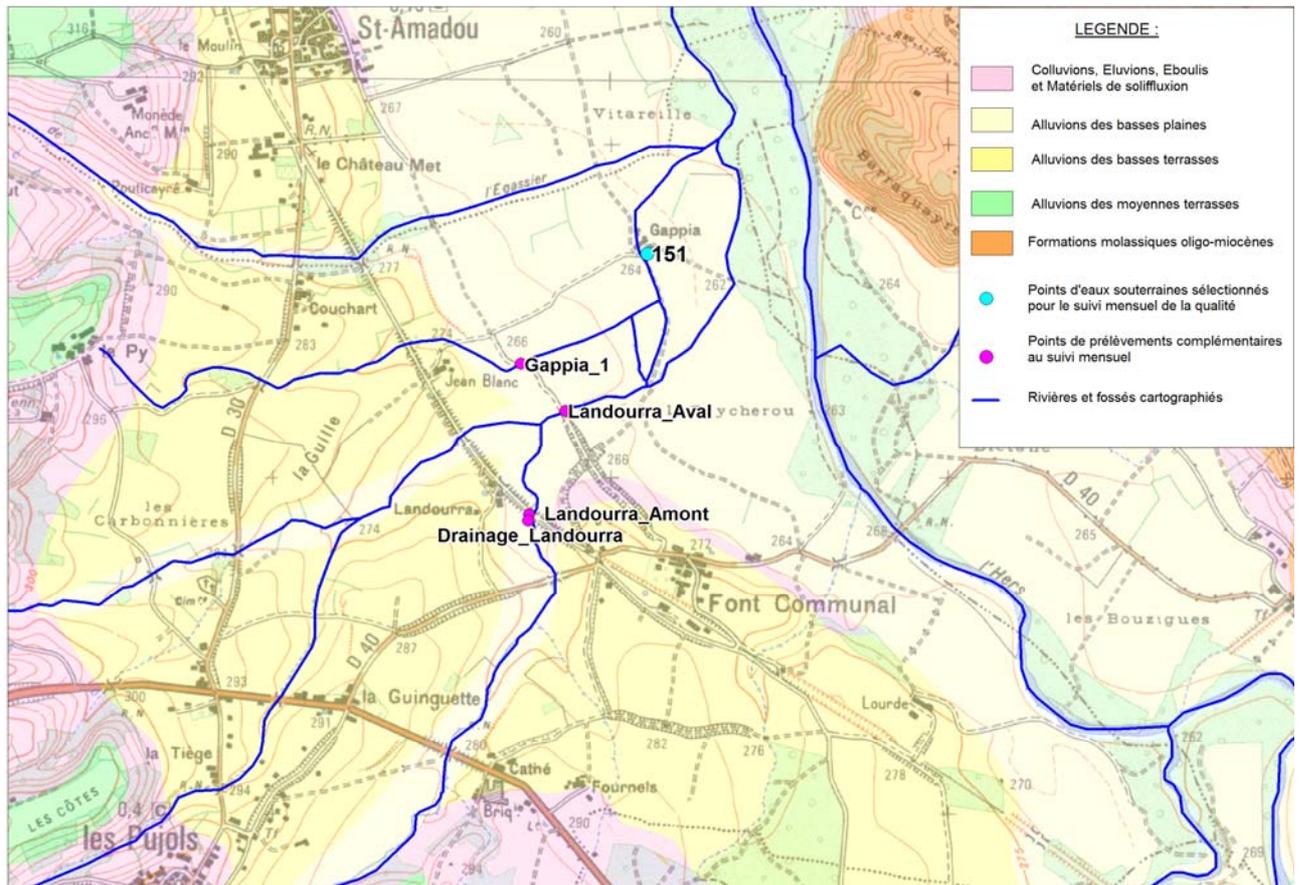


Illustration 6 - Localisation des points d'eau souterraine et de surface échantillonnés en période de basses eaux 2012 (septembre-octobre) destinées notamment à l'analyse des isotopes du strontium

En période de basses eaux (septembre-octobre 2012), 11 prélèvements d'eaux souterraines (puits / source) et 11 d'eaux de surface (Ariège / Hers Vif / Crieu / Raunier) ont ainsi été effectués (Illustration 6). Outre les mesures des paramètres physico-chimiques non conservatifs de terrain et l'analyse des ions majeurs, ces échantillons sont également destinés à l'analyse des concentrations en strontium et des rapports isotopiques $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, cet outil ayant montré son

intérêt dans la zone d'étude (Baran et Saplaïroles, 2012). Les analyses sont en cours et les résultats seront présentés ultérieurement. Ce type de mesures sera réitéré en périodes de hautes eaux au cours de l'année 2013.

Plus localement, de façon à préciser les éventuels échanges entre les fossés et les points 117 et 151, des mesures de pesticides ont été réalisées dans les eaux de surface (Illustration 7). Ces fossés particulièrement profonds peuvent probablement, dans certains cas, drainer la nappe. Un exutoire de réseau de drainage agricole situé à l'amont du point 151 est également investigué. Sur ces points complémentaires, les premières analyses révèlent la présence de métolachlore et ses métabolites ioniques à des teneurs pouvant atteindre plusieurs $\mu\text{g/L}$. Certains échantillons montrent également des teneurs de plusieurs centaines de ng/L de glyphosate et d'AMPA. La poursuite des mesures permettra de mieux contraindre les gammes de concentrations mais aussi de voir si les évolutions temporelles dans les eaux de surface et dans les eaux souterraines sont structurées de manière similaire ou non.



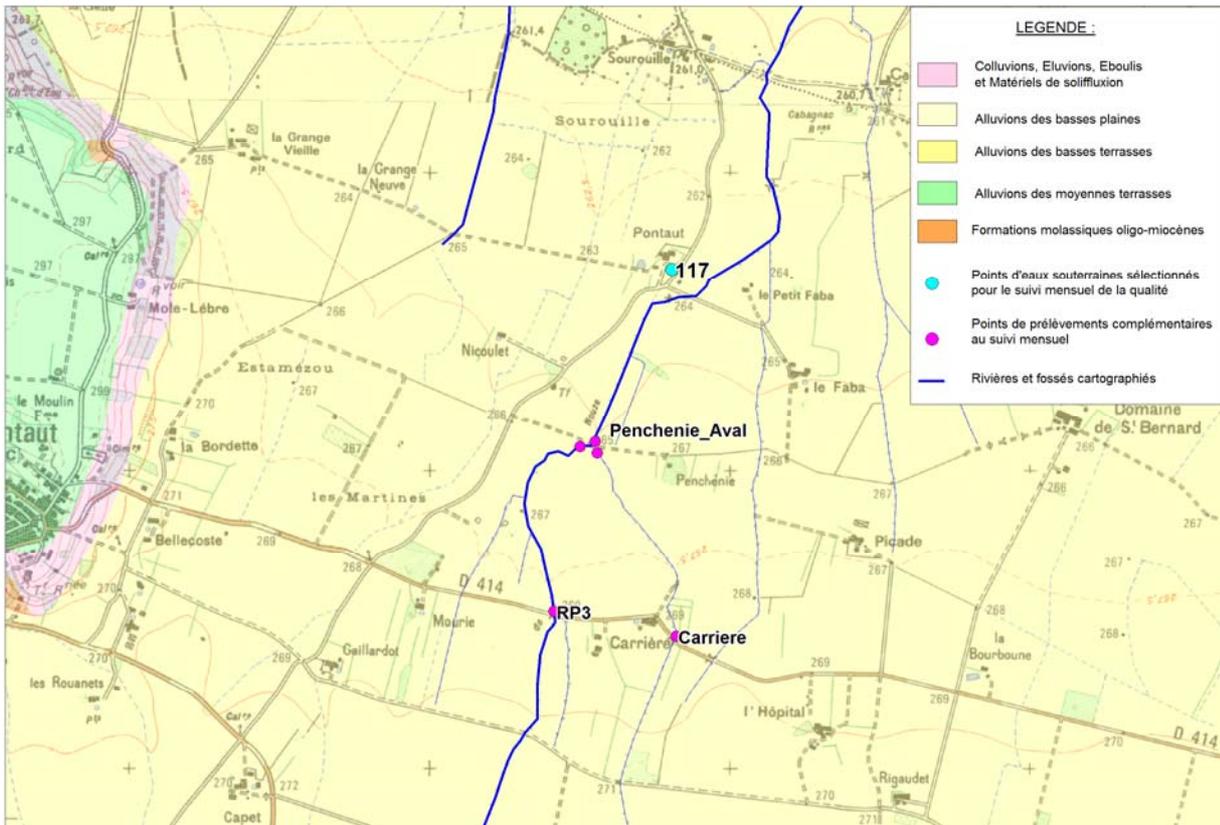


Illustration 7 – Localisation des points de prélèvements complémentaires au réseau de suivi mensuel de la qualité

3. Etude des amphibiens

La rédaction de ce chapitre est sous la responsabilité des laboratoires ECOLAB et EDB.

Compte-tenu de la détection fréquente du métolachlore dans les eaux souterraines de la plaine de l'Ariège, cette molécule a été retenue comme la première substance testée en laboratoire.

Pour ce qui concerne les expositions *in situ* ou à partir d'eaux prélevées *in situ*, les potentiels effets des mélanges sont évalués.

3.1. TESTS DE LABORATOIRE DE TOXICITE AIGUE, CHRONIQUE ET GENETIQUE

A ce stade du projet, la toxicité du S-métolachlore en tant que substance pure a été évaluée au laboratoire chez le modèle *Xenopus laevis*.

3.1.1. Modèle biologique : L'amphibien *Xenopus laevis*

Xenopus Laevis est un amphibien de l'ordre des anoures de la famille des *Pipidae* originaire d'Afrique du sud. *Xenopus Laevis* a un mode de vie exclusivement aquatique. Il atteint sa maturité sexuelle un peu avant deux ans. Le mâle adulte peut mesurer de 7 à 8 cm et la femelle de 9 à 12 cm (Illustration 8). Leur acclimatation en laboratoire est relativement aisée. Les deux sexes sont élevés en aquariums séparés à une température de $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Ils sont nourris deux fois par semaine avec des granulés (Skretting, France).



Illustration 8 - *Xenopus laevis* adultes, male à droite et femelle à gauche

Le couple adulte sélectionné pour la reproduction est placé une journée à une température comprise entre 20 et 22°C dans un bac plastique sombre. Les pontes sont obtenues par accouplement naturel (Illustration 9) après fertilisation par injection de 50 UI de gonadotropine sérique de jument PSMG 500 (Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin, Intervet, France, [9002-70-4]) pour les mâles et 750 UI de gonadotrophine chorionique humaine HCG (Human Chorionic Gonadotrophin, MSD, France, [9002-61-3]) pour les femelles.



Illustration 9 - Accouplement de 2 adultes *Xenopus laevis* (amplexus)

L'eau du bac est oxygénée à l'aide d'un bulleur et la température est ajustée à 22°C. Le développement des larves est ainsi très rapide. L'éclosion se produit environ 48 heures après la ponte. Au sixième jour de développement, les larves sont transférées dans des aquariums de 50 litres munis de bulleurs et maintenus à 22 ± 1°C. Les larves de Xénope sont nourries quotidiennement de paillettes déshydratées commercialisées (TétraPhyll®) pour poissons d'ornement.

3.2. PARAMETRES ECOTOXICOLOGIQUES MESURES (END-POINTS BIOLOGIQUES)

3.2.1. Approches mises en œuvre

Plusieurs approches ont été mises en œuvre visant à définir :

- La toxicité aiguë
- La toxicité chronique (croissance)
- La toxicité génétique, induction de micronoyau (Essai micronoyau)

L'évaluation de la toxicité aiguë permet de mettre en évidence un effet létal après 12 jours d'exposition en conditions semi-statiques chez les larves exposées par comparaison aux larves T⁻. Le protocole est le suivant : Les larves mortes sont prélevées et décomptées chaque 24h. La toxicité est évaluée par observation visuelle de la survie et exprimée en pourcentage. Le seuil de significativité de la mortalité est établi à 25% correspondant à 5 larves sur 20.

L'évaluation de la toxicité chronique permet de mettre en évidence une inhibition de croissance potentielle chez les larves exposées par comparaison aux larves T⁻. Le protocole est le suivant : La toxicité est évaluée par observation visuelle (i) de la croissance par rapport aux larves T⁻ et (ii) par mesure de la longueur de chaque larve sur photographie (Illustration 10) au premier (T0) et dernier jour (T12) d'exposition à l'aide du logiciel Mesurim (Madre, 2006). Cette mesure permet le calcul du taux de croissance selon l'équation suivante :
$$\left[\frac{(\text{moyCdt}^{\circ}\text{X}_{\text{T12}} - \text{moyCdt}^{\circ}\text{X}_{\text{T0}}) - (\text{moyCdt}^{\circ}\text{T}_{\text{T12}} - \text{moyCdt}^{\circ}\text{T}_{\text{T0}})}{(\text{moyCdt}^{\circ}\text{T}_{\text{T12}} - \text{moyCdt}^{\circ}\text{T}_{\text{T0}})} \right] * 100$$
 avec taille moyenne des larves de la condition X à T12 : moyCdt[°]X_{T12} et à T0 : moyCdt[°]X_{T0} ; taille moyenne des larves de la condition T⁻ à T12 : moyCdt[°]T_{T12} et à T0 : moyCdt[°]T_{T0}.



Illustration 10 - Photographie d'une larve au stade 50 pour mesure de sa taille

Le traitement statistique des données brutes relatives à la taille des larves est réalisé à l'aide du logiciel Sigma stat 3.1. En début et fin d'exposition (T0 et T12), les tailles des larves (en cm) sont comparées à l'aide de tests statistiques non paramétriques (absence de normalité des données) pour données non appariées (une seule mesure par individu) afin :

- de confirmer qu'il n'y a pas de différence de taille significative à T0 entre les larves d'un même lot et entre les différents lots,
- d'étudier la différence significative éventuelle de croissance à T12 entre les différents lots par rapport au T⁰,
- d'étudier la différence significative éventuelle pour un même lot entre T0 et T12.

Le test statistique de Kruskal-Wallis (analyse de variance sur les rangs) est effectué pour la comparaison entre toutes les conditions, suivi d'un test de Dunn (comparaison multiple versus un groupe contrôle pour échantillon de même taille) ou de Dunnett (pour échantillon de taille différente) pour isoler le(s) groupe(s) responsable(s) de cette différence.

Le test statistique de Mann-Whitney est également utilisé pour effectuer une comparaison deux à deux.

Pour la **toxicité génétique, induction de micronoyau (Essai micronoyau)**, le principe est le suivant.

Les micronoyaux sont de petites masses intracytoplasmiques de chromatine ayant l'apparence de petits noyaux (Illustration 11). Il s'agit de fragments de chromosomes ou de chromosomes entiers n'ayant pas migré à l'un des pôles du fuseau lors de l'anaphase de la division cellulaire (Illustration 11). Les micronoyaux se forment à la suite (i) de cassures chromosomiques : les fragments chromosomiques dépourvus de centromère ne peuvent plus contracter de liens avec le fuseau de division, et/ou (ii) d'une altération de la structure et/ou du fonctionnement de l'appareil mitotique : des chromosomes entiers sont susceptibles, dans ce cas, de ne pas migrer aux pôles au moment de l'anaphase.

Une substance provoquant la formation de micronoyaux peut correspondre à un agent clastogène et/ou à un poison fusorial. Le test micronoyau permet donc de déceler le mode d'action d'agents clastogènes (cassures chromosomiques avec l'ADN comme cible) et/ou aneugènes (aneuploïdie, cibles la plupart du temps non ADN).

Le protocole mis en œuvre est : Après 12 jours d'exposition, une ponction intracardiaque est pratiquée sur chaque larve au préalable immobilisée par immersion dans une solution de tricaïne méthane sulfonate (MS 222, Sandoz). La génotoxicité est alors évaluée sur les frottis sanguins par dénombrement d'érythrocytes à micronoyaux parmi 1000 érythrocytes (Illustration 11) observés sur ces préparations histologiques à l'aide d'un microscope photonique (Olympus CX41) à immersion après dépôt d'une goutte d'huile (Cargille Laboratoire, Type A).

