

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 2 du projet ELISE

Rapport final

BRGM/RP 63386-FR
Mars 2014



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 2 du projet ELISE

Rapport final

BRGM/RP 63386-FR
Mars 2014

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

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

Vérificateur :

Nom : Berho C.

Approbateur :

Nom : Roubichou Ph.

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., Blanchet S., Gauthier L., Imfeld G., Maazouzi C., Marmonier P., Mouchet F., Petelet-Giraud E., Piscart C., Riberon A., Saplaïroles M., Vuilleumier S. (2014) – 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 2 du projet ELISE. Rapport final. BRGM/RP-63386-FR, 84 p., 66 ill., 1 ann.

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.

Quatre axes majeurs 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 rapport BRGM/RP-62056-FR présentait les résultats obtenus la première année de projet. Le présent rapport concerne les activités de l'année 2 portant plus spécifiquement sur :

- la poursuite du monitoring de la qualité des eaux sur la base du réseau de suivi mis en place dans le cadre du projet Transpolar complété par des points d'eau de surface ;
- la mise en œuvre des 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 ;
- L'étude des communautés souterraines (macro et micro-organismes) et l'évaluation de l'impact potentiel de la qualité de l'eau ;
- l'évaluation de l'écotoxicité sur les amphibiens.

Sommaire

1. Contexte et objectifs de l'étude.....	11
1.1. CONTEXTE DE L'ETUDE.....	11
1.2. OBJECTIF DU PROJET	12
1.3. LE PARTENARIAT	15
2. Poursuite du monitoring et amélioration de la connaissance du fonctionnement hydrogéologique.....	17
2.1. MONITORING.....	17
2.1.1. Protocole mis en œuvre	17
2.1.2. Résultats.....	20
2.2. CARACTERISATION DU FONCTIONNEMENT HYDRODYNAMIQUE ET IMPACT SUR LA QUALITE DES EAUX.....	25
2.2.1. Installation de forages et pompages d'essais – traçages	25
2.2.2. Suivi de la qualité de l'eau	36
2.2.3. Approche géochimique et isotopique	39
3. Etude chez les amphibiens.....	53
3.1. EVALUATION DE LA TOXICITE AIGUE, CHRONIQUE ET GENETIQUE DE L'ESA METOLACHLORE ET L'OXALOMETOLACHLORE AU LABORATOIRE ..	53
3.1.1. Toxicité aiguë.....	53
3.1.2. Toxicité chronique.....	54
3.1.3. Toxicité génétique.....	54
3.2. EXPOSITION EN LABORATOIRE DU MODELE AMPHIBIEN <i>Xenopus laevis</i> AUX EAUX DE SURFACE DU SITE D'ETUDE.....	55
3.2.1. Toxicité aiguë.....	57
3.2.2. Toxicité chronique.....	57
3.2.3. Toxicité génétique.....	58
3.3. SUIVI SUR LE TERRAIN	58
3.3.1. Etude de la diversité	58
3.3.2. Etat des populations	59
3.4. APPROCHES EXPERIMENTALES	60
3.4.1. Suivi des cohortes de grenouilles agiles	60
3.4.2. Ecotoxicologie comportementale	61
3.4.3. Asymétrie fluctuante	61
3.5. DISCUSSION SUR LES RESULTATS OBTENUS POUR LES AMPHIBIENS ..	61

4. Etude des macro-organismes souterrains	65
4.1. TESTS DE LABORATOIRE DE TOXICITE.....	65
4.1.1.Exposition aigue au S-métolachlore	65
4.1.2.Exposition aigue à la dééthylatrazine	66
4.1.3.Exposition aigue au mélange S-métolachlore – dééthylatrazine	67
4.2. EXPOSITION IN SITU DE SENTINELLES	68
4.3. DISTRIBUTION SPATIALE DES COMMUNAUTES SOUTERRAINES SUR LA PLAINE	69
4.3.1.Composition de la faune des puits et répartition spatiale des communautés.....	69
4.3.2.Validation moléculaire des taxons de la faune souterraine	70
4.4. DISCUSSION SUR LES RESULTATS OBTENUS SUR LES MACRO- ORGANISMES SOUTERRAINS.....	73
5. Approche microbiologique	75
5.1. EVOLUTION DE LA FLORE BACTERIENNE SOUTERRAINE	76
5.1.1.Points d'eau étudiés	76
5.1.2.Evolution spatiale et temporelle des communautés bactériennes	76
5.2. BIOINDICATEURS MICROBIENS DU METABOLISME DU METOLACHLORE77	
5.3. DISCUSSION SUR LES RESULTATS OBTENUS POUR LES MICRO- ORGANISMES SOUTERRAINS.....	79
6. Premières conclusions et perspectives du projet	81
7. Bibliographie	85

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)	12
Illustration 2 - Structure générale du projet ELISE	14
Illustration 3 - Localisation des points d'eau sélectionnés pour le suivi de la qualité de la nappe alluviale et des eaux de surface.....	18
Illustration 4 - 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).....	19

Illustration 5 - Précipitations annuelles enregistrées à Cugnaux (orange), Montaut (bleu) et Pamiers (vert) et moyennes annuelles sur la période 1995 - 2013.	20
Illustration 6 - Cumul mensuel des précipitations enregistrées à la station de Montaut entre janvier 2008 et janvier 2014	21
Illustration 7 - Nombre total de quantification et nombre de points d'eau souterraine ayant présenté au moins une quantification (données mars 2012 à août 2013, limites de quantification fonctions des molécules – 25 premières molécules)	22
Illustration 8 - Nombre total de quantification et nombre de points d'eau de surface ayant présenté au moins une quantification (données juillet/décembre 2012 à août 2013, limites de quantification fonctions des molécules – 25 premières molécules)	23
Illustration 9 - Evolutions du niveau piézométrique et des concentrations en métolachlore (SMOC) et ses métabolites ESA et OXA de mars 2009 à novembre 2013 au point 283....	24
Illustration 10 - Evolutions du niveau piézométrique et des concentrations en métolachlore (SMOC) et ses métabolites ESA et OXA de mars 2009 à novembre 2013 au point 45..	24
Illustration 11 - Localisation des trois sites expérimentaux	26
Illustration 12 - Coupes géologiques des piézomètres réalisés sur le site de Villeneuve du Paréage	27
Illustration 13 - Coupes techniques des piézomètres réalisés sur le site de Saverdun	28
Illustration 14 - Coupes techniques des piézomètres réalisés sur le site de Montaut-Penchenie	29
Illustration 15 – Résultats des interprétations du pompage d'essai de longue durée de Montaut	30
Illustration 16 – Résultats des interprétations du pompage d'essai de longue durée de Saverdun	31
Illustration 17 – Résultats des interprétations du pompage de longue durée de Villeneuve-du-Paréage	33
Illustration 18 - Lieu d'injection et de restitution et quantité de traceurs utilisés lors du traçage multiple du site de Villeneuve-du-Paréage	34
Illustration 19 - Temps et vitesses caractéristiques des traçages de Villeneuve-du-Paréage	35
Illustration 20 - Pourcentages de restitution des traceurs	35
Illustration 21 - Evolution temporelle de la conductivité dans les différents forages du site de Villeneuve du Paréage et du Crieu au droit du site	36
Illustration 22 - Evolution temporelle des concentrations en ESA métolachlore dans les différents forages du site de Villeneuve du Paréage et du Crieu au droit du site	36
Illustration 23 - Evolution temporelle de la conductivité dans les différents forages du site de Montaut-Penchenie et du fossé noté aval situé à proximité	37
Illustration 24 - Evolution temporelle des concentrations en ESA métolachlore dans les différents forages du site de Montaut-Penchenie et du fossé noté aval situé à proximité	37
Illustration 25 - Evolution temporelle de la conductivité dans les différents forages du site de Saverdun et du Crieu situé à proximité	38
Illustration 26 - Evolution temporelle des concentrations en ESA métolachlore dans les différents forages du site de Saverdun et du Crieu situé à proximité	38
Illustration 27 - 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.....	40
Illustration 28 - Rapport isotopique $87\text{Sr}/86\text{Sr}$ vs. $1/\text{Sr}$ pour les échantillons collectés en octobre 2012	40

Illustration 29 - Localisation des points de prélèvements– sous secteur de Gappia-Les Pujols – Campagne Juin 2013.....	41
Illustration 30 - Conductivité mesurée aux points de prélèvements– sous secteur de Gappia-Les Pujols – Campagne Juin 2013.....	42
Illustration 31 - Teneurs en nitrates aux points de prélèvements– sous secteur de Gappia-Les Pujols – Campagne Juin 2013.....	43
Illustration 32 - Teneurs en métolachlore et métabolites ESA et OXA aux points de prélèvements de juin 2013 – sous secteur de Gappia-Les Pujols	44
Illustration 33 - Teneurs en acétochlore et métabolites ESA et OXA aux points de prélèvements de juin 2013 – sous secteur de Gappia-Les Pujols	45
Illustration 34 - Teneurs en atrazine et métabolites DEA et DIA aux points de prélèvements de juin 2013 – sous secteur de Gappia-Les Pujols	46
Illustration 35 - Rapport isotopique du strontium vs. le rapport Na/Sr pour les points de prélèvements de juin 2013 – sous secteur de Gappia-Les Pujols	46
Illustration 36 - Localisation des points de suivis du sous-secteur Montaut-Penchenie	48
Illustration 37 - Localisation des points de suivis du sous-secteur Les Pujols-Gappia	49
Illustration 38 - Liste des analyses et mesures effectuées sur les 2 sous-secteurs.....	49
Illustration 39 - Evolution de la conductivité au niveau du fossé Penchenie et à l'amont au niveau de RP3 et Carrière	50
Illustration 40 - Evolution de la conductivité à Penchenie et au point 117 – suivi hebdomadaire.....	50
Illustration 41 : Evolution des teneurs en ESA métolachlore à Penchenie et au puits 117 – suivi hebdomadaire	51
Illustration 42 - Evolution de la conductivité depuis la source du Py au puits 151	52
Illustration 43 - Evolution des teneurs en ESA métolachlore au lavoir de Py, dans le fossé Gappia, au niveau du puits 151 et au niveau d'un drainage agricole	52
Illustration 44 - Pourcentage de survie des larves exposées à 0,01 – 0,1 – 1 mg/L d'ESA et d'OXA, en comparaison avec les larves T ⁻	54
Illustration 45 - Taux de croissance chez les larves de Xénope exposées à 0,01 – 0,1 – 1 mg/l d'ESA et d'OXA, en comparaison avec les larves T ⁻	54
Illustration 46 - Résultats de génotoxicité chez les larves de Xénope exposées à 0,01 – 0,1 et 1 mg/L de OXA. Rouge : génotoxicité significative par rapport au T ⁻	55
Illustration 47 - Résultats de génotoxicité chez les larves de Xénope exposées à 0,01 – 0,1 et 1 mg/L de ESA. Rouge : génotoxicité significative par rapport au T ⁻	55
Illustration 48 - Carte de localisation des 7 sites étudiés	56
Illustration 49 - Pourcentage de survie chez les larves exposées aux eaux des 7 sites. T ^{-labo} : eau reconstituée.....	57
Illustration 50 - Taux de croissance chez les larves de Xénope exposées aux eaux des 7 sites, en comparaison avec les larves du témoin négatif (T ⁻) et celles exposées à l'eau du site 230 (référence). Rouge : inhibition de croissance significative par rapport au T ⁻	57
Illustration 51 - Résultats de génotoxicité des larves de Xénope exposées aux eaux des sites, à 20 mg/l de cyclophosphamide (T ⁺), et en eau reconstituée (T ^{-labo}). Rouge : génotoxicité significative par rapport au T ⁻	58
Illustration 52 - Richesse spécifique établi à partir des données cumulées printemps 2012 et printemps 2013. P : ponte, L : Larves, J : juvéniles, A : adultes.....	59

Illustration 53 - Proportion des différentes catégories paysagère dans un rayon de 500 m autour du point d'eau pour les sites 117 et 230	59
Illustration 54 - Disposition du suivi d'adaptation en condition ex situ. Séries rouge et bleue avec 30 têtards chacune et série verte dépourvue de têtards.	60
Illustration 55 - Taux de mortalité des larves exposées aux eaux des 7 sites en conditions ex-situ.	60
Illustration 56 - Répartition du nombre de mouvements des têtards par condition chez <i>R. dalmatina</i> et <i>B. bufo</i> . ER : eau reconstituée (ISO, 2006).	61
Illustration 57 - Indices de pollutions pour les sites étudiés (Année 2012).	62
Illustration 58 - Exposition aigüe au S-métolachlore de trois espèces de Crustacés Amphipodes (<i>G. pulex</i> , <i>G. ariegi</i> , <i>N. rhenorhodanensis</i>) et d'un Isopode (<i>A. aquaticus</i>). Graphe donnant les concentrations provoquant 50% de mortalité (DL50) à différentes durées d'exposition (de 24h à 7 jours).	66
Illustration 59 - Taux de survie à 96h des quatre espèces de Crustacés aquatiques, trois espèces de Crustacés Amphipodes (<i>G. pulex</i> , <i>G. ariegi</i> , <i>N. rhenorhodanensis</i>) et un Isopode (<i>A. aquaticus</i>), au mélange S-métolachlore (en abscisse) et dééthylatrazine (différentes courbes).	67
Illustration 60 - Valeur de l'Indice Ecophysiologique (EPI) traduisant la survie et l'état de santé des Crustacés sentinelles exposés dans 10 puits de la plaine de l'Ariège en 2012 (période de basses eaux) et 2013 (période de hautes eaux). Les valeurs de l'indice sont exprimées en ratio à un lot témoin exposé au laboratoire à une eau sans toxique et varient donc entre 0 et 1.	68
Illustration 61 - Répartition des abondances en organismes hypogés (à gauche) et de l'Amphipode <i>Niphargus gr kochianus</i> (à droite) dans les puits échantillonnés dans la plaine de l'Ariège. Ces résultats pourront être modifiés en fonction des futures identifications moléculaires (en cours).	70
Illustration 62 - Illustration des combos mis en place afin de déterminer rapidement les différentes espèces sur la base du polymorphisme de séquences. Ici deux combos (A et B) sont illustrés. La taille des fragments d'ADN obtenus pour chaque espèce après amplification des amorces spécifiques à chaque combo est mentionné. En haut à droite les trois lignes représentent une visualisation des amplicons de chaque espèce (pour le combo D) après génotypage sur séquenceur. Les pics sont très bien différenciés. En bas à droite on a une représentation d'un gel pour le combo A et pour trois espèces. Chaque bande est un individu et la hauteur de la bande correspond à sa taille.	71
Illustration 63 - Principe de la méthode de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (T-RFLP) des gènes bactériens de l'ARNr 16S amplifiés par PCR pour évaluer la dynamique de la structure des communautés bactériennes de la nappe d'Ariège. Un fragment du gène de l'ARN 16S est généré à partir de l'ADN extrait de la nappe de l'Ariège. Les amplicons marqués (6-FAM- ou de carboxy-X-rhodamine (ROX)) sont digérés par des enzymes de restriction et les fragments sont séparés selon leur taille par électrophorèse capillaire. Les électrophorégrammes T-RFLP ont été alignés et analysés avec le logiciel GeneScan V3.7 (Applied Biosystems). Le traitement numérique et l'analyse des données ont été effectués avec le logiciel R (http://www.r-project.org). Une analyse de positionnement multidimensionnel non-métrique (nMDS) a été réalisée pour étudier les changements de la communauté bactérienne.	75

- Illustration 64 - Analyse multidimensionnelle non-métrique (nMDS) des profils T-RFLP de la communauté bactérienne à partir échantillon d'eau de la nappe de l'Ariège dans les puits 151, 60, 117, 230, 224, 272, 23 et 60 présentant des concentrations en pesticides et ions majeurs variables, lors des campagnes de mai (C1), juillet (C2), septembre (C3) et décembre (C4) 2012, ainsi qu'en février (C5) et mai (C6) 2013. Stress de l'analyse = 0.15%. 76
- Illustration 65 - Séquences d'amorce, gènes cibles et souches de référence pour l'étude spécifique des bactéries et des gènes correspondants impliquées dans le métabolisme du métolachlore..... 78
- Illustration 66 - Exemple d'amplification PCR du gène correspondant à la glutathion S-transférases (GST, classe bêta) à partir d'ADN environnemental et de *Proteus mirabilis* (PmGST), en utilisant la paire d'amorces oligonuléotidiques PmF et PmR. 78

Liste des annexes

- Annexe 1 – Coupes techniques et géologiques des piézomètres forés 87

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).

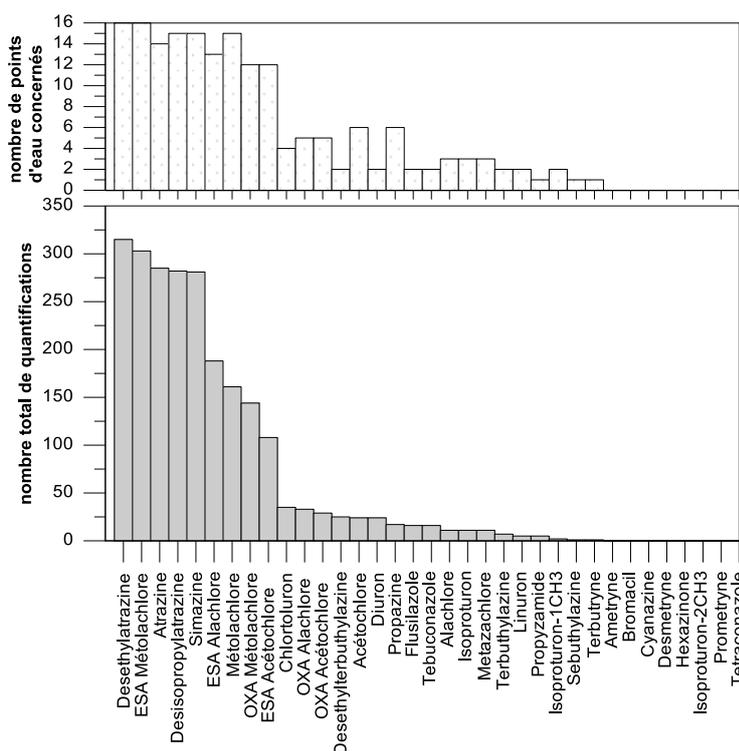


Illustration 1 - Nombre total de quantification et nombre de points d'eau ayant présenté au moins une quantification (données mars 2009 à décembre 2010, limites de quantification fonctions des molécules)

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.

Le rapport BRGM/RP-62056-FR présente les résultats obtenus lors de l'année 1 alors que le présent rapport se focalise sur les avancées obtenues lors de l'année 2 (novembre 2013 environ).

Les actions relevant de l'année 2 sont :

- la poursuite du monitoring de la qualité des eaux sur la base du réseau Transpolar complété par des points d'eau de surface ;
- 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 ;
- L'étude des communautés souterraines (macro et micro-organismes) et l'évaluation de l'impact potentiel de la qualité de l'eau ;
- l'évaluation de l'écotoxicité sur les amphibiens.

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. Poursuite du monitoring et amélioration de la connaissance du fonctionnement hydrogéologique

La rédaction de ce chapitre est assurée par le BRGM.

2.1. MONITORING

2.1.1. Protocole mis en œuvre

La carte de l'illustration 3 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 trois points de suivi en eaux de surface le numéro 60 bis, (mare localisée à proximité du puits n°60, à environ 45 mètres), le 224 bis (situé à 3,7 km du puits n°224) et le 23bis (mare située à environ 20 mètres du puits n°23). Au total, **20 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).

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 :
 - 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.

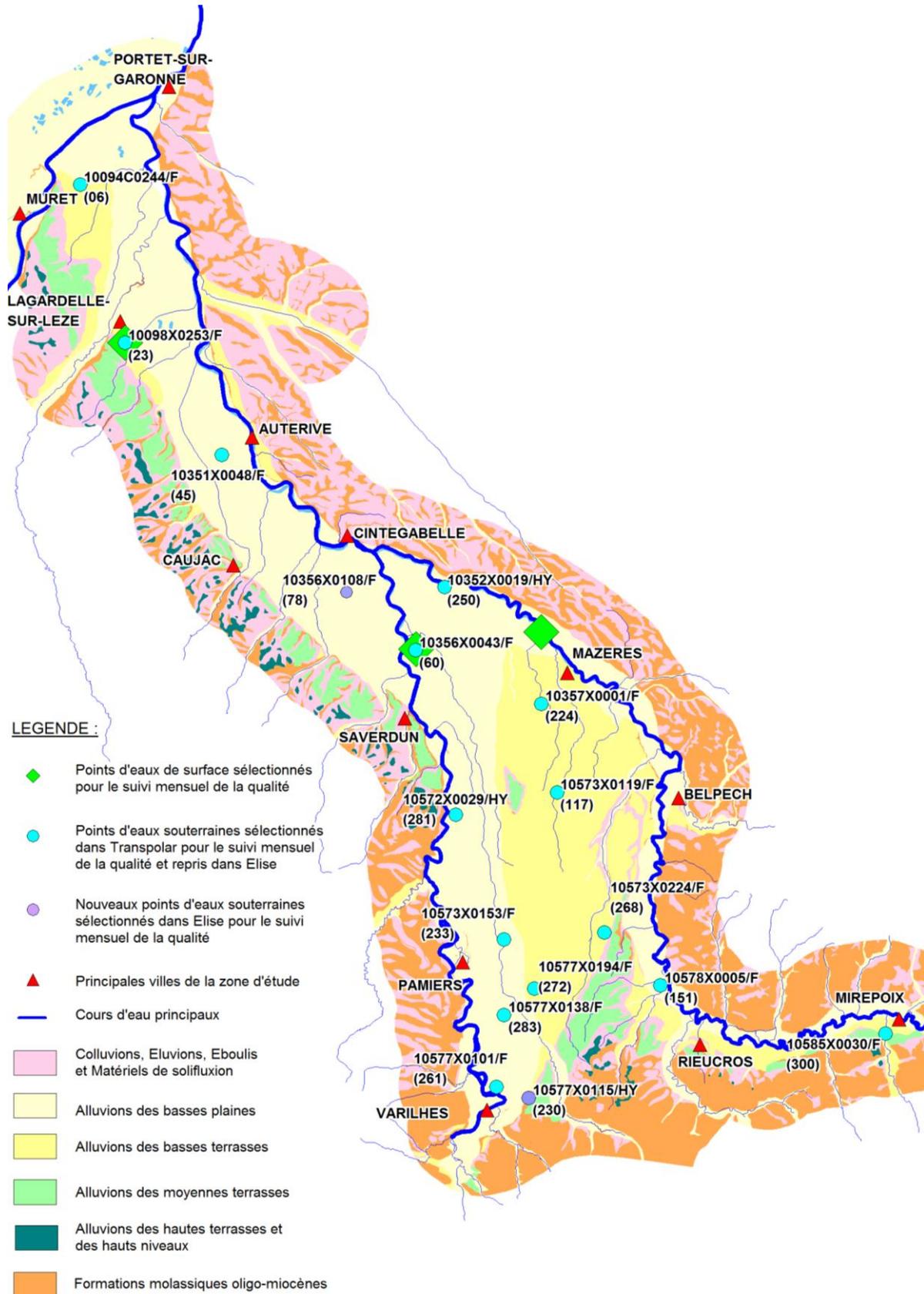


Illustration 3 - Localisation des points d'eau sélectionnés pour le suivi de la qualité de la nappe alluviale et des eaux de surface

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 (Illustration 4).

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 4 - 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)

2.1.2. Résultats

Situation piézométrique

Les données de précipitations enregistrées par MétéoFrance dans les stations de Cugnaux (orange), de Montaut (bleu) et de Pamiers (vert) 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).

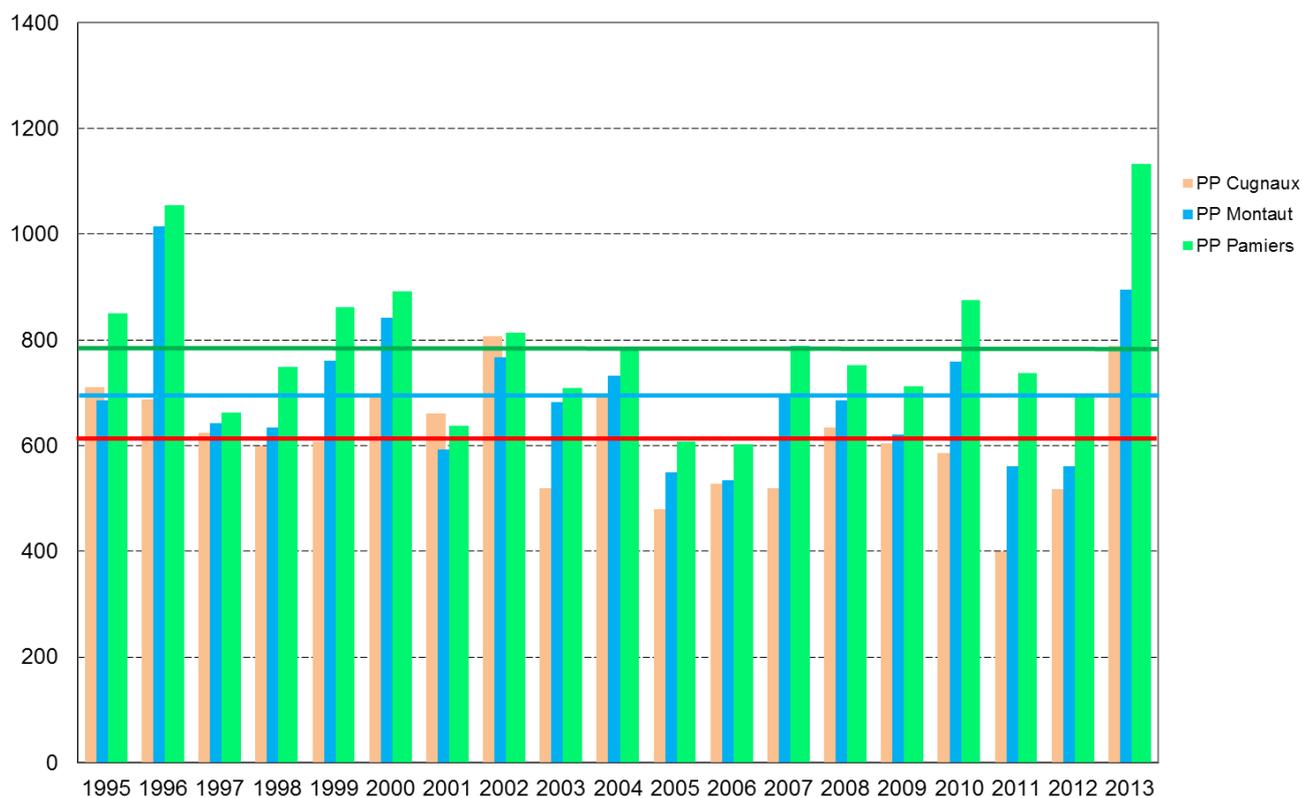


Illustration 5 - Précipitations annuelles enregistrées à Cugnaux (orange), Montaut (bleu) et Pamiers (vert) et moyennes annuelles sur la période 1995 - 2013.

Depuis 2005 et jusqu'en 2010, les cumuls annuels des précipitations sont plutôt inférieurs à la moyenne voire équivalents à la moyenne inter-annuelle établie sur la période 1995-2013 à partir des données enregistrées sur les 3 stations. Les années 2011 puis 2012 apparaissent particulièrement déficitaires sur ces 3 stations. Ces deux années sont marquées par des printemps (avril-mai-juin) présentant de nombreux épisodes orageux avec d'importantes précipitations comme le montre les données de la station de Montaut (Illustration 6).

L'année 2013 a contrario se caractérise par un contexte pluviométrique très largement excédentaire à la moyenne (calculée sur la période 1995-2013) en particulier dans le secteur sud de la plaine. Ainsi, le mois de novembre est le plus arrosé de l'histoire météorologique des 7 dernières décennies sur tout le piémont pyrénéen avec un cumul mensuel de plus de 170 mm enregistré à la station de Montaut et atteignant plus de 230 mm à Pamiers.