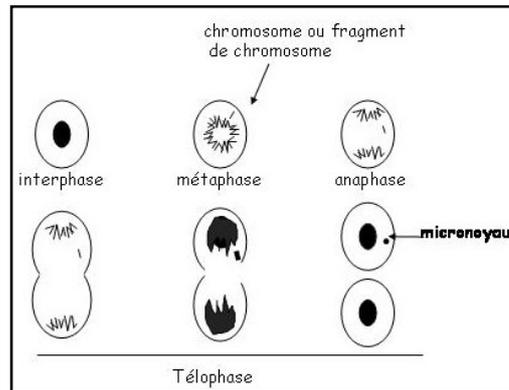
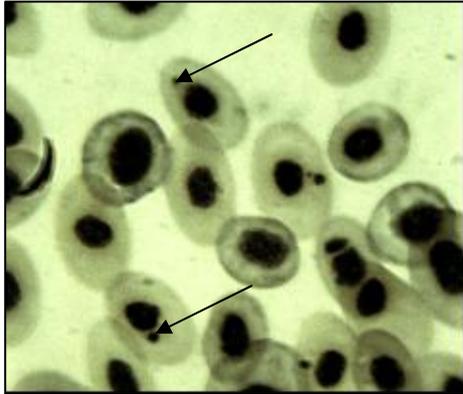


Illustration 11 - Micronoyaux. Frottis sanguin de Xénope (à gauche) (certains micronoyaux sont indiqués par une flèche). Schématisation de l'apparition d'un micronoyau au cours d'une mitose dans un érythrocyte du sang circulant (à droite).

Les données de génotoxicité à 12 jours (induction de micronoyau) sont traitées selon les recommandations décrites dans le fascicule de la norme AFNOR 2000 et ISO 2006.

La méthode statistique utilisée pour analyser les résultats est celle de McGill (McGill *et al.*, 1978), recommandée dans le fascicule de la norme (ISO, 2006). Basée sur les rangs de la médiane et des quartiles, elle permet en particulier le traitement de résultats obtenus sur de petits échantillons ($n \geq 7$ soit 35%) dont la distribution des valeurs n'obéit pas à une loi normale. Un échantillon est constitué par n valeurs correspondant au nombre de frottis réalisés par lot.

Pour chaque lot ou échantillon, la conduite du traitement statistique consiste en la détermination des rangs de la médiane M , du quartile inférieur QI et du quartile supérieur QS par les formules de l'illustration 12.

Echantillon comportant un nombre pair de valeurs ($n=2p$)		Echantillon comportant un nombre impair de valeurs ($n=2p+1$)
Rang de M	$[p + (p+1)]/2$	$p + 1$
Rang de QI	$(p + 1)/2$	$(p/2) + 1$
Rang de QS	$P + [(p+1)/2]$	$(3p/2) + 1$

Illustration 12 - Formule de détermination des rangs de la médiane, du quartile inférieur QI et du quartile supérieur QS . Dédutions des valeurs de M , QI et QS .

Les valeurs des EMN $^{\circ}/^{\circ}$ sont classées par ordre croissant, déterminant ainsi un rang à chacune des valeurs. Les valeurs de M , QI , QS sont égales aux valeurs de EMN $^{\circ}/^{\circ}$ de rang correspondant.

Déterminations de l'intervalle de confiance IC de la médiane, au seuil de sécurité de 95% selon la formule : $M \pm 1,57 \times EIQ / \sqrt{n}$ Où M est la valeur de la médiane, n est le nombre de frottis par lot et EIQ est la valeur de l'écart interquartile ($QS - QI$).

La différence entre les médianes de deux échantillons est significative si leurs intervalles de confiance n'ont pas de point commun. Pour qu'un test micronoyau soit validé, la médiane du lot témoin négatif doit être statistiquement différente de celle du lot témoin positif.

Le résultat d'un lot est considéré :

- Positif lorsque la médiane est supérieure au double de celle du lot témoin négatif et si les intervalles de confiance ne se chevauchent pas. Le milieu d'exposition est génotoxique pour les larves dans les conditions du test.

- Négatif lorsque l'intervalle de confiance du lot traité n'est pas distinct de celui du lot témoin négatif. Le milieu d'exposition n'est pas génotoxique pour les larves dans les conditions du test.

3.2.2. Protocole d'exposition des larves et conditions expérimentales, contrôles négatif et positif

Le protocole d'exposition des larves, préalable à la réalisation des essais biologiques, est décrit dans le fascicule de recommandations ISO 21-427-2006 (ISO, 2006). Les lots de larves (n=20), issues d'une même ponte (afin d'éviter la variabilité génétique entre les lots), sont maintenus en cristallisoirs de verre contenant 100 mL de milieu d'exposition par larve (Volume final = 2L). Ces dernières sont soumises à un rythme d'éclairement nyctéméral en lumière naturelle tamisée.

La durée d'exposition des essais biologiques est de 12 jours (ISO, 2006), durée pendant laquelle les larves de Xénope sont nourries de paillettes déshydratées (TetraPhyll®) préalablement réduites en poudre et maintenues dans des enceintes thermostatée à $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Les milieux et la nourriture sont renouvelés quotidiennement.

Le milieu d'exposition doit avoir un pH de 7 environ (compris entre 6,5 et 8,5) et un taux d'oxygène dissous supérieur à 60% de la valeur de saturation, conditions optimales de la vie larvaire.

Les essais d'exposition sont conduits dans l'eau standard déionisée, à laquelle sont ajoutés des sels minéraux : 294 mg/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 123,5 mg/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 64,75 mg/l de NaHCO_3 – 5,75 mg/l de KCl. Cette eau est appelée eau reconstituée (ER), préconisée par la norme ISO (2006).

Pour chaque essai, un lot **Témoin négatif (T⁻)** est mis en œuvre dans la seule ER en absence de tout contaminant. Ce lot T⁻ sert de référence à chaque type d'end-points (mortalité, croissance et génotoxicité).

Un lot **Témoin positif (T⁺)** est également mis en œuvre dans cette même eau ER additionnée d'un agent mutagène de référence à la concentration de 20 mg/L (Cyclophosphamide, CP [6055-19-2], Sigma France). Ce témoin positif sert de témoin génotoxique aux essais de génotoxicité. Il valide la sensibilité de la ponte.

Le stade larvaire choisi pour le début de l'exposition est celui retenu dans la procédure normalisée du test micronoyau Amphibien (ISO, 2006). Le stade 50 de la table du développement de *Xenopus laevis* (Nieuwkopp et Faber, 1956) correspondent à une période d'érythropoïèse intense, nécessaire à la réalisation de l'essai micronoyau. En effet cette période est caractérisée par la division active des globules rouges dans le sang circulant et donne lieu à un indice mitotique élevé (Deparis, 1973). Le stade 50 chez le Xénope est repérable par la présence d'une constriction morphologique (Illustration 13) à la base du bourgeon des membres postérieurs. Les animaux mesurent de 20 à 27 mm.

La fin de l'exposition survient avant la métamorphose au-delà de laquelle l'érythropoïèse devient insuffisante pour induire un index mitotique élevé indispensable à la réalisation du test micronoyau.

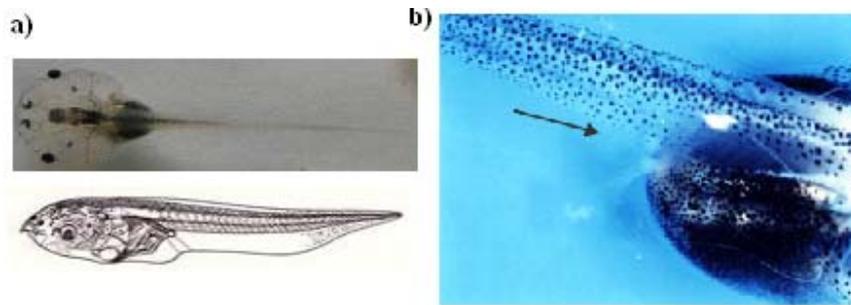


Illustration 13 - a) Larve de Xénope en vue dorsale (haut) et latérale (bas : illustration Nieuwkoop et Faber, 1956) au stade 50 de la table de développement, b) Détail du membre postérieur de la larve de Xénope au stade 50, constriction à la base (source Centre de Biologie du Développement)

Les érythrocytes de larves de Xénope se divisent activement dans le sang circulant de ces animaux. De nombreux travaux réalisés au laboratoire dans le cadre de la mise en œuvre du test micronoyau ont largement démontré leur sensibilité aux substances génotoxiques depuis de nombreuses années (Mouchet et Gauthier, 2012). Ces cellules sont d'obtention aisée par la réalisation d'un prélèvement sanguin intracardiaque. Le taux de lymphocytes étant d'environ un pour mille érythrocytes (Gauthier, 1996), aucune étape intermédiaire d'isolement cellulaire à partir des échantillons de sang total prélevé n'est nécessaire.

A la fin de l'exposition, chaque larve est immobilisée par immersion dans une solution de tricaine méthane sulfonate (MS 222, Sandoz). Une ponction intracardiaque de chaque larve (Illustration 14) est rapidement réalisée sous loupe binoculaire.

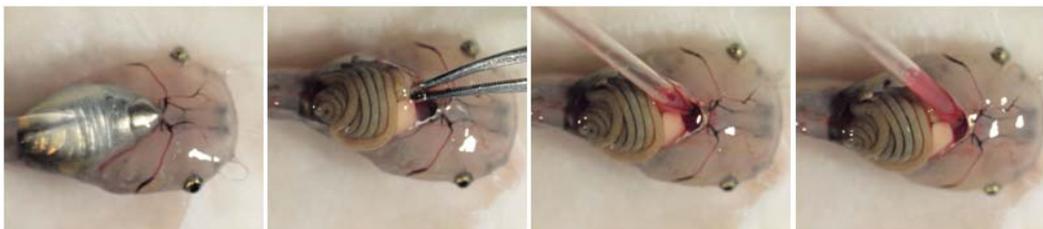


Illustration 14 - Ponction intracardiaque d'une larve de Xénope au stade 54.

La peau est incisée à l'aide de pinces fines de façon à dégager le muscle cardiaque. Une micropipette de 100 μm de diamètre, étirée sur un appareil « MPI instrument » dont la pointe est préalablement taillée en biseau et héparinée (solution d'héparine lyophilisée à 7‰ de chlorure de sodium), est introduite dans le ventricule. L'autre extrémité de la pipette est reliée à la bouche de l'expérimentateur par l'intermédiaire d'un tuyau souple muni d'un embout en plastique. Les contractions cardiaques permettent au sang de monter dans la micropipette par capillarité.

L'échantillon sanguin ainsi obtenu pour chaque larve est essentiellement constitué d'érythrocytes (Gauthier, 1996). Chaque échantillon fournit un frottis qui sera le support de l'analyse du test biologique.

3.2.3. Concentrations de S-métolachlore

Un essai micronoyau a été réalisé afin d'évaluer la toxicité du S-métolachlore en tant que substance pure chez les larves de l'amphibien Xénope. Les concentrations de S-métolachlore étudiées sont **0,01 – 0,1 – 1 et 10mg/L**.

3.2.4. Résultats

Les résultats (Illustration 15) mettent en évidence une absence de mortalité chez les larves exposées au S-métolachlore à 0,01 mg/L et une faible mortalité chez les organismes exposés aux concentrations supérieures. Dans tous les cas, cette mortalité n'est pas significative.

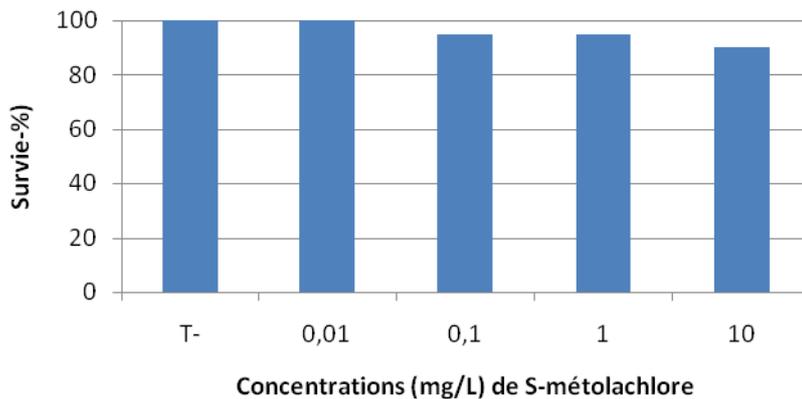


Illustration 15 - Représentation graphique du Taux de mortalité chez les larves de Xénope exposées à 0,01 – 0,1 – 1 et 10mg/L de S-métolachlore. T : Témoin négatif (eau standardisée, ISO 2006)

Les résultats (Illustration 16) montrent une inhibition de croissance dose dépendante significative chez les larves de Xénope exposées 12 jours au S-métolachlore, mais de faible amplitude, à partir de 0,1 mg/L. Au contraire, les résultats montrent une absence d'effet sur la croissance chez les larves exposées à la plus faible concentration (0,01 mg/L).

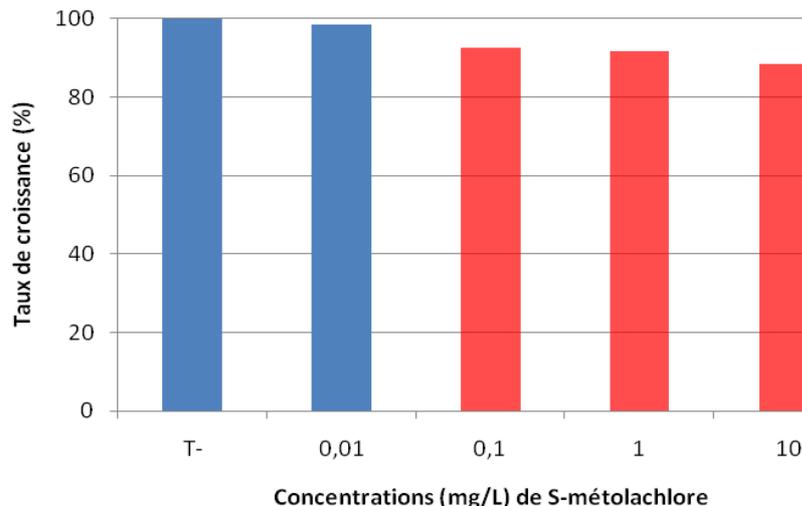


Illustration 16 - Taux de croissance chez les larves de Xénope exposées à 0,01 – 0,1 – 1 – 10 mg/L de S-métolachlore en eau standardisée (ISO, 2006) ; Témoin : eau standardisée (ISO, 2006). Les histogrammes en rouge correspondent à une concentration à laquelle est observée une inhibition de croissance significative par rapport au T-

Les résultats (Illustration 17) montrent une réponse génotoxique chez les larves exposées au CP par rapport au T-. Ce résultat valide l'expérience. Les résultats mettent en évidence une absence de génotoxicité chez les larves exposées au S-métolachlore, quelles que soient les concentrations, par rapport aux larves T-. Cependant on peut noter l'augmentation des valeurs médianes à partir de 0,01 mg/L avec effet dose jusqu'à 1 mg/L, concentration à laquelle on observe un maximum de réponse (intensité double), puis une diminution de la valeur médiane chez les larves exposées à la plus forte concentration (10 mg/L).

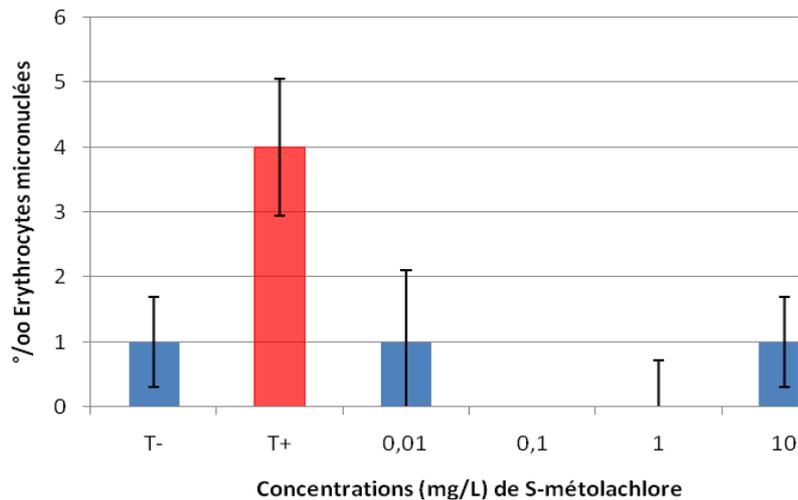


Illustration 17 - Fréquence pour mille des érythrocytes micronucléés (EMN‰) chez les larves de *Xenopus* exposées à un gradient de concentration de S-métolachlore de 0,01 – 0,1 – 1 – 10 mg/L en comparaison avec les larves du témoin négatif en eau standardisée (ISO, 2006) ; T : eau standardisée (ISO, 2006) – T⁺ : 40mg/L de CP en eau standardisée (ISO, 2006). * : génotoxicité significative par rapport au T

3.3. EXPOSITION EN LABORATOIRE DU MODELE AMPHIBIEN *Xenopus laevis* DANS DES EAUX DE SURFACE DU SITE D'ETUDE

L'analyse consiste en une comparaison de l'état biologique des eaux de surface associées à 3 sites choisis parmi ou à proximité des 16 points d'eau étudiés depuis 2009. Le choix a surtout été guidé par les concentrations en métolachlore et produits de dégradation mesurés historiquement.

Les sites choisis pour l'étude sont identifiés comme suit :

- **Site 00**, correspond au site choisi comme milieu de référence, il s'agit d'une zone à l'activité agricole réduite avec une prédominance des surfaces de prairies.
- **Site 01**, correspond au site choisi comme milieu intermédiaire. La zone d'échantillonnage se situe sur le domaine des oiseaux de Mazères. Le site 01 est au centre d'une large surface non cultivée, ponctuée de mares artificielles et naturelles avec une activité agricole importante à l'est et en amont.
- **Site 02**, correspond au site choisi comme milieu à forte pression de contamination. Ce point se situe dans la partie centrale de la plaine, entre Cintegabelle, Saverdun et Mazères, où la culture du maïs est largement dominante.

Sur chacun des 3 sites, les paramètres mesurés sont :

- Le nombre d'individus de chaque espèce d'amphibien présente sur le site.

- Le nombre de pontes d'amphibiens présents sur les sites et détermination de l'espèce dont elles sont issues.
- La taille des individus mâle et femelle de chaque espèce (longueur museau-cloaque et longueur totale (cm)).

Site 00 point 261 → site de référence



Site 01 point 224 → site intermédiaire



Site 02 point 60 → site « pollué »



Illustration 18 - Zones d'échantillonnage

Pour chacun des 3 sites, 30 L d'eau ont été prélevés au seau puis stockés en chambre froide (4°C), jusqu'à leur utilisation (Illustration 19). Un essai micronoyau a été réalisé à partir de l'eau prélevée à chacun de ces sites.



Illustration 19 - Eaux prélevées sur chaque site et stockées en erlenmyer (2L)

Pour chacune de ces eaux, le BRGM a réalisé un dosage des 55 molécules rapportées dans le tableau suivant (Illustration 20).

Les résultats montrent une très faible mortalité des larves exposées aux eaux prélevées quel que soit le site d'étude (Illustration 21). Ce résultat suggère que quel que soit le niveau de la contamination évaluée a priori à partir des données du suivi Transpolar, on observe une absence d'effet létal chez les larves exposées. Ce résultat n'est pas surprenant en soit. Il convient de noter que les résultats d'analyse physico-chimique sur lesquels ont été basés les choix des sites font référence à une période de 3 ans (2008 à 2010) et ne reflètent pas forcément la qualité du milieu au moment où les prélèvements ont été effectués.

Les résultats (Illustration 22) montrent une inhibition de croissance significative chez les larves exposées à l'eau de référence (site 00), à l'eau moyennement contaminée (site 01) et fortement contaminée (site 02) par rapport aux larves témoin (eau standardisée). Cette inhibition de croissance est d'autant plus importante que le gradient de contamination (basé sur l'évaluation

de la contamination des sites par rapport aux données historiques de Transpolar) augmente. Les résultats montrent également une différence significative de croissance entre les larves exposées aux eaux des sites de référence (site 00) et moyennement contaminé (site 01) d'une part et du site fortement contaminé d'autre part (site 02). On observe en revanche une croissance similaire chez les larves exposées à l'eau de référence et à l'eau moyennement contaminée.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2,6-diethylaniline	2-Chloro-2',6'-diethyl acétanilide	2-Chloro-2'-ethyl-6'-methylacétanilide	2-Ethoxymetol achlor	2-Hydroxy metolachlor	2-ethyl 6-methyl aniline	Acétochlore	Acétochlore oxalinique acide	Acétochlore éthane sulfonique	Alachlore
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Alachlore oxalinique acide	Alachlore éthane sulfonique	Amétryne	Atrazine	CO3 (carbonates)	Ca (Calcium)	Chlortoluron	Cl (Chlorure)	Cyanazine	Deschlorometolachlor
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Desmétryne	Diméth énamide	Diuron	Dés isopropyl atrazine	Déséthyl atrazine	Déséthyl terbutylazine	Fluzilazol	HCO3 bicarbonate	Hexa zininon	Isoproturon
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Isoproturon-1CH3	Isoproturon-2CH3	K (Potassium)	Linuron	Metolachlor morpho linone	Mg (magnésium)	Méta zachlore	Métolachlor	Métolachlor oxanilique acide	Métolachlor éthane sulfonique
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
NO3 (Nitrates)	Na (Sodium)	Prométryne	Propazine	Propy zamide	SO4 (Sulfates)	Simazine	Sébutylazine	Tebu conazole	Terbutyl azine
51	52	53	54	55					
Terbutryne	Tétra conazole	glyphosate	AMPA	glufosinate					

Illustration 20 - Liste des paramètres analysés pour les eaux utilisées pour l'exposition ex situ des xénopes

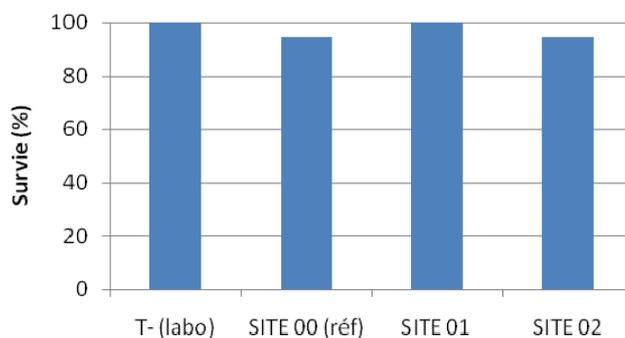


Illustration 21 - Représentation graphique du Taux de mortalité des larves de Xénope exposées aux eaux prélevées sur le site non contaminée (00), intermédiaire (01) et contaminée (02). T : eau standardisée

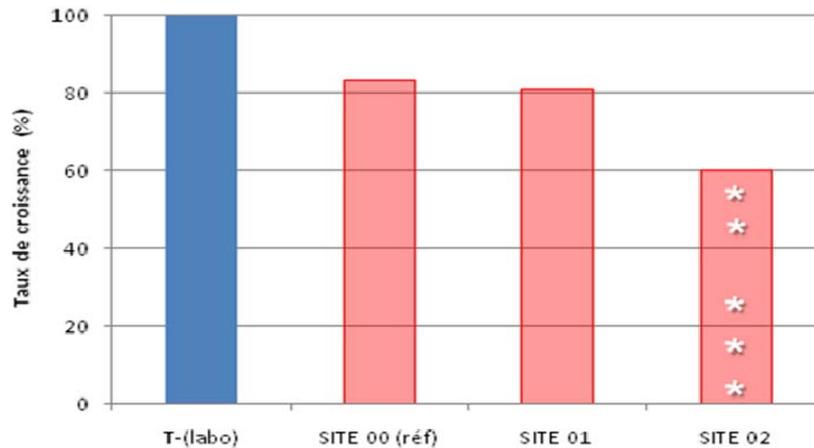


Illustration 22 - Taux de croissance des larves de Xénope exposées aux eaux prélevées sur le site non contaminée (00), intermédiaire (01) et contaminée (02) par rapport aux larves du témoin négatif T en eau standardisée (ISO, 2006)

Les résultats montrent une génotoxicité chez les larves exposées au CP et ce résultat valide l'expérience. On observe une absence de génotoxicité chez les larves exposées à l'eau des sites, quel que soit son niveau de contamination, par rapport aux larves T avec un niveau de réponse de type « plateau » d'intensité similaire pour chaque condition d'exposition.

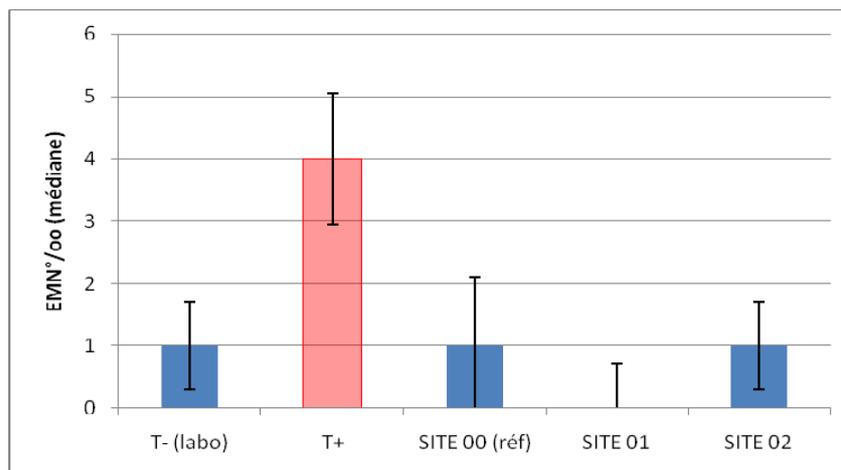


Illustration 23 - Fréquence pour mille des érythrocytes micronuclées (EMN%o) aux eaux prélevées sur le site non contaminée (00), intermédiaire (01) et contaminée (02) chez les larves de Xénope ; Histogramme rouge : condition génotoxique par rapport au T, T : eau standardisée (ISO, 2006) – T⁺ : CP 40 mg/L

3.4. DISTRIBUTION SPATIALE DES ESPECES SUR LA PLAINE

Le printemps sec et froid, précédé d'un hiver très rigoureux a été peu favorable aux amphibiens. Le site 00 présente la plus grande diversité spécifique puisque 5 espèces ont été observées : la salamandre tachetée (*Salamandra salamandra*), le triton marbré (*Triturus marmoratus*), le triton palmé (*Lissotriton helveticus*), la grenouille agile (*Rana dalmatina*) et le complexe des grenouilles vertes (*Pelophylax*).

Les urodèles sont les plus représentés sur chacun des sites par le nombre d'individus adultes, le nombre de juvéniles (larves de salamandre) mais aussi par les œufs. A l'exception des populations de triton palmé, les autres espèces ne sont représentées que par quelques individus adultes (moins de 10).

Une analyse statistique a été réalisée afin de comparer la taille des individus, le nombre de pontes, et le nombre d'individus. Les tests statistiques utilisés pour la comparaison des données sont d'une part, le test de Kruskal-Wallis qui compare les moyennes des données sur les trois sites, et d'autre part, le test de Mann-Whitney est utilisé pour la comparaison des sites deux à deux.

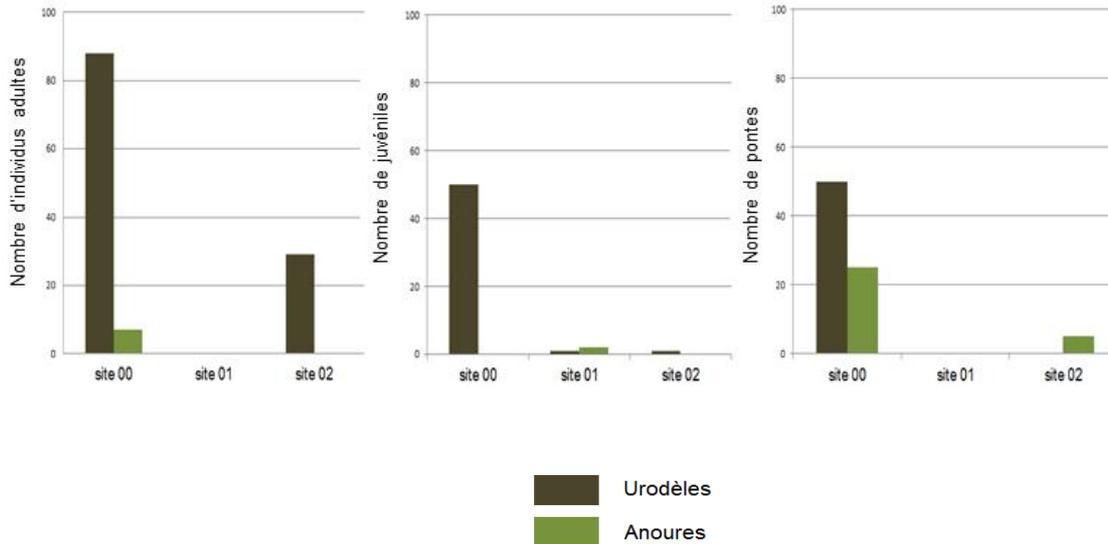


Illustration 24 - Nombre d'amphibiens (urodèles en vert foncé et anoures en vert clair) adultes, juvéniles et nombre de pontes d'amphibiens repérées sur le site « non contaminé » (00), le site intermédiaire (01) et le site « contaminé » (02)

	Chi-squared	df	Z	p-value
Kruskal-Wallis	11.28	2	-	0.0073 < 0,05
Mann et Whitney (site 00 / site 02)	-	-	2.0083	0.0446 < 0,05
Mann et Whitney (site 00 / site 01)	-	-	2.928	0.0034 < 0,05
Mann et Whitney (site 01/ site 02)	-	-	0.405	0.684 > 0,05

Illustration 25 - Résultat de l'analyse statistique comparant le nombre d'individus adultes repérés sur le site non contaminé (00), le site intermédiaire (01) et le site contaminé (02)

L'analyse statistique confirme la significativité de la différence du nombre d'individus adultes entre les 3 sites. La comparaison deux à deux de chaque site montre une différence significative du nombre d'individus adultes entre le site de référence (00) et le site contaminé (02). La différence du nombre d'individus adultes entre le site intermédiaire (01) et le site de référence (00) est également significative. Il n'y a pas de différence notable entre le nombre d'individus adultes sur le site intermédiaire (01) et le site contaminé (02) selon le test de Mann-Whitney.

	Chi-squared	df	Z	p-value
Kruskal-Wallis	6.3	2	-	0.04 < 0,05
Mann et Whitney (site00/ site02)	-	-	1.527	0.12 > 0,05
Mann et Whitney (site00/ site01)	-	-	1.963	0.04 < 0,05
Mann et Whitney (site01 / site02)	-	-	-0.654	0.51 > 0,05

Illustration 26 - Résultat de l'analyse statistique comparant le nombre de pontes repérées sur le site « non contaminé » (00), intermédiaire (01) et « contaminé » (02)

Le test de Kruskal-Wallis effectué pour la comparaison des moyennes du nombre de pontes entre les 3 sites montre que la différence observée est significative. En complément, trois tests de Mann-Whitney sont effectués pour comparer les sites deux à deux. Le nombre de pontes pour le site de référence (00) est significativement différent du nombre de pontes du site intermédiaire (01). Aucune autre différence significative n'est relevée pour cette donnée.