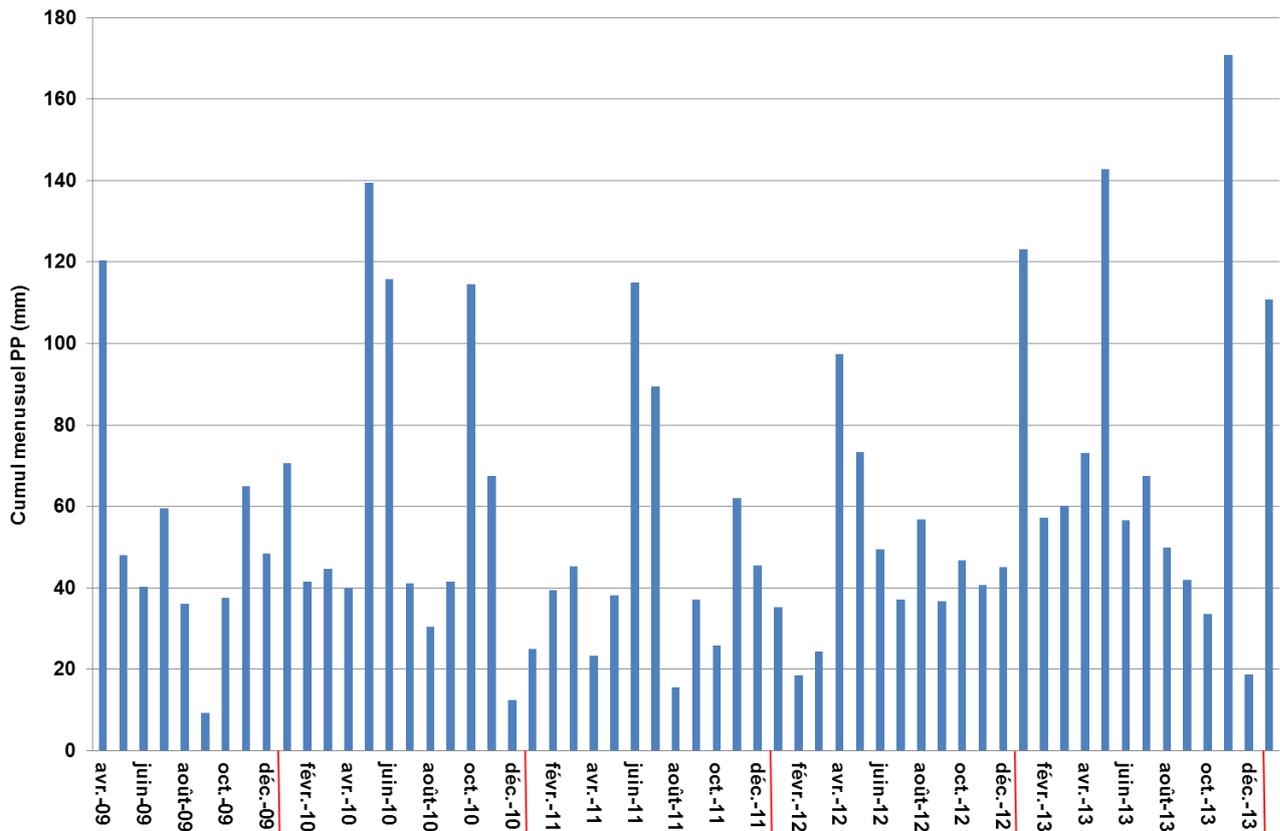


Illustration 6 - Cumul mensuel des précipitations enregistrées à la station de Montaut entre janvier 2008 et janvier 2014

Ce changement de tendance pluviométrique a eu pour effet de faire remonter les niveaux piézométriques de façon plus ou moins importante selon les secteurs de la plaine. Pour de nombreux points de suivi (06, 23, 45, 60, 78, 117, 151), le maximum a été atteint entre février et avril 2013, d'autres un peu plus tardivement (233, 268, 272, 283, 300). Pour la plupart des points, l'année 2013 correspond au maximum piézométrique observé depuis le début des suivis (mars 2009). Quelques chroniques sont visibles dans l'illustration 9 et l'illustration 10.

Données qualité de l'eau

A ce jour, les données complètes disponibles portent sur les campagnes de mars 2012 à août 2013. 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 7).

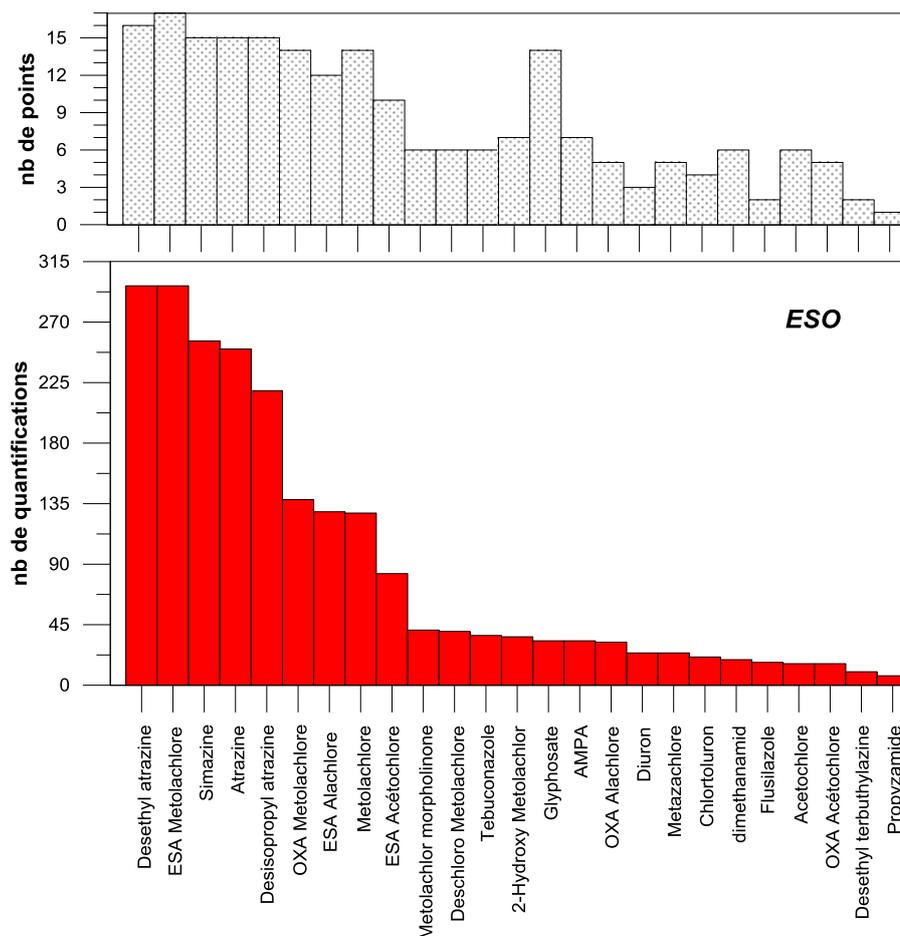


Illustration 7 - Nombre total de quantification et nombre de points d'eau souterraine ayant présenté au moins une quantification (données mars 2012 à août 2013, limites de quantification fonctions des molécules – 25 premières molécules)

Pour les eaux souterraines, les premiers résultats (315 échantillons analysés) montrent que les molécules nouvellement recherchées dans le projet ELISE sont quantifiées. Il s'agit notamment du glyphosate et de son métabolite AMPA, ainsi que de produits de transformation du métolachlore (notamment le métolachlore morpholinone, le deschlorométolachlore et l'hydroxymétolachlore). Il est à noter par ailleurs que des molécules historiquement recherchées, comme le métazachlore, ont été quantifiées de manière plus importante. Les molécules les plus fréquemment quantifiées et concernant la presque totalité des points d'eaux souterraines restent la déséthylatrazine, l'acide éthane sulfonique du métalochlore puis la simazine, l'atrazine, la désisopropylatrazine et un troisième groupe constitué de l'acide oxanilique du métalochlore, l'acide éthane sulfonique de l'alachlore et le métolachlore.

Il s'agit donc à la fois de produits de dégradation et de molécules mères d'usages autorisés (métolachlore via le S-métolachlore) ou n'ayant plus d'usages autorisés (atrazine, simazine essentiellement). Si les fréquences de quantification et le nombre de points concernés par la présence d'une molécule mère autorisée ou ses métabolites ou par la présence d'une substance qui n'est plus autorisée ou ses métabolites sont similaires en revanche les concentrations observées et les gammes de variation sont très différentes. Ainsi pour un point donné, les teneurs en atrazine et DEA fluctuent peu alors qu'elles peuvent fortement varier sur l'année pour le métolachlore et ses métabolites ESA et OXA, en lien notamment avec les potentielles applications.

Pour les 3 points d'eau de surface, les données sont un peu moins nombreuses puisqu'à ce stade cela représente 37 échantillons pour seulement 3 points d'eau (vs. 315 en eau souterraine - Illustration 8). Si l'ordre établi suivant les fréquences de quantification est un peu différent entre les eaux de surface et les eaux souterraines, la plupart des molécules (parmi les 25 les plus quantifiées) est commune. En revanche, d'autres ressortent un peu plus. Il s'agit par exemple de l'isoproturon ou d'autres métabolites dits neutres des chloroacétanilides.

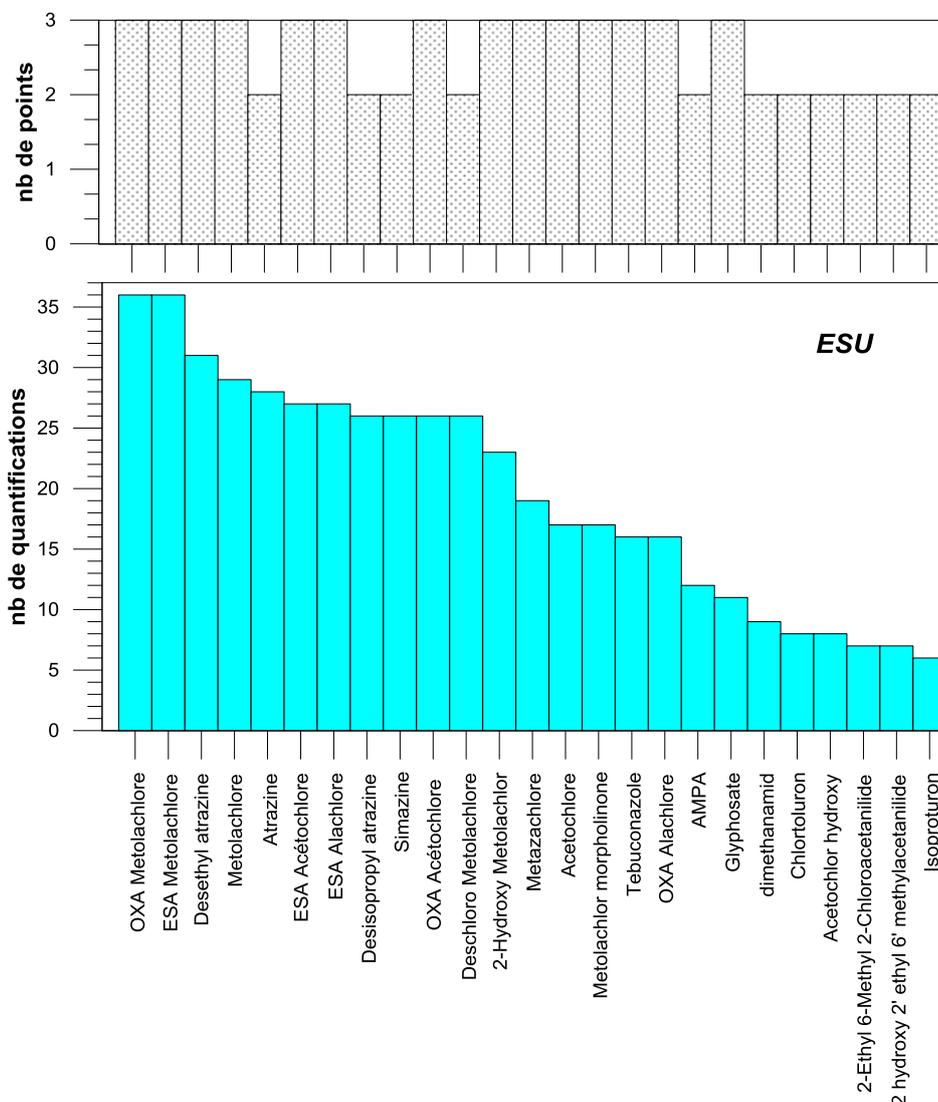


Illustration 8 - Nombre total de quantification et nombre de points d'eau de surface ayant présenté au moins une quantification (données juillet/décembre 2012 à août 2013, limites de quantification fonctions des molécules – 25 premières molécules)

L'examen détaillé des chroniques acquises notamment au regard du métolachlore et ses métabolites ESA et OXA montre une diversité de situations avec des concentrations pouvant fortement fluctuer au cours d'une année mais aussi d'une année à l'autre probablement en fonction des potentielles applications réalisées dans l'environnement du point d'eau. Ainsi par exemple pour le point 283 (Illustration 9), les teneurs maximales mesurées en métolachlore en 2013 ont été presque 3 fois supérieures à celles de 2010.

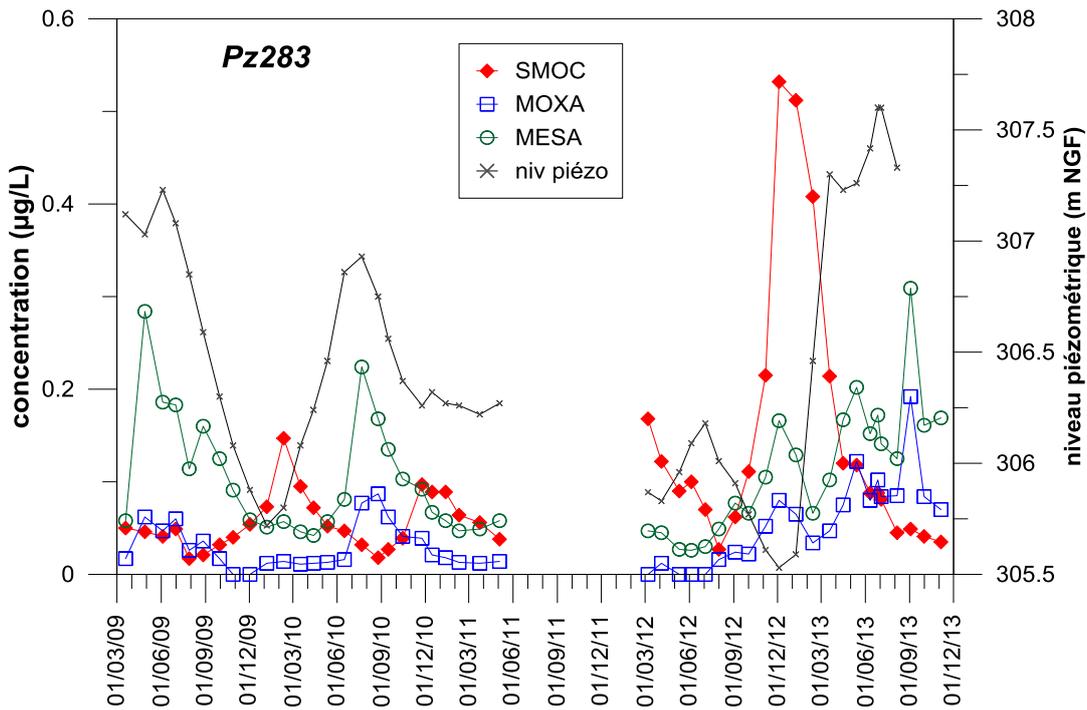


Illustration 9 - Evolutions du niveau piézométrique et des concentrations en métolachlore (SMOC) et ses métabolites ESA et OXA de mars 2009 à novembre 2013 au point 283

L'examen de toutes les chroniques montre aussi que certains pics de concentrations semblent en relation avec d'éventuelles applications (Illustration 10) alors que d'autres ne le sont pas (cas du point 283 par exemple - Illustration 9).