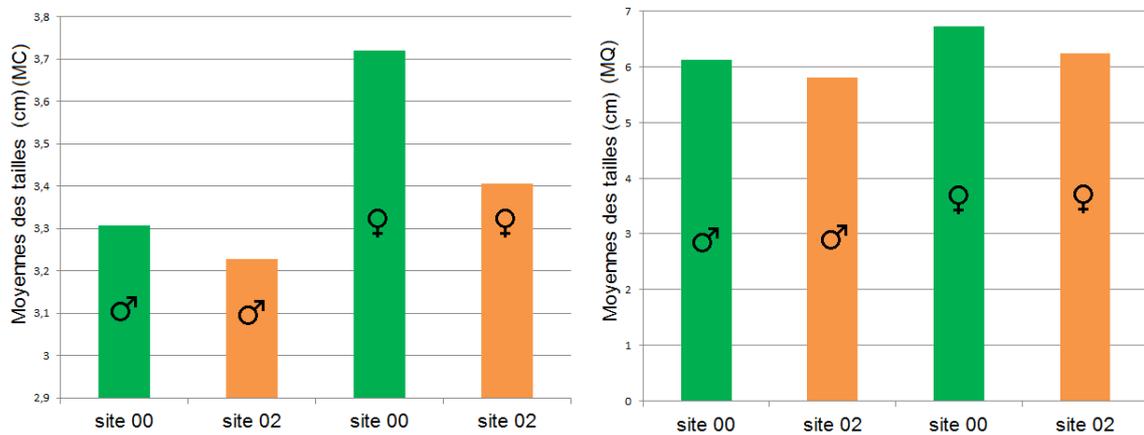


Illustration 27 - Moyenne des tailles des femelles et des mâles de tritons palmés en centimètre, mesure prise du museau au cloaque (MC) et du museau à la queue (MQ) sur le site « non contaminé » (00) et « contaminé » (02)

L'illustration 27 présente les moyennes des tailles relevées chez les tritons palmés mâles et femelles présents sur les sites 00 et 02. La moyenne des tailles des tritons palmés relevées sur le site 00 est supérieure à celle relevée sur le site 02 quel que soit le sexe des animaux et le type de mesure (MC, MQ).

	Z	p-value
Mann et Whitney (mâles M-Q) (00/02)	2.730	0.0063 < 0,05
Mann et Whitney (mâles M-C) (00/02)	2.022	0.04194 < 0,05
Mann et Whitney (femelles M-Q) (00/02)	3.319	0.000904 < 0,05
Mann et Whitney (femelles M-C) (00/02)	3.568	0.0003269 < 0,05

Illustration 28 - Résultat de l'analyse statistique comparant la moyenne des tailles des tritons palmés en centimètres, mesure prise du museau au cloaque (MC) et du museau à la queue (MQ) sur le site non contaminé (00) et contaminé (02)

Les comparaisons des tailles des individus prennent en compte le sexe des animaux et le type de mesure prise (museau cloaque, museau queue). Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer la taille des individus entre le site 00 et le site 02. Aucune prise de taille n'a été effectuée sur le site intermédiaire. Selon le test de Mann-Whitney la moyenne des tailles des individus du site 00 est significativement différente de la moyenne des tailles des individus du site 02. Les valeurs de l'analyse statistique de la comparaison des tailles sont présentées dans le tableau 08.

Les sites 00 et 02 présentent un habitat très favorable aux espèces d'amphibiens. En effet, sites de reproduction et sites d'hivernage sont très proches, ce qui réduit les migrations de reproduction. Les différences de taille chez les adultes ne semblent donc pas être en relation avec la structure paysagère mais plutôt avec la qualité des habitats. De ce fait, la qualité des eaux du site 02 pourrait constituer une variable explicative de cette différence de taille.

Le faible échantillon obtenu sur le site 01 ne permet pas d'émettre la moindre hypothèse. Néanmoins les conditions météorologiques très particulières cette année ont dû impacter les populations et leur dynamique de reproduction.

3.5. DISCUSSION SUR LES 1ERS ESSAIS REALISES SUR LES AMPHIBIENS

L'évaluation écotoxicologique de la contamination des eaux de surfaces associées à la nappe alluviale de l'Ariège a pour objectif de caractériser l'impact des pesticides dont le métolachlore, un herbicide détecté à des concentrations parfois importantes dans les eaux souterraines de la plaine ariègeoise sur les amphibiens.

Une évaluation *in situ* de l'impact de la contamination a été mise en œuvre à travers l'observation des populations d'amphibiens présentes sur trois sites de la plaine ariègeoise. Une évaluation écotoxicologique des eaux dans ces 3 sites contenant un mélange de substances a été réalisée chez les larves de Xénope en conditions contrôlées. De plus, des expositions dans les solutions contenant du S-métolachlore (0 – 0,01 – 0,1 – 1 – 10 mg/L) ont été réalisées.

La toxicité du S-métolachlore chez les organismes aquatiques est encore très peu documentée actuellement. L'essai MN (micronoyau) évaluant les effets du S-métolachlore chez le Xénope a été effectué à des concentrations proches de celles rencontrées dans l'environnement et sur la base des concentrations de pesticides détectées en France (CGDD, 2011). Nous avons également choisi d'étudier les effets d'une concentration très élevée de S-métolachlore de 10 mg/L proche de celle reportée dans la littérature comme affectant la croissance et la survie chez *Xenopus laevis* pour la forme racémique du métolachlore (Osano, 2009) pour mettre en évidence une toxicité chez les larves de l'amphibien Xénope.

Les résultats montrent une absence de mortalité et de génotoxicité chez les larves exposées au S-métolachlore quelles que soient les concentrations et une inhibition de croissance significative dès 0,1 mg/L de S-métolachlore. Cette concentration est supérieure à celle relevée en milieu naturel (quelques ng à µg/L) pour une grande partie des points d'eau évalués. Elle dépasse également le seuil de concentration préconisé comme seuil de bon état (une concentration moyenne annuelle en pesticides totaux inférieure à 0,5 µg/L et une concentration moyenne annuelle par substance pesticide inférieure à 0,1 µg/L).

Les résultats obtenus ici sur la toxicité du S-métolachlore chez l'amphibien *Xenopus laevis* indiquent que l'énantiomère S du métolachlore a une toxicité très faible. En revanche, une toxicité plus importante de la forme racémique du métolachlore a été établie par d'autres

auteurs. En effet, le métolachlore est toxique sous sa forme racémique chez les espèces animales aquatiques telles que les amphibiens à des concentrations allant de 4,34 µg/L (dommages à l'ADN après 24h d'exposition statique à la molécule formulée chez la grenouille, Clements *et al.*, 1997) à 20 mg/L (inhibition de croissance après 96 h d'exposition semi statique au métolachlore technique chez le crapaud, Gucciardo, 1999). La toxicité du métolachlore a été relevée chez les poissons à partir d'une concentration de 3,3 µg/L (Svobodova et Vykusova, 1988). De nombreux pesticides sont des molécules chirales, dont le mode d'action et les effets (toxicité, effets mutagènes, etc.) dépendent de leur énantiométrie. Par exemple, l'un des énantiomère de l'herbicide dichlorprop est actif, alors que l'autre énantiomère est inactif (Leffingwell, 2003). Ainsi il existe un énantiomère actif qui assure l'activité de l'herbicide sur les espèces végétales cibles alors que l'autre est potentiellement toxique chez les espèces non ciblées et a un rendement moindre sur la régulation des pestes végétales.

Les eaux prélevées dans le milieu naturel ne présentent pas de génotoxicité, ni d'effet sur la mortalité chez les larves de Xénope. En revanche, on observe une réduction de la taille des larves suivant le gradient de contamination supposé à partir des critères de choix de sites, qui sont basés sur des relevés d'analyses antérieurement aux prélèvements des eaux (suivi du projet Transpolar sur 2009-2010). A ce stade, il avait donc été supposé que le gradient de concentration soit toujours le même entre ces 3 points d'eau. Pour le confirmer ou l'infirmer, un examen détaillé des résultats des analyses des eaux lors du prélèvement sera réalisé (environ 50 molécules organiques recherchées).

Cette taille réduite peut être mise probablement en relation avec la contamination des milieux dans lesquels les individus évoluent depuis leur naissance selon le principe de l'allocation énergétique (Newman et Clements, 2008). La littérature relative aux amphibiens fait état de leur capacité à accélérer la métamorphose en présence d'un stress en raison du principe de l'allocation énergétique (« principe of energy allocation », Newman et Clements, 2008). Lorsqu'un organisme est forcé d'utiliser les ressources du développement pour éviter un stress, il tend à être de plus petite taille (Steyermark, 2002).

L'évaluation *in situ* de l'état des populations d'amphibiens de 3 sites de la zone d'étude montre que le site non contaminé présente la plus grande diversité spécifique. Par ailleurs, pour les tritons palmés, la croissance est plus élevée sur ce site que sur le site le plus contaminé d'où une taille à l'âge adulte supérieure.

Les conditions météorologiques non favorables aux espèces d'amphibiens ont fortement affecté l'échantillonnage. Il serait souhaitable, l'an prochain, d'augmenter le nombre de sites et de réaliser des suivis de cohortes sur le terrain et en laboratoire.

4. Etude des macro-organismes souterrains

La rédaction de ce chapitre est sous la responsabilité du laboratoire du LEHNA et du laboratoire d'écologie expérimentale de Moulis.

A l'instar de l'approche mise en œuvre pour les amphibiens, le S-métolachlore a été considéré comme la 1^{ère} molécule à étudier en laboratoire du fait de son occurrence dans les eaux souterraines de la plaine alluviale. Pour les expérimentations in situ, la qualité des eaux souterraines peut être impactée par une ou plusieurs substances.

4.1. TESTS DE LABORATOIRE DE TOXICITE AIGUE

Afin d'évaluer les effets du S-métolachlore et de ses métabolites métolachlore-ESA et métolachlore-OXA sur les macro-organismes souterrains, des expérimentations en laboratoire (bioessais) ont été réalisées pour déterminer leur toxicité aiguë (période d'exposition maximale de 7j). Ces bioessais consistent à exposer des individus à des concentrations croissantes de la molécule étudiée et calculer, pour une période d'exposition donnée, la concentration causant la mortalité de 50% des individus exposés (concentration létale 50 %: CL50). Les expérimentations réalisées dans le cadre du programme ELISE ont eu lieu à la Station d'Ecologie Expérimentale du CNRS à Moulis et dans les laboratoires du LEHNA-Université Claude Bernard Lyon 1.

Dans cette étude, cinq espèces de crustacés sont concernées dont trois espèces de surface (les amphipodes *Gammarus pulex* et *Gammarus fossarum* et l'isopode *Asellus aquaticus*) et deux espèces souterraines (les amphipodes *Niphargus rhenorhodanensis* et *Niphargus ciliatus*). Le choix des espèces de surface est basé sur (1) leur utilisation régulière dans les tests écotoxicologiques et les études sur la qualité des eaux de surface et (2) selon un gradient d'exigence écologique. Les deux espèces souterraines ont été choisies pour leurs caractéristiques d'organismes stygobies (faible sensibilité à l'anoxie, métabolisme réduit). Les origines des organismes utilisés étaient différentes : *G. pulex*, *A. aquaticus* et *N. rhenorhodanensis* ont été récoltés dans le Rhône (69) alors que *G. fossarum* et *N. ciliatus* ont été échantillonnés en Ariège (09).

A notre connaissance, il n'existe pas de données de toxicité du S-métolachlore et de ses métabolites sur des espèces voisines de celles étudiées dans le cadre de ce programme. La toxicité à 11°C a donc été explorée pour une gamme de concentrations allant de 0 à 50 mg/L pour déterminer la CL50 du S-métolachlore et de 0 à 30 mg/L pour les métabolites métolachlore-ESA et métolachlore-OXA. De façon à évaluer les concentrations réelles d'exposition en S-métolachlore, la solution mère et chacun des échantillons ont été analysés au début et à la fin de chaque expérimentation. L'analyse a été faite au BRGM par UPLC/MSMS après extraction on-line sur cartouche C18 ou injection directe selon les concentrations attendues. Afin d'évaluer l'effet de la température sur la toxicité aiguë du S-métolachlore, des bioessais ont été réalisés aussi à 15°C mais uniquement pour *G. pulex* et *N. rhenorhodanensis*. Ces bioessais ont été réalisés durant une semaine et les mortalités ont été suivies quotidiennement.

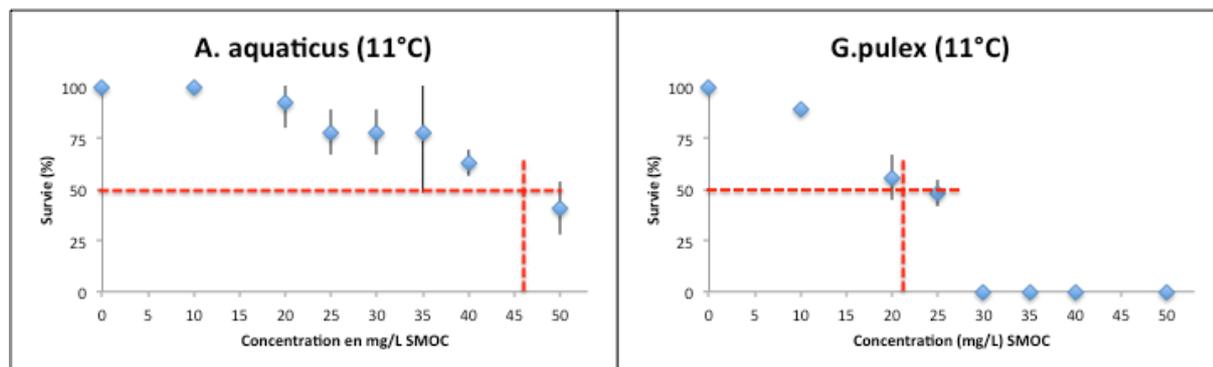


Illustration 29 - Survie (%) des individus de *Gammarus pulex* et d'*Asellus aquaticus* en fonction de la concentration en S- métolachlore (SMOC), après exposition pendant 96 heures. L'intersection des deux lignes rouge donne la CL50-96H correspondant à la mortalité de 50% des individus exposés.

L'illustration 29 présente deux exemples de calcul de la CL50 du S-métolachlore à 96h d'exposition. Cette figure montre une CL50-96h du S-métolachlore chez *G. pulex* (21.6 mg/L) très inférieure à celle de *A. aquaticus* (46.1 mg/L), indiquant que *G. pulex* est deux fois plus sensible au S-métolachlore que *A. aquaticus*.

L'illustration 30 résume la valeur de CL50-96h du S-métolachlore calculées à 11°C pour les cinq espèces étudiées. Pour les espèces souterraines, la survie est restée supérieure à 50% à la concentration la plus élevée en S-métolachlore, la valeur de CL50-96h ne peut pas être calculée mais seulement estimée ; les CL50 devront faire l'objet de tests supplémentaires pour être calculées. Parmi les espèces de surface *G. fossarum* est plus sensible que *G. pulex* qui est à son tour plus sensible que *A. aquaticus*. En revanche, les espèces de surface sont plus sensibles au S-métolachlore que les espèces souterraines. Concernant les métabolites métolachlore-ESA et métolachlore-OXA, aucune mortalité n'a été observée au cours de l'expérimentation pour des concentrations allant de 0 à 30 mg/L.

Espèce	<i>Gammarus fossarum</i>	<i>Gammarus pulex</i>	<i>Asellus aquaticus</i>	<i>Niphargus rhenorhanensis</i>	<i>Niphargus ciliatus</i>
CL50 à 96H (mg/L SMOC)	12.8	21.6	46.1	90.6*	>50**

Illustration 30 - CL50-96h du S-métolachlore pour les cinq espèces étudiées à 11°C. *: valeur estimée. **: valeur non déterminée du fait de la survie des 100% des individus après 96 heures d'exposition.

La CL50 du S-métolachlore baisse régulièrement de 24h à 7 jours (Illustration 31), mais la sensibilité relative de chaque espèce après 24h, 48h, 72h est la même que celle obtenue à 96h.

L'illustration 32 présente l'évolution de la CL50 en fonction de la température (11 vs. 15°C) chez *G. pulex* et *N. rhenorhodanensis*. Cette figure montre que les valeurs de CL50 sont inférieures à 15°C qu'à 11°C aussi bien pour *G. pulex* que pour *N. rhenorhodanensis*, et ce quelle que soit la durée d'exposition. Il en résulte que la toxicité du S-métolachlore augmente avec la température.

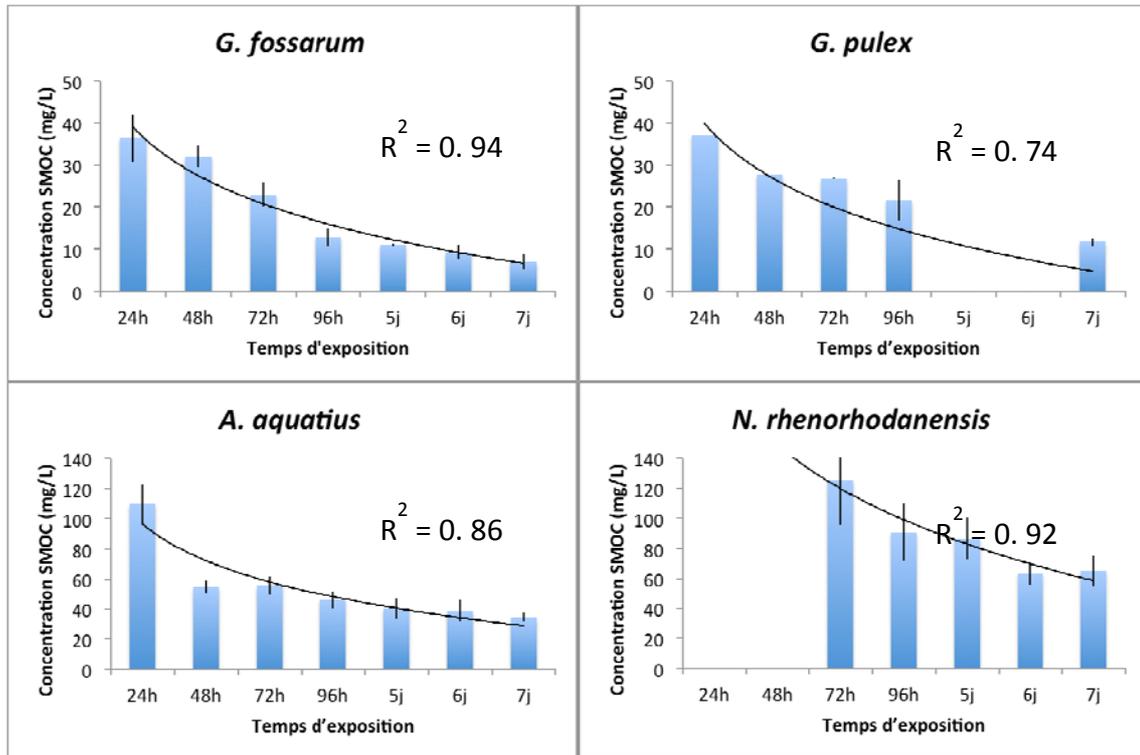


Illustration 31 - Evolution de la CL50 au cours du temps à 11°C chez *Gammarus pulex*, *Gammarus fossarum*, *Asellus aquaticus* et *Niphargus rhenorhodanensis*.#

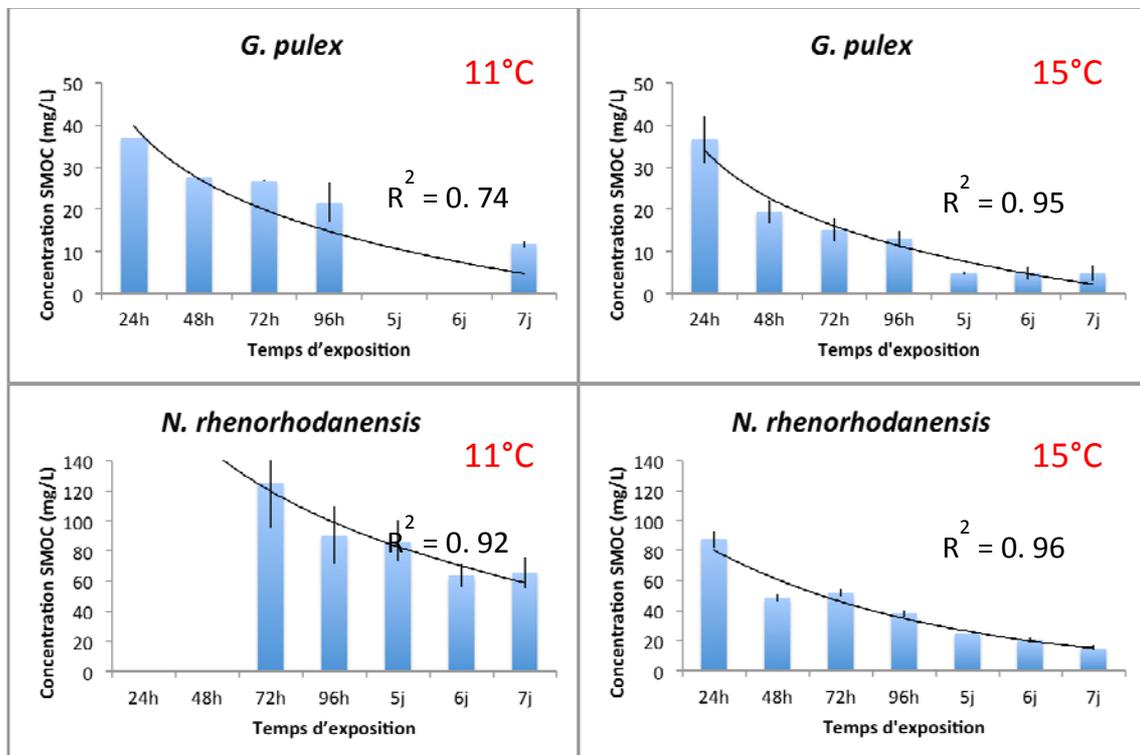


Illustration 32 - Evolution de la CL50 au cours du temps à 11°C et 15°C chez *Gammarus pulex* et *Niphargus rhenorhodanensis*.

4.2. EXPOSITION IN SITU DE SENTINELLES

Afin d'évaluer la qualité des eaux souterraines de la nappe de l'Ariège, les invertébrés ont été utilisés comme organismes sentinelles. A défaut d'espèces souterraines, l'étude de la qualité de la nappe par exposition de sentinelles a été réalisée en septembre 2012 en utilisant une espèce de surface que l'on retrouve aussi à l'interface eau de surface - eau souterraine : *G. fossarum*.

Les individus ont été encagés dans des tubes métalliques (Illustration 33) avec un vide de maille de 0,2mm de diamètre, et incubés dans des puits pendant une semaine. Les puits ont été choisis selon un gradient d'activité agricole et la qualité de l'eau a été suivie en parallèle par le BRGM. Au bout d'une semaine d'incubation, les cages ont été récupérées et le taux de survie des sentinelles calculé.



Illustration 33 - Système d'encagement des sentinelles exposées in situ

Les résultats obtenus montrent que les puits peu ou pas impactés par une activité agricole (puits de référence) présentent un taux de survie des sentinelles supérieur à 95%. Par contre, les puits impactés par l'activité agricole montrent un taux de survie moindre, d'environ 90%. Ayant réalisé l'étude en période d'étiage, le niveau d'eau dans certains puits s'est avéré trop bas et a généré des hypoxies sévères, provoquant la mortalité de tous les individus. Ces cas particuliers devront être traités à part dans l'analyse détaillée des résultats qui sera effectuée ultérieurement.

4.3. DISTRIBUTION SPATIALE DES ESPECES SUR LA PLAINE

La distribution spatiale des invertébrés souterrains a été étudiée sur une grande surface de plaine et un nombre important de stations. De façon à sélectionner les points d'eau souterraine destinés à être échantillonnés, les données géochimiques obtenues sur 144 points lors d'une campagne de mesures réalisée en avril 2008 ont été exploitées. Le diagramme de Piper (Illustration 34) présente de manière synthétique ces informations. Un code couleur a été attribué pour distinguer les différentes terrasses. 36 sites ont été sélectionnés sur la base de leur répartition spatiale et de façon à couvrir la diversité des situations géochimiques observées précédemment. Parmi ces 36 sites qui ont fait l'objet de prélèvements (Illustration 35), 29 correspondent à des puits et 7 à des sources.

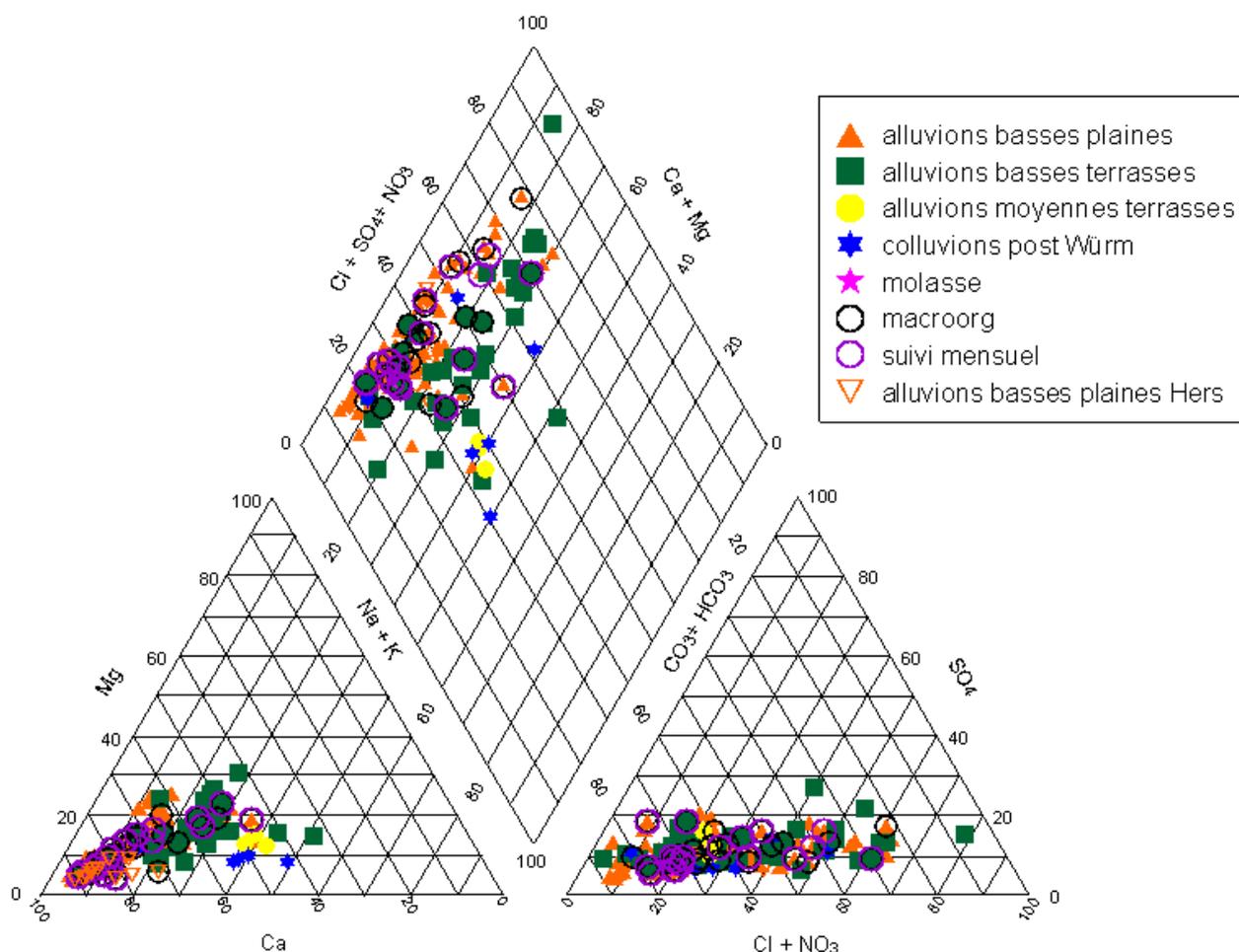


Illustration 34 - Diagramme de Piper correspondant aux points analysés en avril 2008 (les points échantillonnés en janvier pour 2012 pour l'analyse de la diversité des macro-organismes ont été cerclés en noir)

Les échantillons de faune ont été collectés dans les puits par pompage manuel, suivant la technique Bou-Rouch (1967). Un volume de 40 litres d'eau est prélevé par pompage au fond du puits, puis filtré à travers un tamis de vide de maille de 200µm. Pour les puits assez profonds, pour lesquels le pompage manuel s'avère impossible, l'échantillonnage a été réalisé à l'aide d'un filet phréatobiologique de type Cvetkov. Le prélèvement de la faune dans les sources a été effectué en utilisant un filet de type Surber (vide de maille de 100µm). Les prélèvements ont été fixés à l'éthanol 96% pour leur traitement ultérieur dans les locaux du LEHNA-Université Claude Bernard Lyon1. Pour chaque prélèvement, tous les individus ont été triés et identifiés.

Sur la totalité des sites échantillonnés, une forte abondance a été constatée avec 12 155 individus récoltés. La faune récoltée présente une biodiversité relativement importante avec 19 taxons dont 9 taxons correspondant à des espèces souterraines strictes : au moins 4 espèces du genre *Niphargus*, 2 espèces du genre *Salentinella* et 2 espèces d'ostracodes souterrains qui ne sont pas décrites à nos jours.

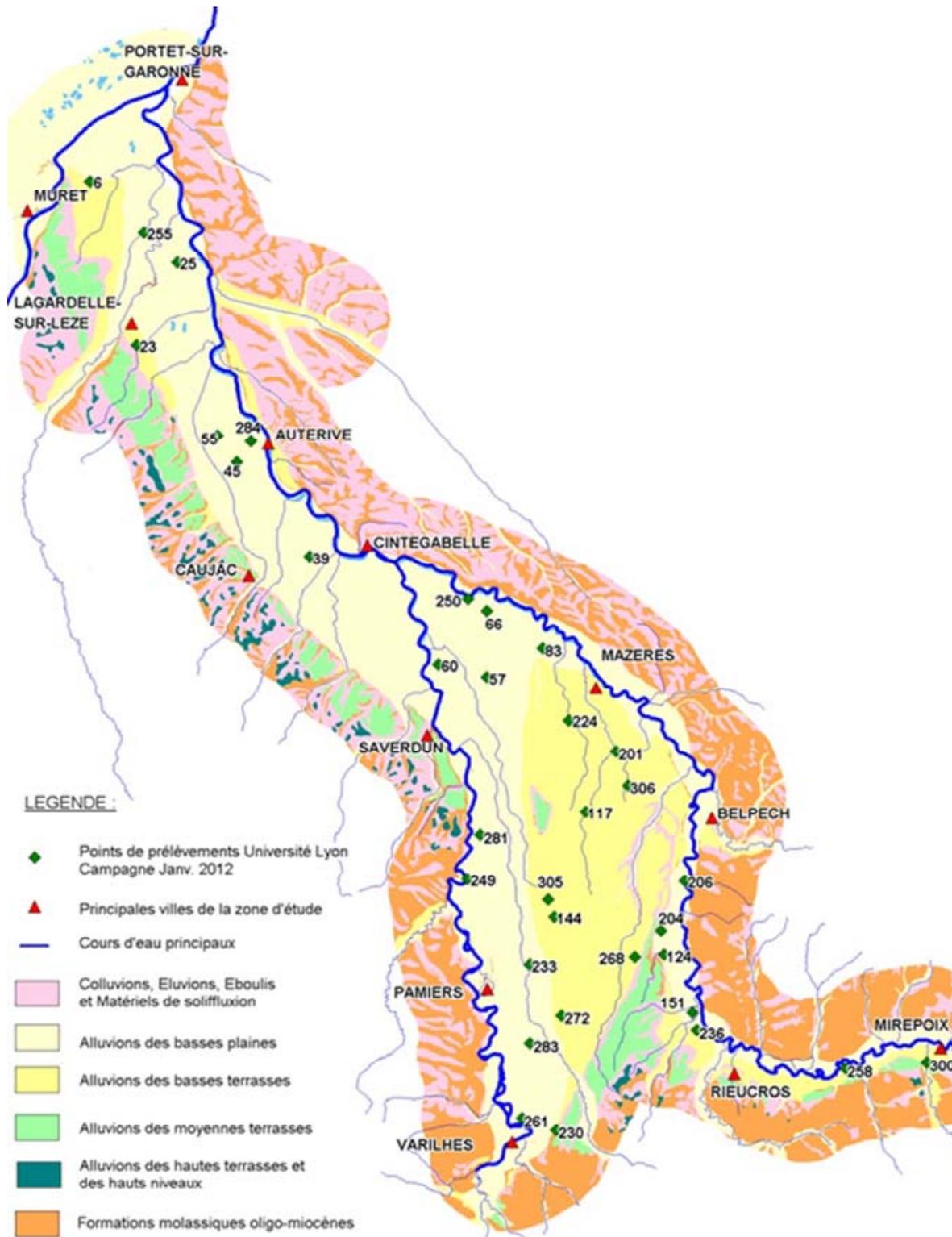


Illustration 35 - Localisation des points d'eau souterraine échantillonnés en janvier 2012 pour inventaire des espèces souterraines

4.4. PREMIERES CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'utilisation d'organismes sentinelles s'avère un outil prometteur pour évaluer la qualité des eaux souterraines. Une deuxième campagne d'incubation de sentinelles *in situ* est programmée en 2013 en période de hautes eaux. Les tests de toxicité aiguë montrent que les espèces souterraines sont plus résistantes que les espèces de surface, ce qui pourrait être dû à leur faible métabolisme. Des tests de toxicité chronique en laboratoire sont en cours afin d'évaluer l'impact du S-métolachlore à long terme et pour des concentrations plus proches de celles observées *in situ*. Dans ces tests, les individus sont exposés pendant 1 mois à des concentrations proches du milieu naturel. Des paramètres physiologiques seront suivis au cours de l'exposition. Des expérimentations complémentaires sont également envisagées pour évaluer l'effet synergétique ou antagoniste du S-métolachlore avec d'autres composés (e.g. nitrates).