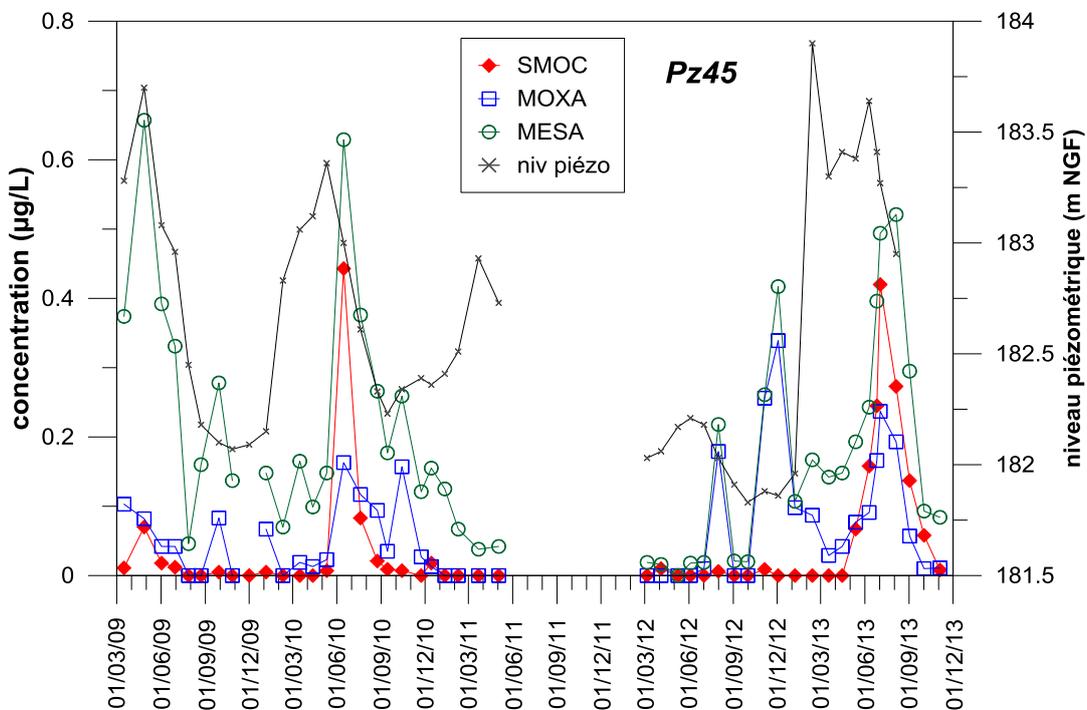


Illustration 10 - Evolutions du niveau piézométrique et des concentrations en métolachlore (SMOC) et ses métabolites ESA et OXA de mars 2009 à novembre 2013 au point 45

2.2. CARACTERISATION DU FONCTIONNEMENT HYDRODYNAMIQUE ET IMPACT SUR LA QUALITE DES EAUX

2.2.1. Installation de forages et pompages d'essais – traçages

Trois nouveaux sites expérimentaux ont été mis en place au sein de la plaine. Il s'agissait d'implanter sur chacun de ces sites, plusieurs sondages de reconnaissance équipés en piézomètre de profondeur différente et croissante selon un système de « flûte de pan » dont le maximum est foncé jusqu'au substratum molassique. Ces travaux ont été réalisés entre les mois d'avril et de juin 2013.

Ces différents ouvrages permettent de mettre en place plusieurs applications :

- échantillonnage d'eaux multi-niveaux fiable dans un objectif de détermination d'une potentielle stratification de la qualité au sein de la nappe alluviale,
- mise en œuvre de pompages d'essai, voire de traçages, destinés à caractériser les paramètres hydrodynamiques de la nappe au droit des sites étudiés et d'apprécier les caractéristiques des berges des cours d'eau concernés.

Les trois sites retenus se trouvent dans des contextes hydrogéologiques différents (Illustration 11). En fonction des données acquises dans le précédent programme Transpolar, il a semblé opportun de s'intéresser aux trois types de relations suivantes :

- Relations hydrauliques entre la nappe et le Crieu dans la partie amont de la rivière, au niveau du site de Villeneuve-du-Paréage, secteur où le lit du cours d'eau a été anthropisé par le passé et présente la particularité d'être en position haute par rapport à l'aquifère alluvial induisant une potentielle infiltration des eaux du Crieu dans la nappe,
- Relations hydrauliques entre la nappe et le Crieu dans la partie aval de la rivière, au niveau du site de Saverdun, où le cours d'eau redevient dans une position encaissée au sein des alluvions et où les échanges avec la nappe sont potentiellement doubles (nappe-rivière et/ou rivière-nappe)
- Relations hydrauliques entre la nappe et un des nombreux fossés de drainage présent au sein de la plaine et en particulier dans les basses terrasses de l'Ariège au niveau du site de Montaut. Ce fossé est suivi précisément d'un point de vue qualitatif depuis octobre 2012.

Les descriptions géologiques détaillées ainsi que les comptes-rendus de travaux sont reportés dans le rapport BRGM/RP-63515-FR. Les coupes géologiques et techniques de chaque ouvrage sont présentes en annexe 1.

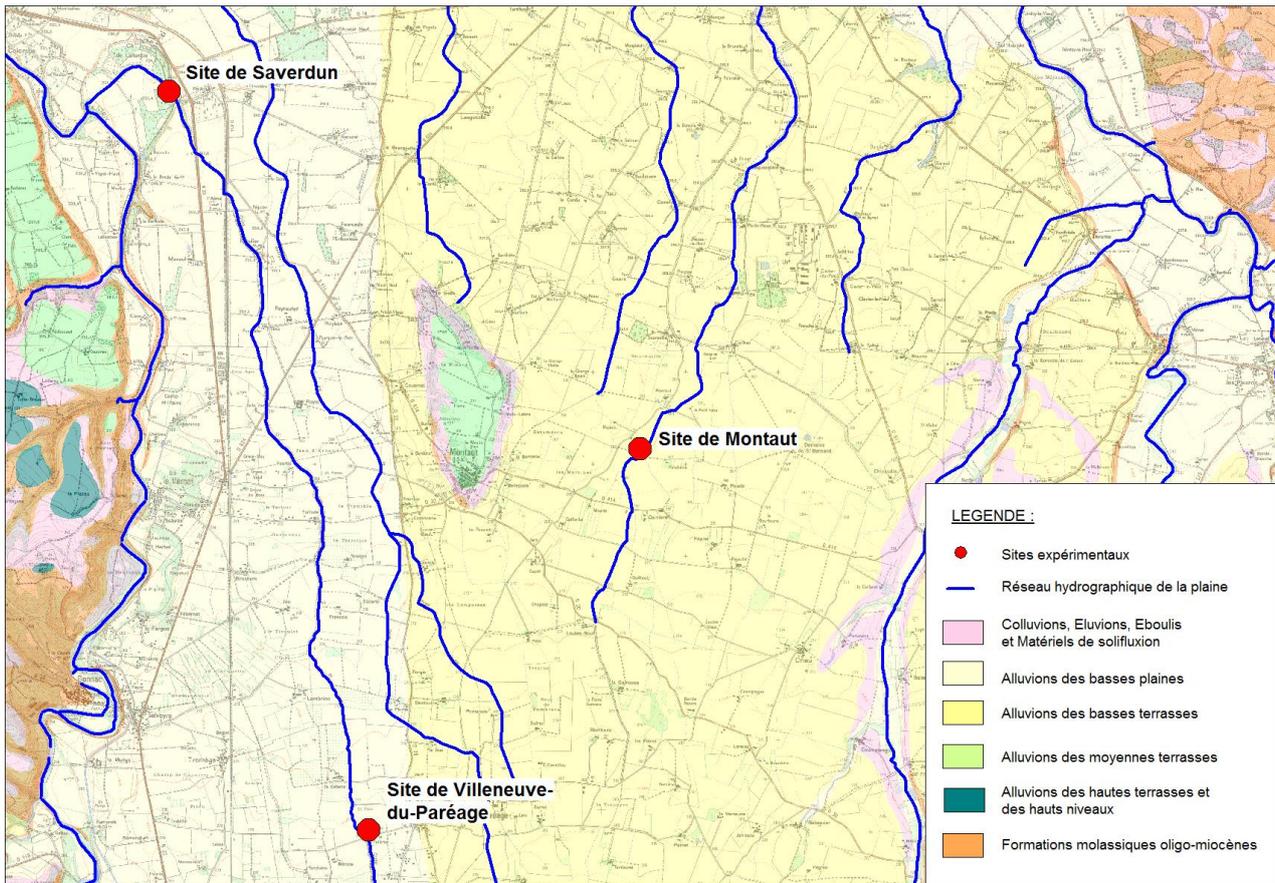


Illustration 11 - Localisation des trois sites expérimentaux

Les 2 piézomètres du site de Villeneuve-du-Paréage, PzB et PzA, sont implantés au sein des alluvions de la basse plaine de l'Ariège reposant sur un substratum molassique tertiaire daté de l'Oligocène. Le suivi géologique effectué lors de leur foration a permis de dresser les deux coupes géologiques de l'illustration 12. Ces informations viennent en complément de celles acquises par les deux ouvrages existants sur le site.

Les marnes sableuses des formations molassiques ont été atteintes autour de 13,50 mètres de profondeur dans le piézomètre PzB (profond de 15m) et dans l'ancien captage AEP, profond de 14m (10573X0142/F).

Le piézomètre PzB est équipé entre 11 et 13 m au droit des sables grossiers de la partie basse de l'aquifère. A l'inverse les crépines du PzA (foré à 10,5m de profondeur) sont positionnées entre 8 et 9 m.

L'ancien captage AEP (10573X0142/F) permet de contrôler l'aquifère dans son ensemble. Un ancien piézomètre (10573X0002/F), profond de 7,6 m permet de mesurer la partie supérieure du système. Enfin pour compléter le suivi, la rivière Crieu est également échantillonnée.

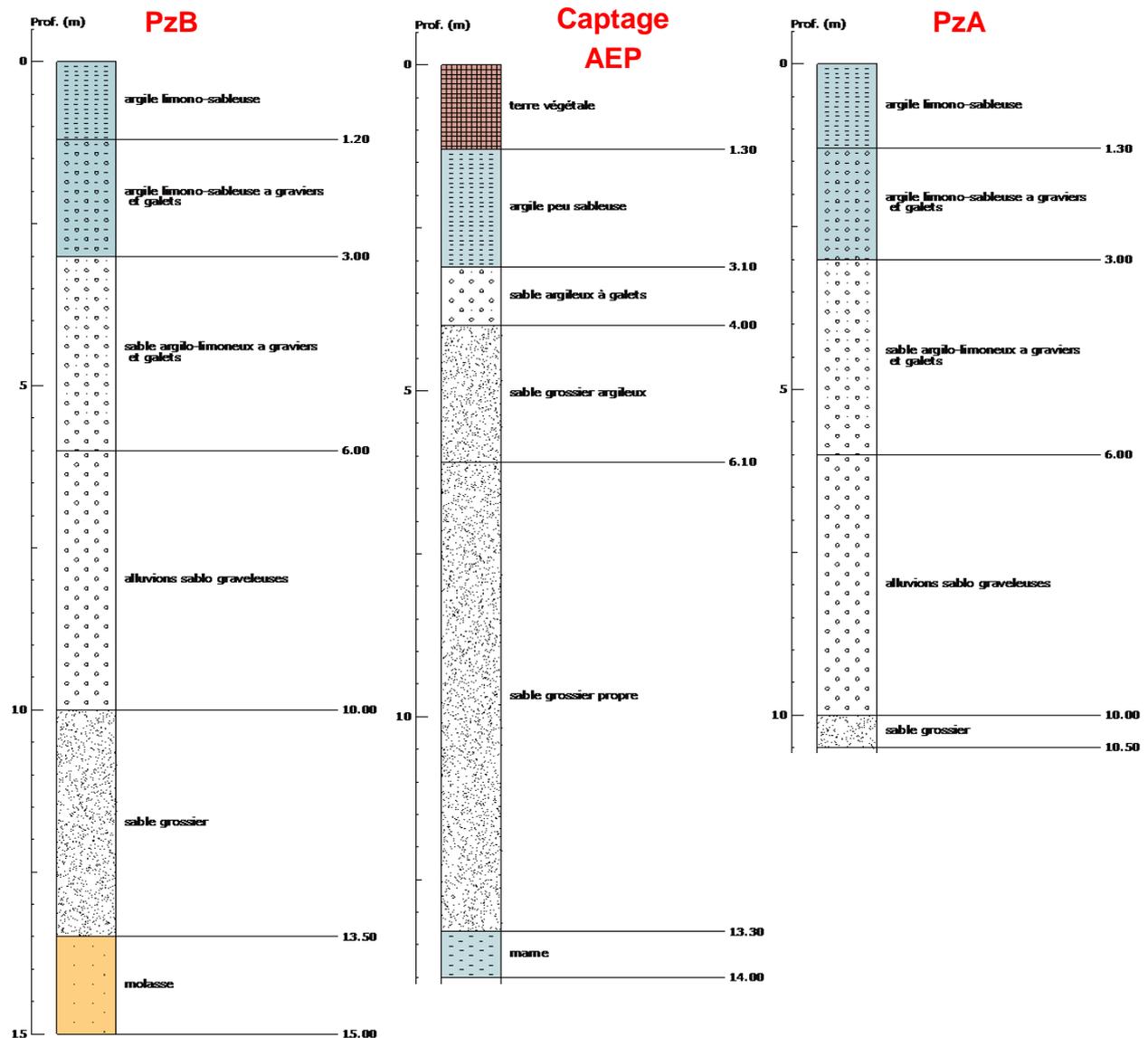


Illustration 12 - Coupes géologiques des piézomètres réalisés sur le site de Villeneuve du Paréage

Les trois piézomètres du site de Saverdun (Illustration 13) sont implantés au sein des mêmes formations alluviales que celles désignées précédemment à savoir les alluvions des basses plaines de l'Ariège. Par contre, le substratum molassique oligocène est atteint moins profondément, autour de 7,6 m de profondeur, par rapport au site de Villeneuve-du-Paréage.

Le piézomètre PzC est le plus profond (foré jusqu'aux marnes sableuses) et les crépines sont positionnées dans la partie basse de l'aquifère (globalement de 6,5 à 7,5m) alors que le piézomètre PzA est le plus superficiel, les crépines étant situées entre 3,75 et 4,75 m. Le piézomètre PzB est crépiné entre 5,2 et 6,2 m. En complément de ces points, l'ancien captage (10356X0024/F), crépiné de 4,0 à 8,0 m est également intégré au suivi, de même que le Crieu situé à environ 11 m de distance.