4.5. VALIDATION MOLECULAIRE DES TAXONS DE LA FAUNE SOUTERRAINE

La taxonomie (i.e. l'identification des différentes espèces composant un peuplement) des organismes souterrains est une science complexe et encore en développement. Traditionnellement, la taxonomie se fait selon des critères morphologiques et/ou anatomiques. Etant donné la petite taille de ces organismes, cela représente un travail méticuleux nécessitant bien souvent l'utilisation d'une binoculaire ou d'un microscope. En effet, chez ces organismes, l'identification est souvent réalisée selon des critères « secondaires », rarement visible à l'œil nu. Depuis quelques années, une approche alternative (mais complémentaire) d'identification a vu le jour. Cette approche est basée sur le séquençage de la molécule d'ADN, le principe étant que chaque espèce possède une séquence d'ADN unique (i.e. succession de nucléotides) et qu'il est ainsi possible de les identifier en comparant cette séquence. Par analogie, cette méthode a été comparée aux systèmes de codes-barres et ainsi elle a été nommée la méthode du « code barre à ADN ».

Cette méthode peut être utilisée pour tous types d'organismes, mais s'est révélée particulièrement intéressante pour les espèces de petite taille telles que les macro-organismes souterrains. Ainsi, chez des groupes tels que les *Niphargus*, cette méthode a permis de démontrer que la diversité taxonomique (i.e. le nombre de taxons présents dans peuplement) était très souvent sous-estimé. Cela est dû à la présence « d'espèces cryptiques », c'est-à-dire à des espèces qui sont indissociables d'un point de vue anatomique ou morphologique, mais qui présentent toutefois des séquences ADN dissociables. Cela ne veut pas dire que ces espèces sont semblables en tous points de vue morphologiques et anatomiques, mais que des critères fiables de discrimination n'ont pas été trouvés ou ne sont pas « observables » (par exemple deux espèces peuvent être identiques d'un point de vue morphologique mais se reproduire à deux périodes différentes, ce qui ne peut pas s'observer dans un échantillon). Ainsi, très souvent, les barres codes à ADN ont pu révéler l'existence de 2 (voire 3 ou 4) espèces alors que la taxonomie traditionnelle n'en révélait qu'une.

Dans ce contexte, un objectif du projet est de confirmer les listes taxonomiques mis en place à l'aide de la taxonomie traditionnelle en utilisant les outils de codes barres génétiques. Cela dans l'idée (i) d'affiner nos connaissances quant à la taxonomie des macro-organismes souterrains dans cette région, (ii) d'établir des listes spécifiques « corrigées » dans l'ensemble des sites de la région étudiée et (iii) d'améliorer les liens entre contaminants et bio-indication à l'échelle des communautés.

La méthode du code barre à ADN peut être définie selon trois étapes principales : (1) l'extraction d'ADN, (2) l'amplification de l'ADN à l'aide d'un amorce spécifique à une région et (3) l'étude des dissimilarités génétiques et des identifications. Chacune de ces étapes est détaillée dans les paragraphes suivants et des améliorations méthodologiques potentielles sont discutées.

Le travail moléculaire se concentre sur un groupe particulier de macro-organismes : les espèces du genre *Niphargus*. Ce genre inclut les espèces qu'il est prévu d'encager *in situ* et qui serviront de bio-indicateurs potentiels. A ce jour, le travail a porté sur un sous-échantillonnage de 148 individus récoltés lors de la campagne de terrain de janvier 2012. Ces individus ont été prélevés dans 7 puits et ont tous été identifiés à l'espèce (selon les critères morphologiques et anatomiques) par les membres du laboratoire LEHNA. Ainsi il est possible de comparer et confronter les résultats moléculaires aux résultats morphologiques. Selon ces critères, 3 espèces ont été identifiées (*N. ciliatus*, *N. kochianus* et *N. gineti forelli*). En outre, 31 individus n'ont pas pu être identifiés et 2 individus ont été identifiés comme des hybrides entre *N. kochianus* et *N. pachypus*.

4.5.1. Extraction d'ADN.

L'extraction d'ADN est une étape clef de la méthode du code barre à ADN. En effet, de cette étape va dépendre le succès des autres étapes (notamment l'amplification). Si l'ADN n'est pas en quantité suffisante ou s'il est de mauvaise qualité (par exemple présence de produits inhibiteurs comme certains pigments), l'amplification sera difficilement réalisable et/ou de mauvaise qualité. Le choix de la méthode d'extraction est donc primordial et dans la mesure du possible il convient de ne pas extraire l'ensemble de l'organisme au cas où la première extraction serait défectueuse (laissant ainsi la possibilité d'un back-up). Il y a donc un compromis entre la quantité d'organismes à extraire, la méthode à utiliser et la possibilité d'avoir du back-up. Dans ce projet, le choix a été fait d'utiliser la méthode d'extraction dite « au sel » qui offre plusieurs avantages. Elle permet d'avoir en général des extractions de bonne qualité (peu d'inhibiteur et bonne quantité d'ADN), elle ne nécessite pas l'utilisation de produits nocifs (comme la méthode au chloroforme par exemple) et permet un stockage de l'ADN à long terme (20 ans au congélateur). Le protocole initial a été modifié (augmentation du temps de digestion avec la protéinase K et dilution finale dans $15 \mu\text{l}^{-1}$) afin de maximiser les concentrations d'ADN. En ce qui concerne la quantité de tissus utilisé, la taille corporelle de ces individus variait entre 2 et 18 mm et de ce fait, 3 options ont été retenues pour l'extraction d'ADN. Pour les gros individus (>7 mm) l'extraction a été réalisée sur un membre (une patte en général). Pour les individus médians (entre 4 et 7 mm), l'extraction a été réalisée sur la moitié du corps, alors que pour les plus petits individus l'extraction a été réalisée sur l'ensemble de l'organisme.

La quantité et la qualité de l'ADN extrait ont été mesurées pour les 148 individus extraits. La concentration moyenne d'ADN était de $40.43 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ce qui est tout à fait bon compte tenu de la quantité de tissus à disposition. A noter toutefois que 13 extractions présentaient des concentrations inférieures à $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Par contre, la qualité de l'ADN extrait (mesurée selon le ratio A260/A280) était moyenne, avec un ratio moyen de 1.58 (une extraction est considérée comme bonne pour un ratio de 1.8). Au total, 64 extractions présentaient un ratio inférieur à 1.8. Lorsque cela était possible, les individus présentant des faibles concentrations et/ou ratio ont été ré-extraits.

4.5.2. Amplification de l'ADN.

De façon générale, l'identification des espèces selon la méthode du code barre à ADN est réalisée à l'aide de fragment de l'ADN mitochondriale. Cet ADN est particulier car il n'est transmis que par la mère et le taux d'évolution est suffisamment lent pour permettre une discrimination importante des individus entre les espèces et une discrimination faible des individus au sein des espèces. Dans la plupart des cas, c'est un fragment (d'environ 600 paires de bases) du gène Cytochrome Oxydase I (COI) qui est choisi. C'est le choix qui, dans un premier temps, a été fait en utilisant une amorce universelle (i.e. qui est censée amplifier l'ADN de tout type d'organisme animal). L'illustration 36 présente les informations sur les amorces utilisées ainsi que les recettes et cycles employés dans ce projet.

Produit	Vol Per (µl)
H2O	15.65
Buffer (10x)	2
dNTPs (10mM)	0.4
HCO (10µM)	0.4
LCO (10µM)	0.4
Taq	0.15
AND (~50ng)	1

Programme PCR	
95°C	15 min
95°C	45 s (35 cycles)
53°C	30 s 45 s (35 cycles)
72°C	80 s 45 s (35 cycles)
72°C	3 min
4°C	Infini

Séquences des amorces	
5'	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
5'	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

Illustration 36 - Recette et cycle utilisés afin d'amplifier le gène COI.

103 des 148 échantillons ont été amplifiés à l'aide de ce marqueur avec un taux de succès extrêmement faible puisque seulement 13 individus ont été amplifiés avec succès. Ceci malgré le fait que les protocoles initiaux aient été modifiés (températures des cycles notamment) afin d'améliorer le rendement. Bien que cette amorce soit censée être universelle, ces résultats ne sont pas complètement incohérents au vu de la littérature sur *Niphargus*. En effet, plusieurs auteurs mentionnent la difficulté à amplifier l'ADN de ce groupe. L'arbre relatif à ce gène ne sera pas présenté dans ce rapport car globalement les résultats étaient peu informatifs.

Etant donné ce succès très faible, le choix a été fait d'utiliser un autre gène, le 28S qui semble (selon la littérature) plus usité dans le cas des *Niphargus*. En effet, par exemple, la plupart des séquences disponibles pour le groupe *Niphargus* sur la base de données en ligne GeneBank sont des fragments du gène 28S. Les amorces utilisées amplifient un fragment de 850 pb. Les amorces et recettes utilisées sont synthétisées dans l'illustration 37.

Produit	Vol (µl)
H2O	15.65
Buffer (10x)	2
dNTPs (10mM)	0.4
HCO (10µM)	0.4
LCO (10µM)	0.4
Taq	0.15
AND (~50ng)	1

Programme PCR	
94°C	15 min
94°C	45 s (30 cycles)
53°C	60 S (30 cycles)
72°C	60 s (30 cycles)
72°C	10 min
4°C	Infini

Séquences des amorces	
5'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTT-3'	
5'-AGGGAAACTTCGGAGGGAACC-3'	

Illustration 37 - Recette et cycle utilisés afin d'amplifier le gène 28S.

Dans ce cas, les 148 individus extraits ont été amplifiés et le taux de succès semble plus important puisqu'une bande était visible sur gel d'agarose pour 64 individus. Toutefois, ces travaux étant encore en cours, seuls quelques-uns de ces individus ont, à ce jour, été séquencés (voir section suivante). Tout comme pour le COI, la mise au point du protocole a nécessité de longues étapes qui sont rendues « délicates » étant donné la faible quantité de tissus et d'ADN à disposition.

4.5.3. Etude des dissimilarités génétiques et des identifications

Dans cette section, est présenté l'arbre obtenu à l'aide des individus pour lesquels les séquences sont actuellement disponibles pour le gène 28S. L'arbre a été développé à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance à l'aide du logiciel Mega version 5.10. Sont également inclus des spécimens identifiés morphologiquement et dont les séquences étaient disponibles sur GeneBank.

Dans cet arbre, ont pu être inclus 9 individus identifiés morphologiquement comme *Niphargus ciliatus* et 3 individus étant identifiés comme appartenant au groupe *kochianus*. Même si le nombre d'échantillons disponibles à l'heure actuelle est faible, au moins deux messages importants ressortent de cet arbre (Illustration 38).

Tout d'abord, on peut voir que les deux morpho-espèces (indiquées entre guillemets dans l'arbre) se regroupent selon deux clades distincts. Cela indique que, a priori, les 9 individus identifiés morphologiquement comme *N. ciliatus* appartiennent bien tous à la même espèce. De même, les 3 individus identifiés morphologiquement comme *N. kochianus* appartiennent bien tous à la même espèce. De façon générale, cela indique une bonne concordance entre identification moléculaire et phénotypique. Par contre, on constate que le groupe identifié

morphologiquement comme *N. kochianus* semble très éloigné phylogénétiquement du seul individu dont la séquence est disponible sur GeneBank. Cela indiquerait que ce groupe d'individu ne correspondrait en réalité pas à l'espèce *N. kochianus* telle qu'elle est décrite dans la littérature. Cela est cohérent avec les difficultés de détermination morphologique rencontrées par l'équipe du LEHNA (M.J. Dole, comm. pers.). En effet, il semble que les individus attribués au groupe *N. kochianus* dans la nappe de l'Ariège aient des caractères morphologiques propres à cette espèce, mais aussi des caractères appartenant à d'autres espèces, notamment *N. pachypus*. Bien qu'il soit trop tôt pour l'affirmer, il semblerait donc que les individus que nous attribuons à *N. kochianus* soient en fait une autre espèce. Toutefois, aucune des séquences disponibles sur GeneBank ne nous permet de savoir exactement à quelle espèce nous avons réellement à faire.