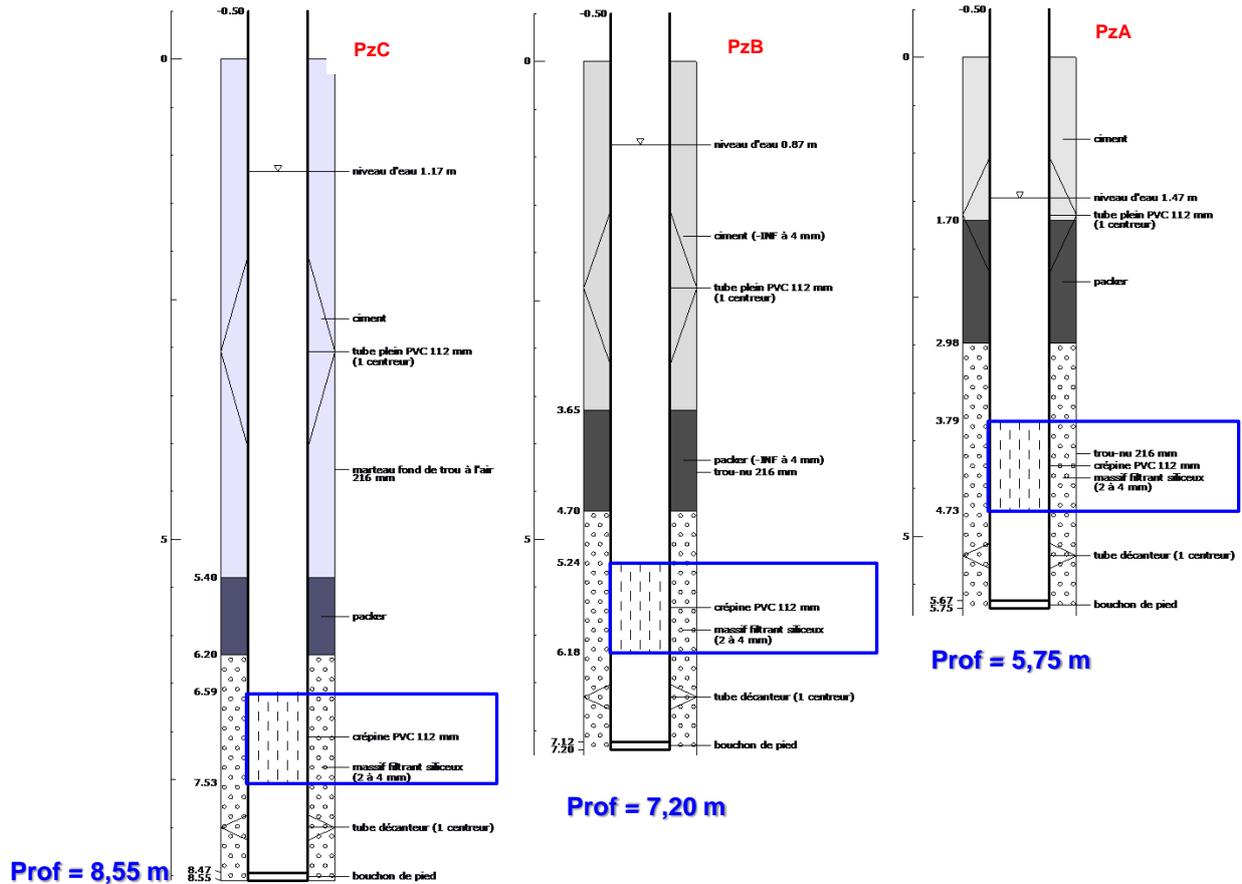


Illustration 13 - Coupes techniques des piézomètres réalisés sur le site de Saverdun

Les 3 piézomètres du site de Montaut (Illustration 14) sont implantés au sein des formations alluvionnaires des basses terrasses de l'Ariège et de l'Hers Vif reposant sur un substratum molassique tertiaire daté de l'Oligocène. L'épaisseur de couche d'alluvions reconnue lors de la réalisation des piézomètres PzC et PzB est de 6,7 m.

Le piézomètre PzC foncé jusqu'aux marnes (reconnues à 6,7 de profondeur) capte les alluvions sablo-graveleuses entre 5,6 et 6,6 m. Le piézomètre PzA moins profond concerne la partie plus superficielle de ces alluvions graveleuses entre 1,6 et 4,4 m. Le piézomètre PzB capte également ces alluvions entre 4,5 et 5,5 m. En complément de ces points, le fossé est suivi via le point de prélèvement nommé Penchenie Aval.

A la suite de ces travaux et pour conduire l'interprétation hydrogéologique relative à ces différents sites expérimentaux, plusieurs types de tests ont été mis en œuvre. Il s'agissait de réaliser des pompages d'essais sur chacun des sites et un traçage multiple sur celui de Villeneuve-du-Paréage. L'objectif de ces opérations de terrain est multiple :

- vérifier la bonne connexion de l'ouvrage avec l'aquifère,
- identifier les paramètres hydrodynamiques de la nappe, en particulier la transmissivité qui caractérise l'écoulement souterrain,
- identifier les paramètres hydro-dispersifs, en particulier la porosité cinématique qui caractérise le transport dans le milieu souterrain,
- mettre en évidence d'éventuelles limites, en particulier le rôle des cours d'eau voisins,
- mettre en évidence une éventuelle hétérogénéité verticale.

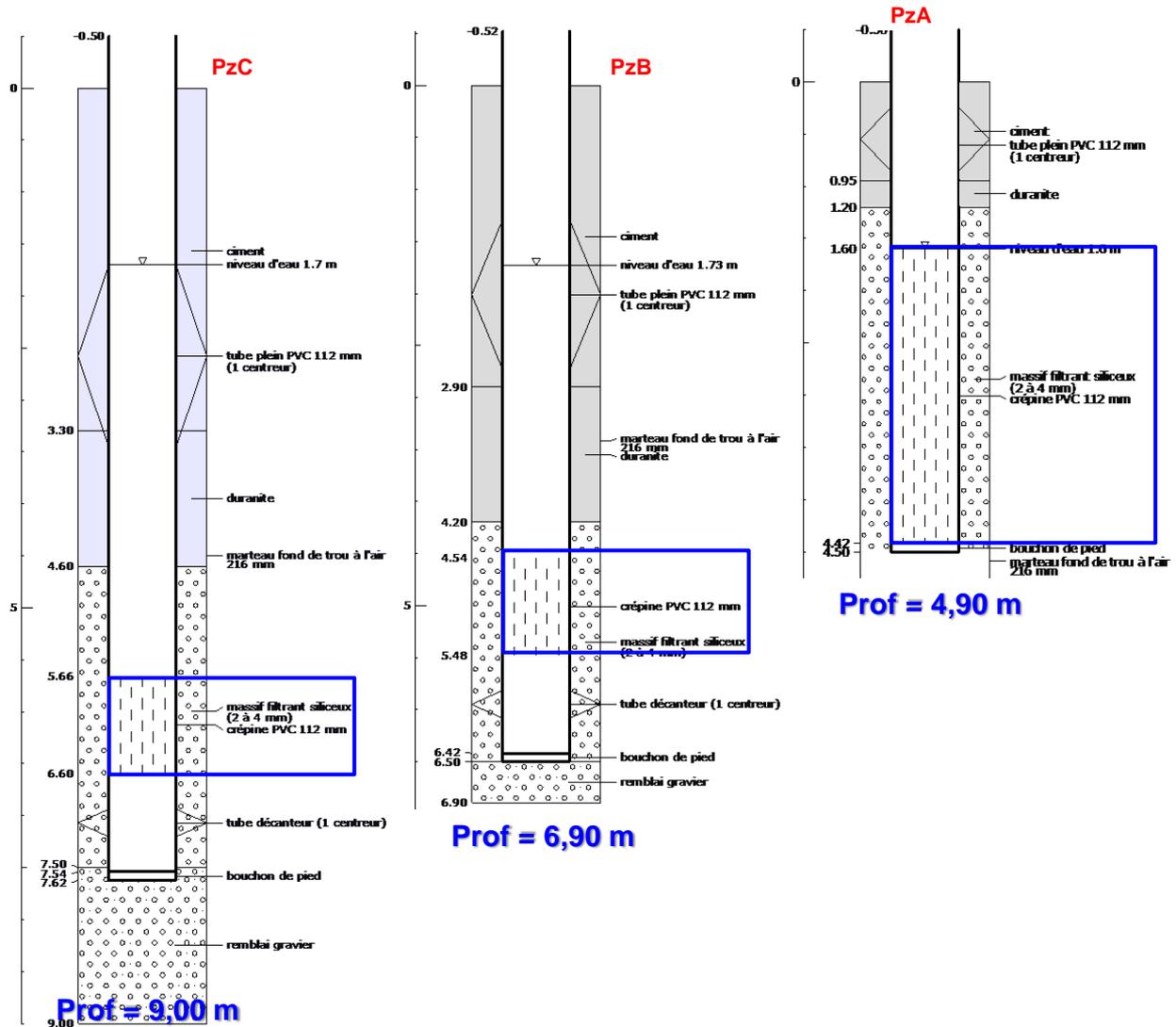


Illustration 14 - Coupes techniques des piézomètres réalisés sur le site de Montaut-Penchenie

Résultats des pompages d'essais entrepris sur chacun des sites

L'entreprise 2GH a assuré la mise en œuvre des 3 pompages d'essai sous le contrôle d'un ingénieur hydrogéologue du BRGM. Ces opérations ont concerné sur chacun des sites la réalisation de :

- un pompage d'essai par paliers de 3 à 4 paliers de 1h séparés par 1h de remontée,
- un pompage d'essai à un débit défini par le pompage d'essai par palier.

• Site de Montaut

Les pompages d'essais sur le site de Montaut se sont déroulés du 10 au 13 avril 2013. Ils ont été réalisés à l'aide d'une pompe dont la crépine a été placée au fond du PZC, le plus profond du triplet de piézomètres. Pour rappel, les 3 piézomètres sont situés parallèlement au fossé de Penchenié à une distance comprise entre 4,5 et 5 m de ce dernier. Ces ouvrages ont été équipés de capteur de pression permettant le suivre l'évolution du niveau d'eau durant toute la période de réalisation de l'essai. Afin de contrôler les mesures automatiques, un suivi manuel à

l'aide d'une sonde piézométrique a été assuré durant les premières heures de l'essai et lors de l'arrêt du pompage pour le suivi de la remontée des niveaux. Un contrôle régulier du débit a également été effectué en contrôle du débitmètre installé sur la conduite de refoulement.

Les pompages par paliers ont eu lieu le 10 avril 2013. Trois paliers de débit, à débit constant pendant une durée de 1h ont été effectués, chacun ayant été suivi d'un arrêt de pompage d'une durée égale permettant la remontée du niveau d'eau et la mesure du rabattement résiduel.

Les coefficients de pertes de charge issus de la courbe caractéristique d'équation $s = BQ + CQ^2$ (s, rabattement en mètres et Q débit, en m^3/s) ont été obtenus à l'aide du logiciel OUAIP développé par le BRGM :

- Coefficient de pertes de charges linéaires : $B = 1650 \text{ s/m}^2$
- Coefficient de pertes de charges quadratiques : $C = 140\,600 \text{ s}^2/\text{m}^5$

Le pompage d'essai de longue durée a démarré le 11 avril 2013 et s'est poursuivi durant 24 h à un débit de $3,45 \text{ m}^3/\text{h}$, suivi par une observation de la remontée des niveaux pendant une durée équivalente. Les données ont été interprétées en utilisant la méthode de THEIS, supposant le milieu infini, homogène et isotrope. Les résultats sont reportés dans le tableau de l'illustration 15 reprenant l'ensemble des interprétations envisagées.

	Montaut - PzC			Montaut - PzB		Montaut - PzA	
Prof. Crépines (m)	5.80 - 6.80			4.50 - 5.50		1.20 - 4.50	
r (m)	0.056			8.3		15.78	
C (s^2/m^5)	140600	140600	657100	/	/	/	/
Débit Q (m^3/h)	3.45			3.45		3.45	
Rabattements (s) en m	1.92			1.71		0.43	
Methode	Theis			Theis		Theis	
T (m^2/s)	9.40E^{-04}	9.70E^{-04}	9.70E^{-04}	2.35E^{-04}	9.4E^{-04}	1.56E^{-03}	9.3E^{-04}
S	1.10E^{-02}	1.00E^{-04}	1.73E^{-03}	1.10E^{-04}	2.50E^{-04}	2.00E^{-03}	1.50E^{-03}
Dist. Lim. Etanche (m)	/	/	/	/	/	100	/
Dist. Lim. Alimentation (m)	/	/	/	50	/	/	/

Illustration 15 – Résultats des interprétations du pompage d'essai de longue durée de Montaut

Les résultats obtenus montrent qu'il **n'y a pas d'interaction hydraulique entre le fossé de Penchenié et les piézomètres**, pourtant situés à 5m de distance. Toute tentative de modéliser la présence d'une limite alimentée dégrade considérablement l'ajustement. Sur le piézomètre PzA, c'est une limite étanche qui est invoquée pour caler la remontée.

Les valeurs des transmissivités sont plus faibles que sur les autres sites (autour de $1 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2/\text{s}$) et du même ordre de grandeur sur les trois profondeurs testées.

Les valeurs du coefficient d'emmagasinement correspondent à des **emmagasinevements de nappe captive** : de l'ordre de $1 \cdot 10^{-4}$ pour les piézomètres les plus profonds (PZB, PZC) et de $1 \cdot 10^{-3}$ pour le piézomètre PZA.

• **Site de Saverdun**

Les pompages du site de Saverdun ont été réalisés dans un ancien forage d'alimentation en eau potable, profond de 8,24 m, portant l'indice national 10356X0024/F à l'aide d'une pompe immergée de l'entreprise 2GH. Les suivis de variations des niveaux d'eau ont été effectués au niveau du puits de pompage et sur les 3 piézomètres forés à l'aide d'enregistreurs automatiques et contrôlés par des mesures manuelles à la sonde électrique.

Les pompages par paliers ont eu lieu le 9 octobre 2013. Quatre paliers de débit, à débit constant pendant une durée de 1h ont été effectués dans les règles de l'art. Chacun a été suivi d'un arrêt de pompage d'une durée égale permettant la remontée du niveau d'eau et la mesure du rabattement résiduel. Les contrôles des enregistrements automatiques de débits ayant montré que le débitmètre était mal calibré, ce sont les données manuelles qui ont été retenues.

Les deux derniers paliers sont décalés de 37 cm. Le niveau statique n'est jamais remonté à la cote initiale. La raison de ce décalage tient probablement au déplacement (intentionnel ou accidentel) de la sonde de pression dans le puits mais cette information n'a pas pu être confirmée. Dans le doute, aucune correction n'a été apportée.

Les coefficients de pertes de charge B et C obtenus sont les suivants :

- Coefficient de pertes de charge linéaires : $B = 600 \text{ s/m}^2$
- Coefficient de pertes de charge quadratiques : $C = 250\,000 \text{ s}^5/\text{m}^2$

Le pompage d'essai de longue durée a démarré le 10 octobre 2013 et s'est poursuivi durant 24 h à un débit de $10 \text{ m}^3/\text{h}$, suivi par une observation de la remontée des niveaux pendant une durée équivalente. Cet essai est malheureusement de qualité médiocre, l'effet de la variation journalière de la pression atmosphérique sur la nappe ayant considérablement perturbé l'interprétation des essais, en particulier lors de la remontée.

Les conditions initiales et finales de l'essai ne sont pas comparables. Les interprétations, dont les résultats sont présentés sur l'illustration 16, se sont basées sur le début de l'essai.

	Saverdun - Puits Pompage			Saverdun - PzC	Saverdun - PzB		Saverdun - PzA
Prof. Crépines (m)	4.00 - 8.00			6.59 - 7.53	5.24 - 6.18		3.79 - 4.73
r (m)	0.36			12	24		36
C (s^2/m^5)	250000			/	/	/	/
Débit Q (m^3/h)	10	5.4 (paliers 1 et 2)	5.4 (paliers 1 et 2)	10	10		10
Rabattements (s) en m	3.14	1.40	1.40	0.48	0.18		0.15
Methode	Theis			Theis	Theis	Hantush	Theis
T (m^2/s)	1.40E^{-03}	1.00E^{-03}	3.00E^{-03}	6.06E^{-04}	8.30E^{-04}	3.80E^{-03}	1.22E^{-03}
S	2.00E^{-02}			1.30E^{-03}	2.00E^{-03}	2.50E^{-03}	1.80E^{-03}
Dist. Lim. Etanche (m)	/	/	/	/	100	/	100
Dist. Lim. Alimentation (m)	8	8	8	10	11	/	20

Illustration 16 – Résultats des interprétations du pompage d'essai de longue durée de Saverdun

L'influence du pompage au puits AEP à un débit d'environ 10 m³/h est sensible sur les trois piézomètres :

- les niveaux d'eau dans le piézomètre PzA, le plus éloigné (36m), varient de 15 cm,
- l'influence sur le piézomètre PzC, le plus proche (12m) est de 48 cm de rabattement.

L'interprétation au puits de pompage montre sans ambiguïté l'influence du Crieu, situé à 8m.

Les valeurs de transmissivité et d'emmagasinement varient significativement car les niveaux captés correspondent à des lithologies différentes. Le puits de pompage qui capte toute l'épaisseur de l'aquifère est ajusté avec un coefficient d'emmagasinement de nappe libre (de l'ordre de 2.10^{-2}). Les piézomètres, qui captent des zones réduites sous les formations argileuses, sont ajustés avec des coefficients de nappe captive ou semi-captive (de l'ordre de 2.10^{-3}). Ces dernières valeurs sont considérées comme étant les plus représentatives.

La nappe alluviale a donc un **caractère semi captif**. Néanmoins, l'influence du Crieu se fait sentir sur les piézomètres PzB et PzC, et dans une moindre mesure (amortissement) sur le PZA. Tous **les ouvrages seraient donc en relation plus ou moins directe avec le Crieu**.

- **Site de Villeneuve-du-Paréage**

Les pompes du site de Villeneuve-du-Paréage ont été réalisés dans l'ancien forage d'alimentation en eau potable, profond de 14m, portant l'indice national 10573X0142/F avec un suivi des niveaux d'eau au puits de pompage, sur les piézomètres forés, PzA et PzB, et sur l'ancien piézomètre 10573X0002/F. Les pompes en place ne fonctionnant plus, elles ont été retirées et remplacées le temps de l'essai par une pompe immergée de l'entreprise 2GH.

Un débitmètre électromagnétique, installé sur les conduites de refoulement du puits de pompage, a permis la lecture instantanée du débit. Parallèlement, des contrôles de débit ont été régulièrement effectués par jaugeage volumétrique d'un réservoir étalonné. Les niveaux d'eau ont été acquis de manière automatique par des capteurs de pression reliés à des stations d'acquisition et contrôlés par des mesures manuelles à la sonde électrique. La remontée de la nappe a été suivie jusqu'au retour à l'état initial.

Le pompage par palier a été réalisé en deux fois, les 4 et 5 avril 2013 (deux paliers de 2h chaque jour). Afin de balayer la plus grande plage de débit possible, deux pompes différentes ont été utilisées. Deux choses frappent à première vue sur ces essais :

- la nappe n'est pas stable. Son niveau initial est dépassé de 4 cm lors de la remontée du deuxième palier,
- Les paliers 1 et 2 sont très différents des paliers 3 et 4 réalisés avec une pompe plus puissante. Le débit spécifique entre le palier 3 et le palier 4 est amélioré de 15 m³/h/m.

Pour ces raisons, l'essai ne peut donner lieu à une interprétation conjointe des 4 paliers. Seuls les deux derniers paliers, proches du débit de l'essai de longue durée (40 m³/h) sont retenus. Un troisième point est obtenu en prenant l'essai de longue durée au bout de 2h. Les coefficients de pertes de charge B et C obtenus sont les suivants :

- Coefficient de pertes de charges linéaires (B) : 71 s/m²
- Coefficient de pertes de charges quadratiques (C) : 3100 s²/m⁵

Le pompage d'essai de longue durée a démarré le 5 avril 2013 à 18h et s'est prolongé jusqu'au 9 avril à 8h30. La durée initialement prévue, de 24h, a été étendue à 86h pour maximiser le suivi des expériences de traçage réalisées au même moment. La remontée a été suivie pendant 24h.

Les résultats sont reportés dans le tableau de l'illustration 17 reprenant l'ensemble des interprétations envisagées.

	Villeneuve - Puits Pompage			Villeneuve - PzB				Villeneuve - PzA				Villeneuve - Ancien Piezo.		
Prof. Crépines (m)	4.00 - 14.00			11.00 - 13.00				8.50 - 9.50				4.00 - 6.00		
r (m)	1.0			15.4				26				16		
C (s ² /m ⁵)	3100	2000	3100	/				/				/		
Débit Q (m ³ /h)	40	35 (paliers 3 et 4)	35 (paliers 3 et 4)	40				40				40		
Rabattements (s) en m	1.13	0.90	0.90	0.31				0.21				0.27		
Methode	Theis	Theis	Theis	Theis	Theis	Theis	Hantush	Theis	Theis	Hantush	Hantush	Hantush	Hantush	Hantush
T (m ² /s)	2.20E ⁻⁰²	9.00E ⁻⁰³	6.00E ⁻⁰³	2.40E ⁻⁰²	2.40E ⁻⁰²	3.70E ⁻⁰²	1.90E ⁻⁰²	3.70E ⁻⁰²	3.70E ⁻⁰²	3.70E ⁻⁰²	3.70E ⁻⁰²	2.30E ⁻⁰²	2.30E ⁻⁰²	2.30E ⁻⁰²
S	5.00E ⁻⁰²	1.00E ⁻⁰²	1.50E ⁻⁰¹	1.20E ⁻⁰²	1.20E ⁻⁰²	1.30E ⁻⁰²	2.30E ⁻⁰²	7.80E ⁻⁰²	5.00E ⁻⁰²	8.00E ⁻⁰²	8.00E ⁻⁰²	8.70E ⁻⁰²	8.00E ⁻⁰²	8.75E ⁻⁰²
Dist. Lim. Etanche (m)	43	43	7	219	256	45	/	45	64	25.06	35	43	44	45
Dist. Lim. Alimentation (m)	170	/	/	364	380	700	/	258	306	/	/	/	/	140

Illustration 17 – Résultats des interprétations du pompage de longue durée de Villeneuve-du-Paréage

Les transmissivités sont de l'ordre de 2.10^{-2} m²/s et sont relativement homogènes quelle que soit la profondeur. Les emmagasinevements sont tous supérieurs à 1% signe que **la nappe est libre, quelle que soit la profondeur testée.**

Il ressort de ces nombreuses interprétations une disposition particulière pour le site de Villeneuve-du-Paréage. En effet, le pompage de longue durée met en évidence une limite étanche prépondérante sur la limite alimentée. Il y aurait donc un système à double limite, l'une étanche (estimée à 45m, soit correspondant au lit du Crieu), l'autre alimentée (généralement estimée à une distance plus importante). Cette deuxième limite, alimentée, peut être interprétée également comme un phénomène de drainance. En effet, il s'agit d'une réalimentation qui impacte le pompage mais l'interprétation ne permet pas de discerner son origine : elle peut être soit latérale (influence du cours d'eau ou présence d'une zone perméable –paléochenaux – à proximité), ou bien il peut s'agir d'une alimentation verticale à travers des niveaux moins perméables (ascendantes ou descendantes). Les simulations réalisées avec la méthode de Hantush qui modélise ce phénomène de drainance ont également donné d'excellents résultats. Toutefois, la description lithologique ne permet pas d'identifier des niveaux semi-perméables et les piézomètres captant les niveaux profonds, s'ils montrent des emmagasinevements plus faibles, ne correspondent pas à des niveaux semi-captifs.

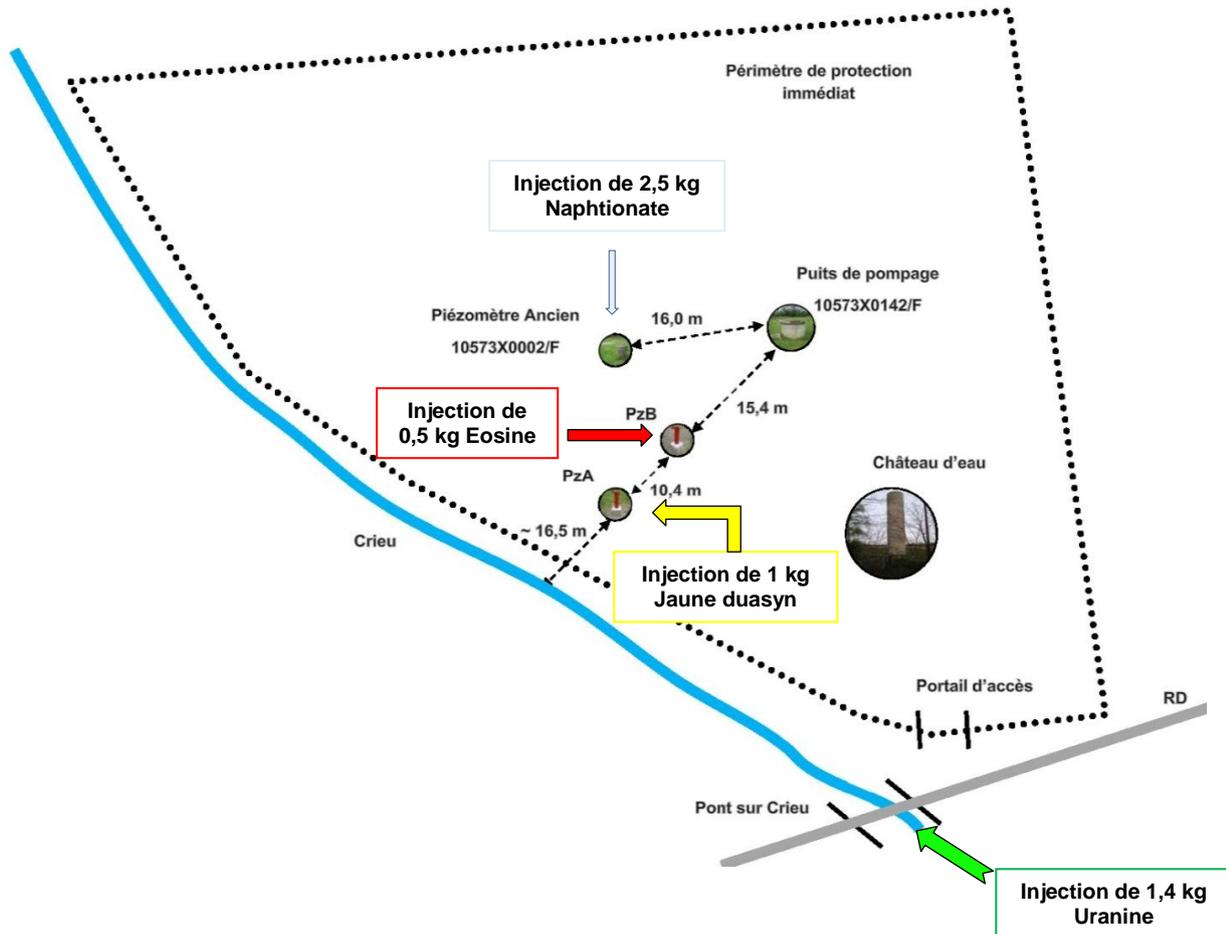
Il est donc vraisemblable que ces effets de limites soient le résultat du positionnement des captages dans un environnement géologique à hétérogénéités horizontales.

Résultats du traçage multiple réalisé à Villeneuve-du-Paréage

Profitant de la mise en œuvre du pompage d'essai de longue durée sur le site de Villeneuve-du-Paréage, un essai de traçage multiple (utilisation de 4 traceurs différents) a été entrepris, les 05 et 06 avril 2013, simultanément au pompage en cours. Cette opération a pour objectif d'améliorer les connaissances sur les caractéristiques hydrodynamiques de la zone (porosité, vitesse d'écoulement de la nappe, etc.). Ces données serviront également dans l'interprétation des résultats obtenus dans le suivi qualitatif mis en place sur les 4 ouvrages du site.

Quatre traceurs fluorescents différents (le naphthionate, le jaune duasyn, l'uranine ou sel sodique de la fluorescéine et l'éosine) ont été utilisés. Les quatre traceurs ont été choisis de telle manière que les risques d'interférences analytiques soient les plus faibles possible.

Les lieux d'injection et de restitution ainsi que les quantités de traceurs employées pour réaliser ce traçage multiple sont récapitulés dans l'illustration 18, sachant que 4 préleveurs automatiques ont été installés pour effectuer les prélèvements des échantillons d'eau.



Traceur	Date Injection	Quantité	Lieu Injection	Zone crépinée (m)	Lieu Restitution	Distance Injection - Restitution
Naphtionate	05/04/2013 18h	2,5 kg	Piézomètre ancien 10573X0002/F	5 - 6	Puits de pompage 10573X0142/F	16 m
Eosine	05/04/2013 19h	0,5 kg	PzB	11 - 13	Puits de pompage 10573X0142/F	15,4 m
Jaune Duasyn	05/04/2013 19h30	1 kg	PzA	8 - 9	Puits de pompage	25,8 m
					PzB	10,4 m
Uranine	06/04/2013 10h53	1,4 kg	Crieu (100m à l'amont du pont)		Puits de pompage	~ 42,3 m
					PzA	~ 16,5 m
					Crieu (80m à l'aval du pont)	80 m

Illustration 18 - Lieu d'injection et de restitution et quantité de traceurs utilisés lors du traçage multiple du site de Villeneuve-du-Paréage

Les résultats obtenus (Illustration 19 et Illustration 20) indiquent des vitesses plus élevées dans le niveau superficiel de l'aquifère et dans le niveau profond tandis que le niveau intermédiaire semble le siège d'écoulements plus lents. Le traçage montre également que les niveaux profonds et intermédiaires (et probablement superficiels) sont en connexion puisque le traceur

injecté à 8m de profondeur est observé lors de son passage dans PzB entre 11 et 13 m. Le panache de traceur occupe donc rapidement toute l'épaisseur de l'aquifère.