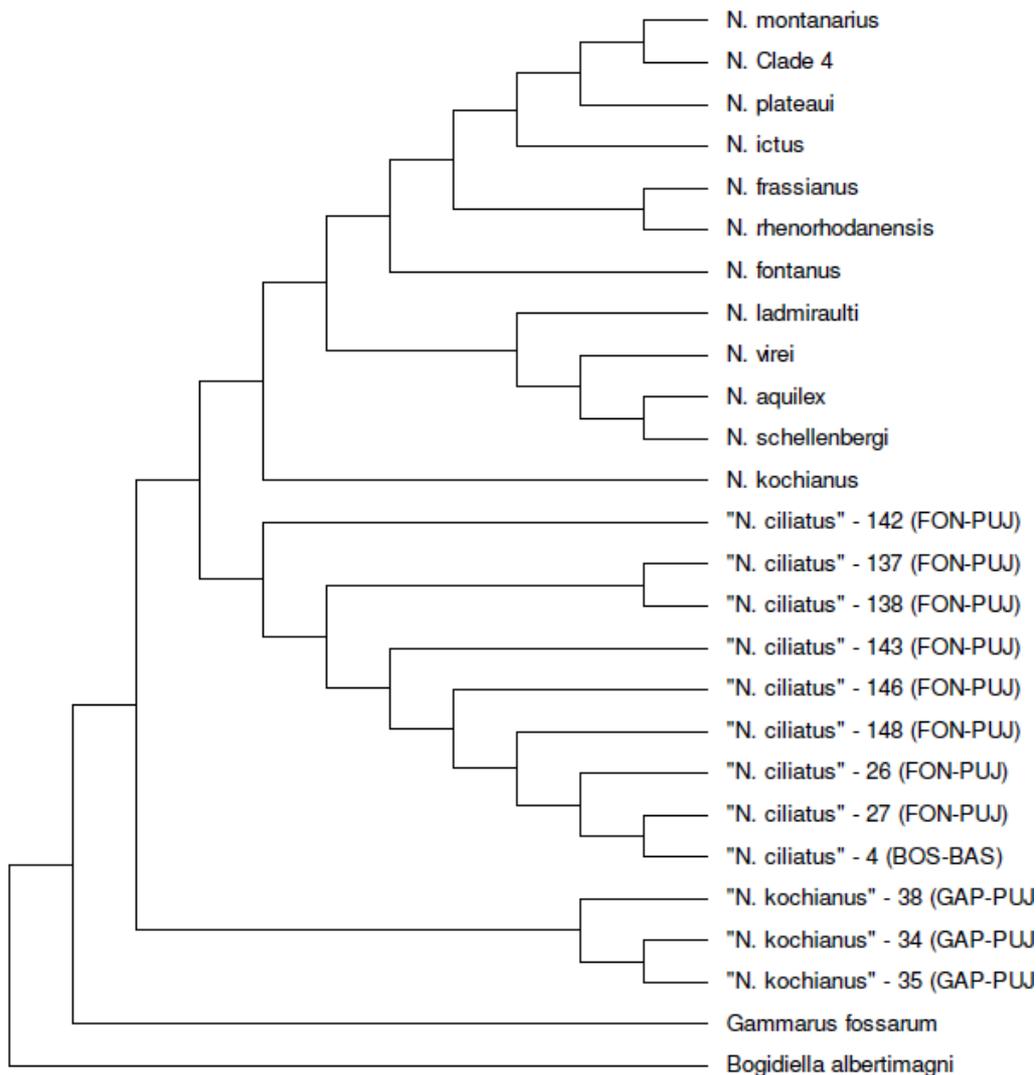


Illustration 38 - Arbre représentant les liens phylogénétiques (selon un fragment du gène 28S) entre les spécimens récoltés sur le terrain et séquencés dans ce projet (entre guillemets, le numéro indique le numéro du spécimen et les codes correspondent à ceux des stations) et ceux disponibles sur GeneBank

Pour finir, pour *N. ciliatus* une forte variance phylogénétique est observée au sein du groupe, alors que la plupart des individus appartiennent au même site d'échantillonnage. Davantage de séquences nous permettront de bien comprendre les causes de cette variabilité.

4.5.4. Conclusion et perspectives à court terme

Le groupe *Niphargus* est un groupe pour lequel il est techniquement difficile d'obtenir des données moléculaires (notamment de type séquences). Comme pour les autres auteurs, un certain nombre de difficultés ont été rencontrées et de nouveaux protocoles ont dû être mis en place. L'étape d'extraction est satisfaisante même si globalement la qualité est faible. C'est pourquoi le protocole d'extraction doit continuer à être amélioré en testant différentes alternatives. Dans un premier temps il est prévu d'essayer de broyer les individus directement dans le tampon d'extraction qui sera au préalable chauffé à 80°C. Il semblerait que l'ADN des *Niphargus* se dégrade très vite à température ambiante, et cette étape préalable pourrait améliorer la qualité. Un autre type d'extraction (au chloroforme) sera également testé. En effet, bien que plus contraignant, il se peut qu'il puisse aussi améliorer la qualité des extractions. L'étape d'amplification est elle aussi délicate. Le 28S semble mieux amplifier que le COI puisque pratiquement 50% des amplifications sont positives. Il a également été remarqué que ce score pouvait être amélioré en ré-amplifiant des PCRs qui ne semblaient pas fonctionner sur gel d'agarose. Si c'est le cas, les seuils des 75% de réussite pourraient être dépassés, ce qui serait très satisfaisant pour ce groupe. Les 48 individus qui seront séquencés prochainement devraient apporter des éléments de réponse.

Dans une prochaine étape, le but sera de développer des marqueurs microsatellites pour une des espèces (probablement *N. kochinus* qui semble la plus représentée spatialement). A priori les étapes d'amplifications seront plus aisées car il s'agit de fragments de plus petite taille. Cela permettra d'obtenir des informations à l'échelle des populations et de quantifier directement l'impact du paysage sur la diversité génétique de ce groupe. Le développement de ces marqueurs devrait débuter dans le 2eme trimestre 2013.

5. Approche microbiologique

La rédaction de ce chapitre est sous la responsabilité du Laboratoire de Strasbourg (UdS) - UMR 7156 CNRS et UMR 7517 CNRS.

L'approche microbiologique d'ELISE consiste à **développer des bio-indicateurs bactériens au niveau structurel (signature du gène de l'ARN 16S) et si possible aussi fonctionnel (gènes du métabolisme du métolachlore, indicateurs de biodégradation)**, puis à évaluer ces indicateurs sur la base d'échantillons solides (sols ou formations alluvionnaires) et aqueux (eaux de nappe ou eaux de percolation). Ces expériences permettent d'évaluer la relation entre l'empreinte moléculaire de la flore bactérienne et le degré de contamination au métolachlore, et d'évaluer l'effet du métolachlore et de ses produits de dégradation sur la dynamique structurelle et fonctionnelle de la microflore bactérienne.

5.1. ETUDE STRUCTURELLE DE FLORE BACTERIENNE PAR APPROCHE BIOMOLECULAIRE

Un **protocole de biologie moléculaire pour l'étude spécifique de la microflore bactérienne des eaux de nappe a été développé et validé**. Le protocole de biologie moléculaire inclut l'extraction d'ADN total, l'amplification PCR (Polymérase Chain Reaction du gène de l'ARN 16S) et l'analyse de l'« empreinte moléculaire » de l'échantillon par une méthode de T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism).

5.1.1. Développement du protocole d'empreinte moléculaire (PCR - T-RFLP)

L'ADN bactérien est extrait en utilisant un kit commercial (MOBIO PowerWater). Ce kit a été sélectionné pour cette étude sur la base d'expériences préliminaires du rendement (concentration) et de l'amplifiabilité par PCR (élimination d'inhibiteurs potentiels) de l'ADN obtenu à partir d'échantillons de nappe. Les extractions d'ADN ont été effectuées à partir de filtres 0.2 µm chargés de différents volumes d'eau environnementale. Les résultats montrent qu'un minimum de 50 mL d'eau doit être filtré pour obtenir de l'ADN amplifiable. Le cycle d'extraction par « bead beating » optimisé implique un traitement à 2000 rpm pendant 5 minutes. La qualité de l'ADN est évaluée par une méthode spectrophotométrique (NanoDrop ND-1000, Thermo scientific, USA), et sa quantification est effectuée par fluorométrie par la technique PicoGreen® (Invitrogen).

Les amorces 27f (marquée à la 6 - carboxyfluorescéine (6- FAM) à son extrémité 5' (Edwards et al. 1989) et 927r (Muyzer 1999) sont utilisées pour l'analyse PCR - T-RFLP. La réaction de PCR est effectuée selon une méthode préalablement décrite (Penny et al. 2010). Trois PCRs sont effectuées par échantillons et les réplicats combinés. Les fragments de gène de l'ARN 16S de 0.9 kb obtenus sont purifiés à partir d'un gel d'agarose 1 % en utilisant le kit d'extraction QIAquick (QIAGEN). Les produits PCR (200 - 300 ng) sont digérés à 37°C pendant 16 h en utilisant 20 U de l'enzyme de restriction *A**lu*I (séquence de reconnaissance AGCT), purifiés en éliminant les nucléotides et amorces en excès grâce au kit QIAquick, et re-suspendus dans 50 µl d'eau stérile ultra pure. Un volume équivalent à 20 ng d'ADN est ensuite mélangé à 10 µl d'une solution de Hi-Di formamide (Applied Biosystems, United Kingdom) contenant 1:20 (vol/vol) des MapMarker 1000 6-FAM- or carboxy-X-rhodamine (ROX)-marqués (Bioventures, United States), dénaturés à 95 °C pendant 5 min, puis déposés sur la glace.

Les fragments de restriction ainsi dénaturés sont ensuite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse capillaire en utilisant un analyseur génétique ABI Prism 3130 XL (POP 7 matrix; capillaire 50 cm; Applied Biosystems) dédié au génotypage. Les électrophérogrammes T-RFLP sont analysés grâce au logiciel T-REX (Culman et al., 2009).

5.1.2. Application du protocole d’empreinte moléculaire (PCR - T-RFLP) sur des échantillons de nappe

L’ensemble des points d’eau souterraine a fait l’objet d’un échantillonnage en vue de l’étude de la dynamique structurelle de la microflore bactérienne des eaux de nappe en mai et septembre 2012. Des échantillons ont également été prélevés sur cinq points en juillet et en décembre 2012. Tous les prélèvements ont été faits en duplicats. A ce stade, les points privilégiés pour le suivi temporel sont les points 60, 117, 151, 224 et 230 qui présentent des concentrations en pesticides et ions majeurs très diverses et variables au cours du temps. Ces points correspondent également à ceux suivis plus spécifiquement pour l’étude des amphibiens et/ou macro-organismes souterrains dans le cadre du projet ELISE.

Chaque échantillon consiste dans le prélèvement par filtration sur un filtre stérile (porosité 0.2 μm) d’environ un litre d’eau (mesuré précisément). Ce filtre est ensuite transféré dans un tube Falcon® congelé jusqu’à l’analyse (Illustration 39).



Illustration 39 - Filtration *in situ* d’eau de nappe en vue de l’étude

En complément de la mesure des paramètres *in situ*, de l’analyse des ions majeurs et des produits phytosanitaires et produits de dégradation, des paramètres complémentaires sont mesurés lors de ces campagnes. Il s’agit du carbone organique total et dissous, de la silice, du manganèse total, du fer total, des thiosulfates et des sulfites.

La concentration d’ADN bactérien obtenue à partir des échantillons prélevés aux cinq points retenus pour le suivi temporel varie entre 0.25 et 12 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, pour un total de 15-1200 ng, selon les points et les campagnes de prélèvement (Illustration 40).

Puits	Apparence du filtre	Concentration ADN (ng/ul)
<i>Campagne 1 (mai 2012)</i>		
6	blanc	0.5
23	chargé de particules noires (fer du tubage)	3.9
60	-	1.1
117	marron	0.9
224	-	0.5
230	chargé, jaune-marron-	0.9
261	-	0.3
272	beige clair	9.6
281	blanc	0.2
283	jaune pâle	0.2
300	léger dépôt	3.3
<i>Campagne 4 (décembre 2012)</i>		
60	-	2.0
117	-	1.9
151	-	11.0
224	-	NA
230	-	12.0

Illustration 40 - Résultats représentatifs pour une série d'isollements d'ADN à partir de filtres correspondant au prélèvement d'environ 1L d'eau de nappe sur différents points (campagnes de mai et de décembre 2012).

Les **tests d'amplification PCR à partir de cet ADN** avec les amorces 27f (marquée à la carboxyfluorescéine) et 927r (Illustration 41) montrent que l'ADN est d'une qualité permettant l'amplification du gène de l'ARN 16S, la poursuite de l'analyse T-RFLP selon le protocole établi, ainsi que l'étude de gènes fonctionnels.

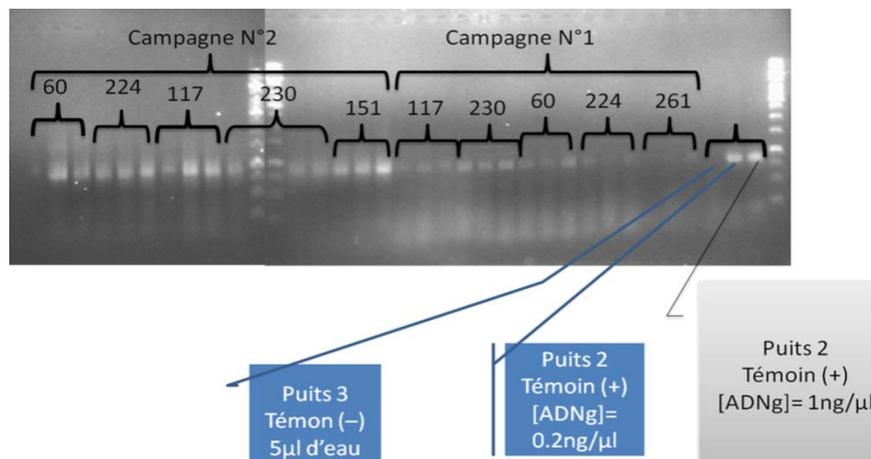


Illustration 41 - Electrophorèse en gel d'agarose 1 % montrant les fragments de gène de l'ARN ribosomique 16S obtenus par amplification PCR de l'ADN extrait d'échantillons d'eau de nappe avec les amorces 27f marquée et 927r.

A ce stade du projet, le **protocole pour l'étude spécifique de la microflore bactérienne des eaux de nappe est maintenant validé**. Ce protocole permet désormais d'évaluer l'approche PCR – T-RFLP pour tester l'effet de la qualité des eaux souterraines sur la dynamique structurelle de la microflore bactérienne. **L'analyse T-RFLP des échantillons d'eau de nappe prélevés entre mai et décembre 2012 est actuellement en cours**. Les empreintes moléculaires de la flore bactérienne obtenues seront mises en lien avec les profils hydrochimiques obtenus à chaque point de prélèvement par des méthodes d'analyse multivariée (nMDS et ANOSIM).

5.2. BIOINDICATEURS MICROBIENS DU METABOLISME DU METOLACHLORE

De façon à étudier la dynamique fonctionnelle de la microflore bactérienne des sols agricoles et des eaux de nappe vis-à-vis du métabolisme du (S-)métolachlore (i.e. voies et modalités de dégradation bactérienne) et du degré de contamination au métolachlore et ses produits de dégradation, des **méthodes analytiques complémentaires à celles développées dans l'axe 1 du projet ont été développées pour évaluer la biodégradation *in situ* du métolachlore**. Parallèlement, des cultures d'enrichissement bactériennes ont été mises en place sur la base d'échantillons solides (sols agricoles) afin de faciliter **l'étude spécifique des bactéries impliquées dans le métabolisme du métolachlore et des gènes correspondants**.

Deux parcelles correspondant à un sol de grasse et de boubène ont été échantillonnées le 26 et 27 avril 2012 avant le traitement S-métolachlore des agriculteurs (Illustration 42). Il s'agit de 2 parcelles ayant fait l'objet d'un suivi détaillé du transfert du métolachlore et ses produits de dégradation lors de la saison culturale 2009-2010 (Baran et al., 2010). Pour chacune des parcelles, au moins 15 échantillons élémentaires correspondant à l'horizon 0-10 cm ont été prélevés et mélangés dans un sac stérile.



Sol de grasse



Sol de boubène

Illustration 42 - Parcelles échantillonnées en avril 2012

1 % (vol/vol) de chaque sol a été inoculé dans un milieu d'eau synthétique sans chlorure, en conditions aérobie (20% d'oxygène), et contenant 60 mg/L de S-métolachlore. Les cultures sont incubées à 25°C et l'évolution temporelle des concentrations est suivie afin d'évaluer et de caractériser la dégradation du S-métolachlore. A ce jour, aucune diminution significative dans les cultures mises en place et les contrôles stériles n'a été observée. Cela souligne la persistance possible du S-métolachlore dans les sols de grasse et de boubène, dans les conditions expérimentales choisies en début de projet.

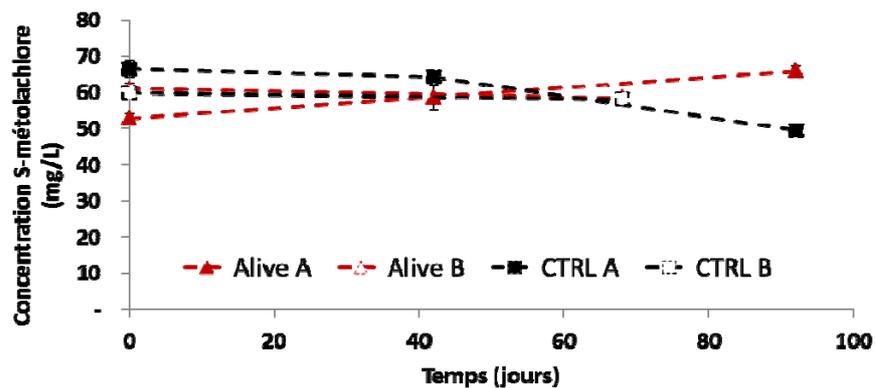


Illustration 43 - Exemple d'évolution temporelle du métolachlore dans des cultures d'enrichissement bactériennes sur la base de sols agricoles de grausse. Alive : cultures vivantes ; CTRL : contrôle stérile

De nouvelles cultures d'enrichissement ont été mises en place dans différentes conditions, afin d'observer la dégradation du métolachlore au laboratoire. L'amplification spécifique et la détection qualitative et quantitative de gènes fonctionnels d'intérêt par PCR pourra être explorée pour ces cultures également.