Traceur	Dist. (m)	Première apparition (j)	Pic (j)	Temps moyen de séjour(j)	Vitesse max. (m/j)	Vitesse de transit (m/j)	Vitesse moyenne (m/j)	Vitesse apparente (m/j)
Naphtionate (Vx-Pz – superficiel)	16	0,26	0,9	1,1	61	18	15	14
Eosine (PzB – profond)	15	0,19	1,0	1,75	78	15	10	9,0
Jaune duasyn (PzA – intermédiaire)	26	0,61	2,9	4,7	43	8,8	6,4	5,6
Jaune duasyn (PzA – intermédiaire) passage au PzB	10	0,94	2,7	3,2	11	3,7	3,3	3,1

Illustration 19 - Temps et vitesses caractéristiques des traçages de Villeneuve-du-Paréage

Traceur	Injection	Restitution	Distance	Masse injectée (kg)	% de restitution
Naphtionate	VxPz	AEP	16	2,5	80
Eosine	PzB	AEP	15	0,365	70
Jaune Duasyn	PzA	AEP	26	1,0	40
Uranine	Crieu	AEP	43	1,4	0

Illustration 20 - Pourcentages de restitution des traceurs

Les traçages réalisés sur le site de Villeneuve ont permis d'évaluer des vitesses de transfert de 3 à 15 m par jour avec des différences qui semblent être autant ou davantage spatiales que liées à des hétérogénéités verticales. En effet, les différences observées peuvent s'expliquer par l'hétérogénéité des formations alluviales sur le site, notamment en se rapprochant des berges du Crieu. En effet, les vitesses de transit relativement faibles enregistrées aux abords du piézomètre PzA semblent indiquer l'existence d'un niveau moins perméable occasionnant une migration plus lente et moins directe du traceur vers le pompage. Ces observations sont d'ailleurs cohérentes avec les interprétations du pompage d'essai de longue durée mentionnant l'existence d'hétérogénéités horizontales des formations alluviales.

Parallèlement à ces informations, la mise en évidence d'une relation hydraulique entre la rivière Crieu et la nappe alluviale a été recherchée. Pour cela, en bénéficiant des conditions optimales créées par le pompage, un essai de traçage avec une injection d'Uranine dans le Crieu a été entrepris le 06 avril 2013. Le débit d'injection a été réglé, compte tenu de la concentration de la solution injectée (47 g/l) et du débit estimé du Crieu (700 l/s) pour obtenir une concentration, après mélange, proche de 500 µg/l durant 30 mn. Le nuage d'uranine a atteint le point de surveillance (à 150 m du point d'injection) au bout de 3 minutes. La vitesse maximale de transit a donc été de 1 m/s.

Aucune restitution a été observée au sein de la nappe sur les trois points surveillés. En fait, un signal pouvant correspondre à ce traceur a été enregistré en PzB mais il s'agit d'une interférence avec l'éosine, injectée dans ce piézomètre, qui présente des plages de longueur d'onde très proche. Pour cette raison, ce signal n'a pas été pris en compte dans les interprétations.

2.2.2. Suivi de la qualité de l'eau

Pour le site de Villeneuve du Paréage, les premiers résultats obtenus sur la qualité de l'eau montrent d'une part que les eaux souterraines et de la rivière Crieu ont des chimies différentes. Pour les paramètres mesurés *in situ*, le pH est plus basique dans le Crieu que dans les différents forages. La conductivité est également différente selon les points pour une date donnée mais semble également fluctuer au cours du temps (Illustration 21). En ce qui concerne les produits phytosanitaires, les premières mesures sur les eaux souterraines montrent des différences marquées en fonction de la position de la crépine pour les concentrations en ESA métolachlore (Illustration 22). Ainsi les teneurs les plus importantes sont observées au niveau du piézomètre PzB équipé sur la partie la plus profonde de l'aquifère. Bien que les concentrations soient différentes, la tendance générale semble assez similaire pour tous les points avec les teneurs les plus fortes enregistrées le 22/10/2013. Pour toutes les dates, les concentrations d'ESA métolachlore mesurées dans le Crieu sont inférieures à celles des forages.

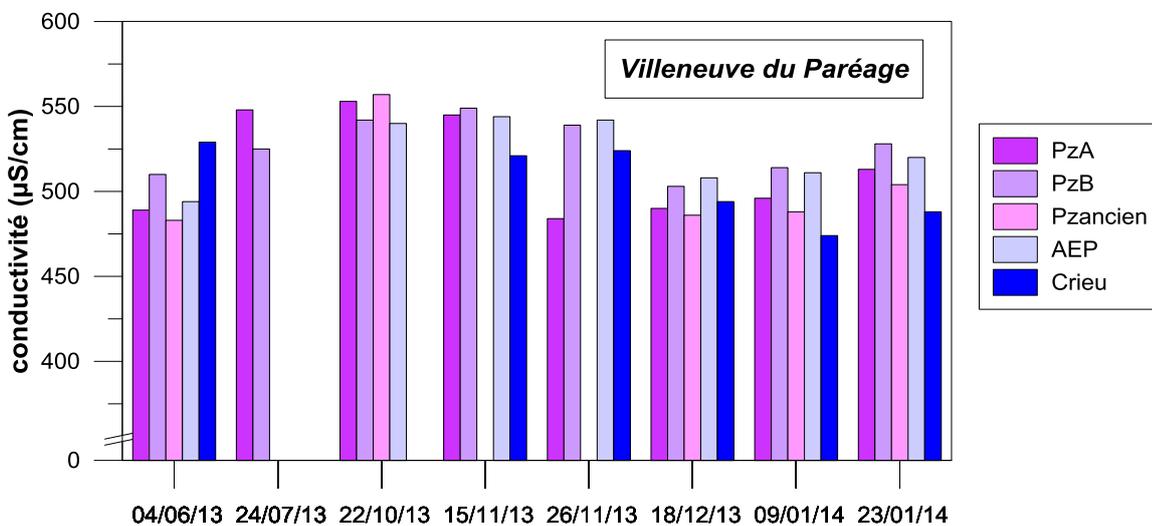


Illustration 21 - Evolution temporelle de la conductivité dans les différents forages du site de Villeneuve du Paréage et du Crieu au droit du site

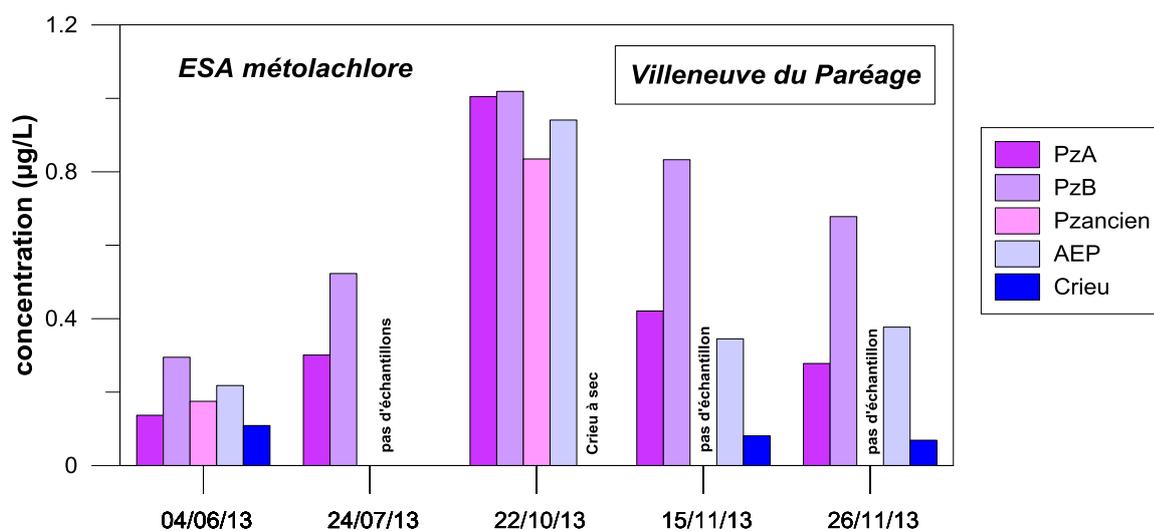


Illustration 22 - Evolution temporelle des concentrations en ESA métolachlore dans les différents forages du site de Villeneuve du Paréage et du Crieu au droit du site

Pour le site de Montaut-Penchenie, les paramètres mesurés *in situ* révèlent une différence entre les eaux souterraines et l'eau de surface (Illustration 23). La conductivité est généralement plus importante pour les eaux souterraines et notamment le PzA captant la partie la plus superficielle de la nappe. Pour les produits phytosanitaires, à titre d'exemple les premières mesures acquises indiquent que les teneurs sont plus importantes dans les piézomètres que dans l'eau de surface. Les plus fortes teneurs sont observées le 22/10/2013 (niveau d'eau le plus bas) pour le PzA et le 15/11/2013 pour le PzC captant la partie la plus profonde de la nappe, après une remontée du niveau piézométrique (Illustration 24).

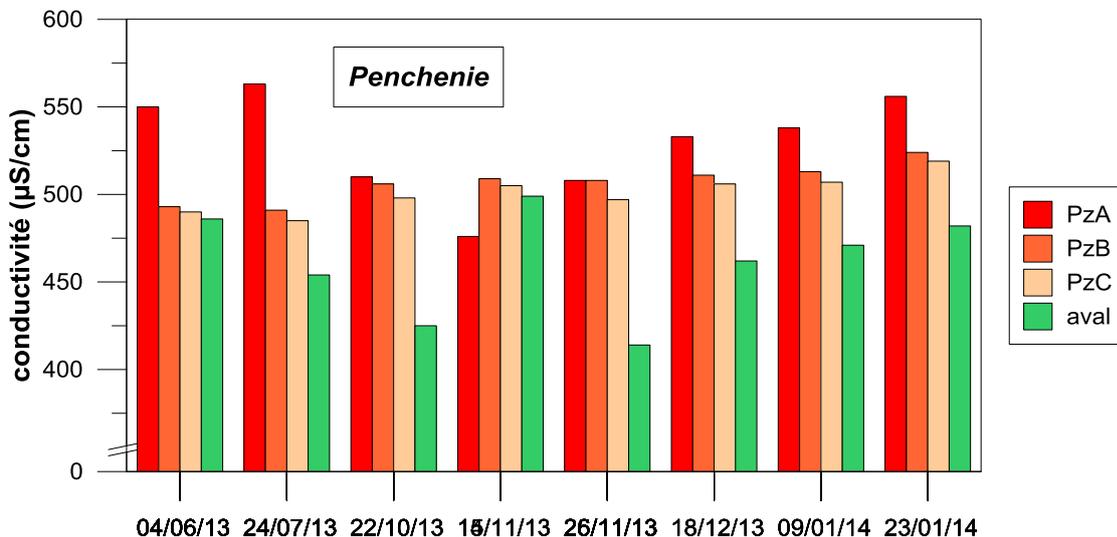


Illustration 23 - Evolution temporelle de la conductivité dans les différents forages du site de Montaut-Penchenie et du fossé noté aval situé à proximité

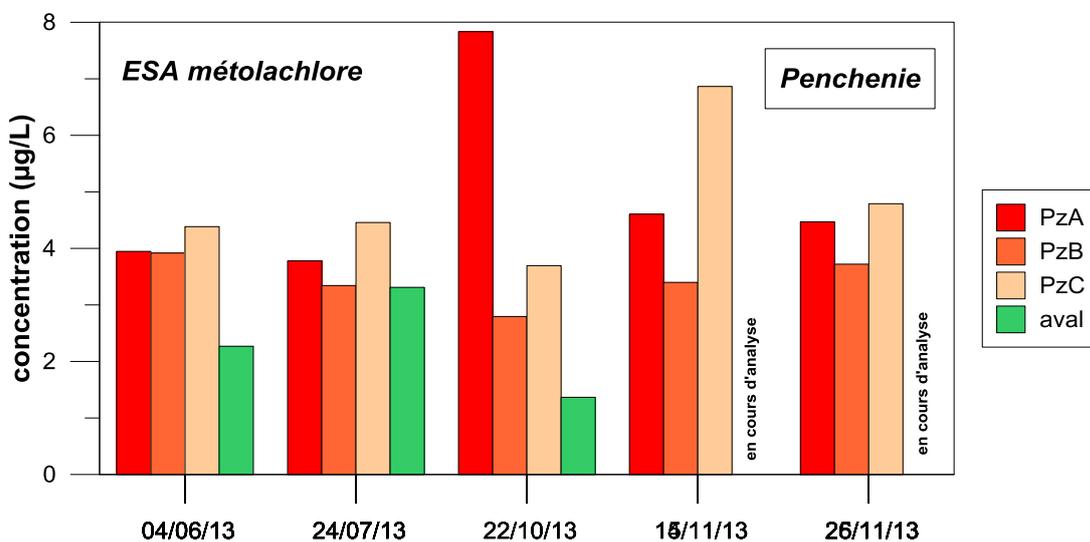


Illustration 24 - Evolution temporelle des concentrations en ESA métolachlore dans les différents forages du site de Montaut-Penchenie et du fossé noté aval situé à proximité

Pour le site de Saverdun réalisé plus tardivement, les prélèvements ont débuté en juillet 2013. Comme pour les autres sites, la conductivité varie entre les points d'eau souterraine et le Crieu mais aussi entre les points d'eau (Illustration 25). Pour les produits phytosanitaires et métabolites, à titre d'exemple, les concentrations en ESA métolachlore dans les eaux souterraines sont variables suivant le piézomètre mesuré et la position de la crépine (Illustration 26). Contrairement à ce qui a été observé au niveau de Villeneuve du Paréage, pour 3 dates, les teneurs en ESA métolachlore sont supérieures dans le Crieu vs. les eaux des forages.