Le dessin d'amorces oligonucléotidiques correspondant à de brèves séquences conservées et correspondants aux familles d'enzymes potentiellement impliquées sur la base d'indications générales de la littérature (p.ex. glutathion S-transférases, cystéine β -lyases, déshalogénases, amidases) est en cours pour l'amplification spécifique et la détection qualitative et quantitative de gènes fonctionnels d'intérêt par PCR. Une analyse bioinformatique des bases de données de séquences disponibles, y compris celles de génomique et de métagénomique bactérienne, sert actuellement de base à cette mise au point. Ces tests moléculaires spécifiques au métabolisme du métolachlore pourront être utilisés aussi bien à partir des échantillons d'eau de la nappe obtenus, des échantillons de sols agricoles ou d'échantillons issus de cultures d'enrichissement bactériennes.

5.3. PREMIERES CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Concernant l'approche microbiologique, des développements méthodologiques et expérimentaux ont été effectués pour évaluer des bio-indicateurs microbiens tant au niveau structurel (signature du gène de l'ARN 16S) qu'au niveau fonctionnel (étude du métabolisme du métolachlore). Un protocole pour l'étude spécifique de la microflore bactérienne des eaux de nappe par une approche PCR – T-RFLP est maintenant développé et validé. Ce protocole peut désormais être utilisé en routine. Il sera testé afin d'évaluer l'effet de la qualité des eaux souterraines sur la dynamique structurelle de la microflore bactérienne. Les analyses bactériennes structurelles et fonctionnelles sont en cours sur la base des eaux prélevées sur différents sites présentant une qualité variable. Des investigations complémentaires sur la base des méthodes développées et en cours de développement doivent maintenant permettre d'évaluer la relation entre le degré de contamination au métolachlore et ses produits de dégradation, la dynamique structurelle de la microflore bactérienne et le métabolisme *in situ* du métolachlore.

6. Premières conclusions et perspectives du projet

A l'issue de la première année de cette étude qui se déroulera sur 3 années, plusieurs faits marquants peuvent être soulignés.

Le développement et la validation d'une méthode analytique robuste et sensible permet de suivre un large panel de substances phytosanitaires déjà étudiées dans le cadre du projet Transpolar auxquelles s'ajoutent des métabolites neutres des chloroacétanilides. En plus de ces substances, le glyphosate et son métabolite AMPA sont également ajoutés au suivi. Au final, 18 autres substances ont été ajoutées à la liste Transpolar. Pour cela, 3 méthodes analytiques sont déployées. Elles permettent à la fois d'assurer le monitoring des échantillons d'eau de surface et souterraine pour lesquels les volumes disponibles peuvent être de plusieurs litres avec des concentrations a priori faibles mais aussi pour des échantillons issus d'expérimentations d'exposition d'organismes en laboratoire. Pour ces derniers, si les concentrations testées à ce stade sont plus importantes que les concentrations naturelles, les volumes disponibles sont en revanche beaucoup plus faibles (quelques mL).

Pour les échantillons d'eau souterraine et le métolachlore, **3 métabolites (l'hydroxymétolachlore, le métolachlore morpholinone et le deschlorométolachlore) ont été quantifiés** au moins une fois sur un des 19 points suivis mensuellement depuis mars 2009. Pour les 8 campagnes réalisées à ce stade, les concentrations et les fréquences de quantification apparaissent faibles comparativement à celles de l'OXA métolachlore et surtout l'ESA métolachlore.

La poursuite du suivi mensuel auquel s'ajoute le suivi de fossés et d'un réseau de drainage agricole permettront de mieux appréhender la dynamique générale de transfert du métolachlore et son devenir et plus largement d'autres substances phytosanitaires. En effet, il convient de rappeler que d'autres molécules sont quantifiées. Il s'agit d'autres chloroacétanilides et certains métabolites, des triazines, des urées et conazoles dont la plupart avaient déjà été mises en évidence lors des précédentes études. A cela, s'ajoutent également le glyphosate et son métabolite AMPA dont la présence est avérée sur certains points. Ces 2 substances sont en revanche suivies uniquement depuis mars 2009.

Afin d'appréhender l'impact des pesticides sur différents organismes, des expérimentations d'exposition ont débuté et vont se poursuivre à la fois en conditions contrôlées de laboratoire et en conditions naturelles.

En laboratoire, **des premiers tests d'exposition** destinés à évaluer la toxicité aiguë, chronique et génétique ont été effectués pour la substance S-métolachlore sur **le modèle amphibien *Xenopus laevis***. Des tests d'exposition de Xénopes ont également été réalisés en utilisant des eaux prélevées sur différents sites présentant une qualité variable. Les premiers résultats ne montrent pas de mortalité et de toxicité génétique de la substance pure ni des eaux naturelles mais un impact sur la croissance des larves. Les observations de terrain menées parallèlement sur la distribution des populations d'amphibiens et leur croissance semblent en adéquation avec ces résultats de laboratoire. Des investigations complémentaires sont toutefois nécessaires afin d'émettre des conclusions ou de discuter plus avant ces premiers résultats.

Pour les macro-organismes souterrains, l'utilisation d'organismes sentinelles s'avère un outil prometteur pour évaluer la qualité des eaux souterraines. Une deuxième campagne d'incubation de sentinelles *in situ* est programmée en 2013 en période de hautes eaux, période pendant laquelle la qualité des eaux pourrait être très différente de celle régnant lors de la 1^{ère}

exposition (forte variabilité temporelle constatée au cours du projet TRANSPOLAR et confirmée lors des 1ers mois de suivi). Toutefois, la disponibilité d'un nombre suffisant d'individus pourrait être un point bloquant ou au moins limitant. **Les tests de toxicité aiguë réalisés en laboratoire montrent que les espèces souterraines sont plus résistantes que les espèces de surface**, ce qui pourrait être dû à leur faible métabolisme. Des tests de toxicité chronique en laboratoire sont en cours afin d'évaluer l'impact à long terme du S-métolachlore et pour des concentrations plus proches de celles observées *in situ*. Dans ces tests, les individus seront exposés pendant 1 mois à des concentrations proches du milieu naturel. Des paramètres physiologiques seront suivis au cours de l'exposition. Des expérimentations complémentaires sont également envisagées pour évaluer l'effet synergétique ou antagoniste du S-métolachlore avec d'autres composés (e.g. nitrates).

L'étude de la distribution spatiale des macro-organismes souterrains s'appuie sur une vaste campagne de collecte des individus réalisée en janvier 2012. En complément de l'identification morphologique et/ou anatomique, **la méthode du « code barre ADN » est appliquée**. Pour cela, il a été nécessaire de tester et de modifier des protocoles pour les phases d'extraction et d'amplification d'ADN. En effet, le groupe Niphargus est un groupe pour lequel il est techniquement difficile d'obtenir des données moléculaires (notamment de type séquences). Après un premier travail réalisé sur le gène COI et les difficultés rencontrées, il a été décidé de travailler avec le gène 28S. Si les 1ers essais sont prometteurs, des ajustements des protocoles restent à tester. Les premiers résultats obtenus grâce à un nombre restreint d'individus sur l'étude des dissimilarités génétiques et des identifications **montrent que les 2 morpho-espèces identifiées se regroupent selon deux clades distincts indiquant une bonne concordance entre l'identification moléculaire et phénotypique**. Toutefois, un questionnement apparaît sur l'attribution d'un groupe à l'espèce *N. kochianus*. Ces résultats préliminaires seront bien évidemment repris lorsque le séquençage aura été réalisé pour un nombre plus important d'individus. Dans une prochaine étape, le but sera de développer des marqueurs microsatellites pour une des espèces (probablement le groupe *N. kochianus* qui semble la plus représentée spatialement). Cela permettra d'obtenir des informations à l'échelle des populations et de quantifier directement l'impact du paysage sur la diversité génétique de ce groupe.

En ce qui concerne la microbiologie, deux volets sont menés parallèlement. Le premier concerne l'étude de la **dynamique structurelle de la microflore bactérienne** en lien avec l'évolution spatiale et temporelle de la qualité des eaux souterraines. Pour cela, un protocole sur l'étude spécifique de la microflore bactérienne des eaux de nappe par une approche PCR-T-RFLP a été développé et validé. Ce dernier va maintenant être décliné sur les échantillons collectés depuis mai 2012 et qui seront collectés en 2013. Le deuxième volet concerne **la recherche d'un marqueur fonctionnel** lié au métabolisme du métolachlore qui pourrait être utilisé à terme comme bio-indicateur.

A l'issue de la première année de projet, plusieurs avancées significatives peuvent être mentionnées (développement analytique, réalisation des premiers tests de toxicité en laboratoire sur différentes espèces, premières évaluations *in situ*, protocoles d'extraction et d'amplification de l'ADN pour les macro-organismes souterrains et les micro-organismes,...). Toutefois, pour l'ensemble des équipes impliquées dans le projet, **ces résultats sont à considérer comme préliminaires** et à confirmer. Des ajustements méthodologiques restent à affiner sur certains points.

7. Bibliographie

- AFNOR. 2000. Association Française de Normalisation. 2000. Qualité de l'eau - Evaluation de la génotoxicité au moyen de larves d'amphibiens (*Xenopus laevis*, *Pleurodeles waltlii*). NF T 90 – 325, ICS : 13.020.40 ; 13.060.70. Norme française homologuée, Septembre 2000, 17 p.
- Baran N., Saplairoles M., Dictor M.C., Denux J.P., 2011. Etude des transferts de solutés (nitrates et produits phytosanitaires) dans la plaine alluviale de l'Ariège. Année 3. Rapport d'avancement. BRGM/RP-59821-FR, 138p.
- Baran N., Saplairoles M., 2012. Etude des transferts de solutés (nitrates et produits phytosanitaires) dans la plaine alluviale de l'Ariège. Synthèse des résultats. Rapport final. BRGM/RP-60405-FR. 55p.
- Baran N., Gourcy L., Saplairoles M., Bujel D., Denux J.P., 2010. Etude des transferts de solutés (nitrates et produits phytosanitaires) dans la plaine alluviale de l'Ariège et de l'Hers Vif – Année 2. BRGM/RP-58033-FR. Rapport d'avancement – 138 p., 80 ill., 8 ann.
- Baran N., Saplairoles M., Roques C., Gourcy L., Denux J.F., Combes E., Marty F., Poux E., Tilloloy F., Izac J.L., Brach M., 2009. Etude des transferts de solutés (nitrates et produits phytosanitaires) dans la plaine alluviale de l'Ariège. Année 1. Rapport d'avancement. BRGM/RP-56597-FR.
- Bou C., Rouch R., 1967. Un nouveau champ de recherches sur la faune aquatique souterraine. Comptes- Rendus de l'Académie des Sciences de Paris: 265, 369-370
- CGDD, 2011. Commissariat Générale au Développement Durable. Etudes & documents. Observation et statistiques. Service de l'observation et des statistiques. Bilan de présence des micropolluants dans les milieux aquatiques continentaux. Données 2007-2009. 60p.
- Clements C., Ralph S., Petras M., 1997. Genotoxicity of Select Herbicides in *Rana catesbeiana* Tadpoles Using the Alkaline Single-Cell Gel DNA Electrophoresis (Comet) Assay Environ. Mol. Mutagen. 29, 277-288.
- Culman S.W., Bukowski R., Gauch H.G., Cadillo-Quiroz H., Buckley D.H. 2009. T-REX: Software for the Processing and Analysis of T-RFLP data. BMC Bioinformatics 10:171.
- Deparis P., 1973. Le sang circulant au cours de la croissance larvaire de *Pleurodeles waltlii* Michah (Amphibien Urodèle). J. Physiol. Paris 66: 423-436.
- Edwards U., Rogall T., Blöcker H., Emde M., Bottger E. C., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes – characterization of a gene coding for 16S-ribosomal RNA. Nucl. Acids Res. 17 : 7843-7853.
- Hayes T.B., Case P., Chui S., Chung D., Haeffele C., Haston K., Lee M., Mai V.P., Marjuoa Y., Parker J., Tsui M., 2006. Pesticides mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we understanding the impact? Environmental health perspectives 114(1): 40-50.
- ISO 2006. International Standard. Water quality – Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei – Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae. ISO 21427-1, ICS: 13.060.70, GENOVA – CH, Août 2006, 15 p.

Kiely T., Donaldson D., Grube A., 2004. Pesticide industry sales and usage: 2000 and 2001 market estimates (Ventes de l'industrie des pesticides et l'utilisation: 2000 et prévisions 2001 du marché) ; Programmes de l'Agence américaine de protection de l'environnement, Office des pesticides, Washington, DC.

Madre J.F., 2006. Logiciel Mesurim. Académie d'Amiens. <http://www.ac-amiens.fr/pedagogie/svt/info/logiciels/Mesurim2/Index.htm>. micropolluants dans les milieux aquatiques continentaux. Période 2007-2009 n° 54 Service de l'observation et des statistiques. Octobre 2011. www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr

Mouchet F., Gauthier L., 2012. Genotoxicity of contaminants: amphibian micronucleus assay. Chapitre de livre. Comprehensive Handbook (or Practical Guide) of ecotoxicological terms (Férard, J.F. and Blaise, C., editors). Springer Publishers, Dordrecht, The Netherlands. *In press* Nieuwkoop PD, Faber J. 1956.

Muyzer G., 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Op. Microbiol.* 2 : 317-322.

Newman M.C., Clements W.H., 2008. *Ecotoxicology: A Comprehensive Treatment*. CRC Press Taylor & Francis Group.

Nieuwkoop P.D., Faber J., 1956. Normal tables of *Xenopus laevis* (Daudin). A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis. North-Holland Publishing Co. Amsterdam.

Nieuwkoop P.D., 1996. What are the key advantages and disadvantages of urodele species compared to anurans as a model system for experimental analysis of early development? *Int. J. Dev. Biol.* 40: 617-619.

Osano O., Admiraal W., Otieno D., 2009. Developmental disorders in embryos of the frog *Xenopus laevis* induced by chloroacetanilide herbicides and their degradation products. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 375–379 pp.

Penny C., Nadalig T., Alioua M., Gruffaz C., Vuilleumier S., Bringel F., 2010. Coupling of denaturing high-performance liquid chromatography and terminal restriction fragment length polymorphism with precise fragment size calling for microbial community profiling and characterization. *Applied Environmental Microbiology* 76 : 648-651.

Polard T., 2011. Caractérisation des effets génotoxiques sur poissons de produits phytosanitaires en période de crue. Thèse de l'Université Paul Sabatier, p177.

Sankula S., Lin J., Odenkirchen E., Khan F., 2010. Risks of Metolachlor and S-Metolachlor Use to Federally Threatened Delta Smelt (*Hypomesus transpacificus*) and California Tiger Salamander (*Ambystoma californiense*) (Central California Distinct Population Segment) and Federally Endangered Sonoma County and Santa Barbara County Distinct Population Segments of California Tiger Salamander. Environmental Fate and Effects Division Office of Pesticide Programs Washington, D.C. 20460, 143 pp.

Steyermark A.C., 2002. A high standard metabolic rate constrains juvenile growth. *Zoology* 105 : 147–151.



Géosciences pour une Terre durable

brgm

Centre scientifique et technique

3, avenue Claude-Guillemin
BP 36009

45060 – Orléans Cedex 2 – France

Tél. : 02 38 64 34 34 - www.brgm.fr

BRGM Midi-Pyrénées

3, rue Marie Curie
Bât. ARUBA

31520 – Ramonville-Saint-Agne – France

Tél. : 05 62 24 14 50