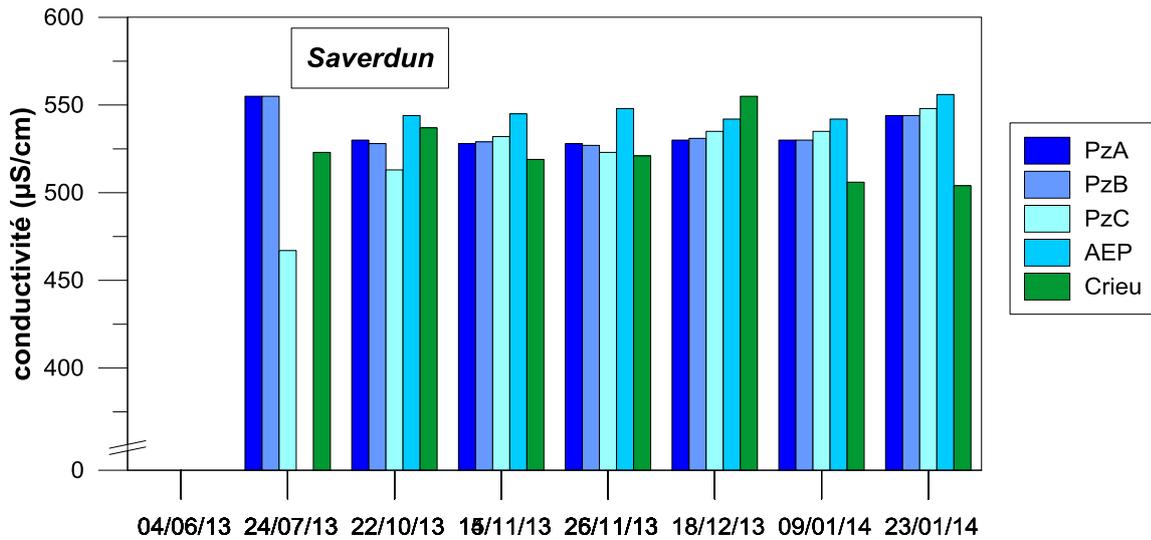


Illustration 25 - Evolution temporelle de la conductivité dans les différents forages du site de Saverdun et du Crieu situé à proximité

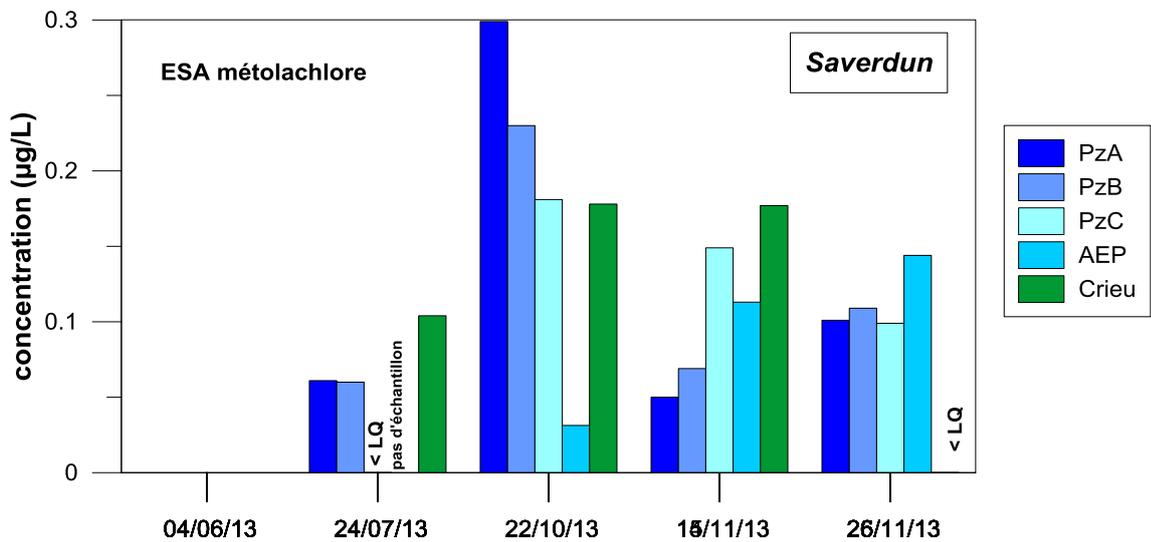


Illustration 26 - Evolution temporelle des concentrations en ESA métolachlore dans les différents forages du site de Saverdun et du Crieu situé à proximité

Brièvement à ce stade, pour les 3 sites équipés en flûte de pans, les premières mesures semblent indiquer que des différences de concentrations peuvent être observées à une date donnée entre la partie superficielle de la nappe et la partie la plus profonde au moins pour certaines molécules, les teneurs les plus importantes n'étant pas nécessairement observées dans la partie supérieure. Conformément à ce qui est observé par ailleurs sur la plaine, les concentrations peuvent fluctuer de façon importante d'une campagne à une autre. La poursuite de l'acquisition de ces données à raison d'une campagne toutes les deux semaines permettra d'enrichir les interprétations et améliorer la compréhension du fonctionnement de la nappe. La mise en évidence de ces différences de concentration est un point clé qui permettra de mieux appréhender la dynamique de transfert des contaminants.

2.2.3. Approche géochimique et isotopique

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 utilisant les outils classiques de l'hydrogéologie mais aussi les outils géochimiques et isotopiques. Les objectifs recherchés sont de mieux comprendre l'impact de l'hydrodynamique sur l'évolution de la qualité de l'eau et de mettre en évidence l'influence d'un compartiment hydrologique sur l'autre (eau de surface-eau souterraine) en termes de qualité des eaux. Pour répondre à ces objectifs plusieurs volets ont été traités à différentes échelles spatiales et temporelles :

- **À l'échelle de la plaine**, la campagne de mesures réalisées en basses eaux (octobre 2012) vise à vérifier si les cours d'eau majeurs impactent la qualité de la nappe ou à l'inverse si la nappe peut impacter la qualité des cours d'eau principaux.
- **A l'échelle d'un sous-secteur « modèle réduit de la nappe »**, la campagne spatiale de juin 2013 réalisé dans le secteur dit « Les Pujols » vise à caractériser les éventuelles relations entre les différentes terrasses alluviales et les relations eau souterraine/eau de surface et eau de surface/eau souterraine.
- **A l'échelle de 2 sous-secteurs**, (Secteur Gappia – Les Pujols et Secteur Penchenie - Montaut), un suivi hebdomadaire d'octobre 2012 à octobre 2013 permet de compléter l'examen des relations eau de surface-eau souterraine.

A l'échelle de la plaine

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 27). 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 Saplairoles, 2012).

Brièvement pour la campagne spatiale d'octobre 2012, l'examen du rapport isotopique en fonction de la concentration en strontium (Illustration 28) montre que l'Ariège et l'Hers vif ont des signatures très contrastées entre elles et que pour un cours d'eau donné, les différences amont-aval sont peu marquées comparativement à la gamme des valeurs observées lors de cette campagne de mesure. La différence observée entre l'Ariège et l'Hers Vif est attribuable à la différence de leur origine (hors de la plaine) et au fait que ces cours d'eau drainent notamment des secteurs aux caractéristiques géologiques différentes.

Le Raunier, cours d'eau autochtone de la plaine prenant naissance et circulant au sein des basses terrasses a également une signature différente, signature assez peu variable d'amont en aval (RP9, RP7, RP5) même si les différences sont significatives. Le Raunier a une signature comparable à celles d'autres points de suivi en eaux souterraines (117, 201, 224, 301) également situés en basse terrasse. La basse terrasse est donc caractérisée par un rapport isotopique élevé.

Dans sa partie aval, l'Hers Vif montre un rapport isotopique plus élevé (point 506) que dans sa partie amont et centrale. Ce point de mesure aval se trouve à l'aval de la confluence Hers Vif-Raunier ou d'autres cours d'eau autochtones drainant la basse terrasse. La contribution de ces cours d'eau ou d'eau souterraine alimentant l'Hers pourrait expliquer cette variation du rapport isotopique de l'amont vers l'aval.

A l'inverse, le rapport isotopique varie peu d'amont en aval sur l'Ariège ne permettant pas de montrer une éventuelle contribution de ses affluents ou d'un drainage de la nappe, ce qui s'explique principalement en raison des importants débits de cette rivière (débit moyen inter-annuel de 39,7 m³/s à Foix contre 7,01 m³/s pour l'Hers Vif à Roumengoux).



Illustration 27 - 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

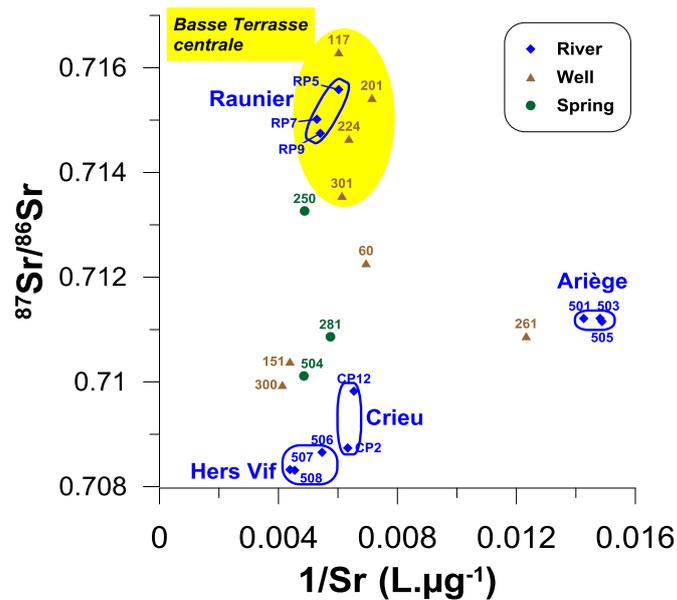


Illustration 28 - Rapport isotopique ⁸⁷Sr/⁸⁶Sr vs. 1/Sr pour les échantillons collectés en octobre 2012

Comparativement aux autres eaux de surface, le Crieu montre plus de variabilité entre l'amont et l'aval. En effet, le Crieu se perd localement et renaît plus à l'aval, témoignant d'une contribution importante de l'eau souterraine dans ce secteur qui peut être plus modérée dans la partie amont. Pour les points de suivi des eaux souterraines, le point 261 présente une signature assez proche de l'Ariège, suggérant une relation eau de surface-eau souterraine. Cette hypothèse avait déjà été évoquée lors des études précédentes notamment sur la base de l'étude des isotopes stables de la molécule d'eau.

A l'échelle d'un sous-secteur « modèle réduit de la nappe »

Le sous-secteur Gappia-Les Pujols (Illustration 29) peut être considéré comme un modèle réduit de la nappe alluviale de l'Ariège. En effet, sur une surface relativement réduite (environ 30 km²), les différentes terrasses alluvionnaires sont représentées selon un système en étagement. Ainsi, les moyennes terrasses, les basses terrasses et les alluvions de basses plaines sont identifiées sur le sous-secteur. De plus, des affleurements de molasse (ou situés proches de la surface sous les colluvions) sont présents en limite entre les terrasses et/ou apparaissent dans le lit de certains cours d'eau. Afin de caractériser les échanges eau souterraine-eau de surface, une campagne de prélèvements a été réalisée en juin 2013 suite à une période de plusieurs jours consécutifs sans pluie (de façon à avoir une contribution limitée du ruissellement direct dans les eaux de surface). Différentes mesures et analyses ont été effectuées dont la mesure des paramètres physico-chimiques in situ, l'analyse des teneurs en produits phytosanitaires, celle de la concentration en strontium ainsi que le rapport isotopique en strontium. Parallèlement une campagne de jaugeages a été réalisée afin d'estimer les débits transitant dans les cours d'eau et à les corréler aux résultats des analyses isotopiques.

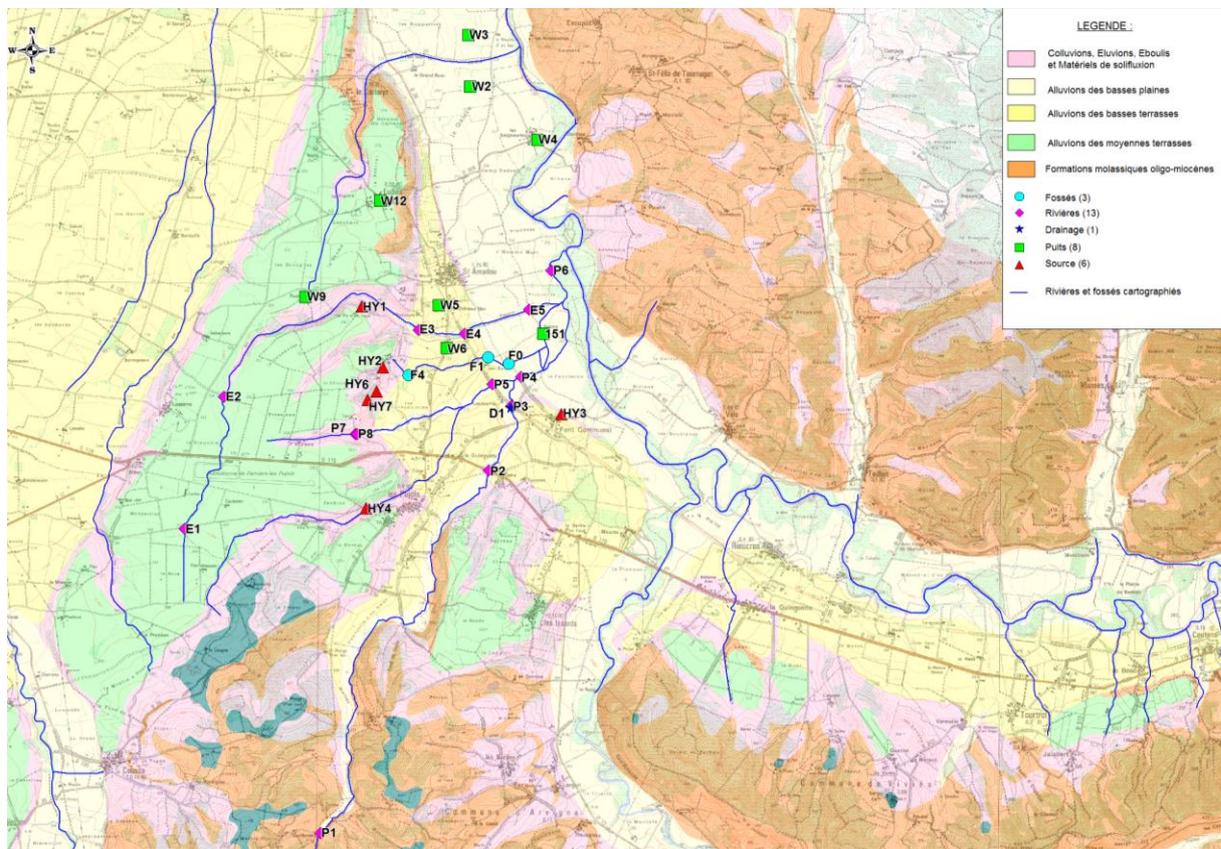


Illustration 29 - Localisation des points de prélèvements– sous secteur de Gappia-Les Pujols – Campagne Juin 2013

Les points d'eau échantillonnés (31 au total) correspondent à des sources résurgences d'eau souterraine) notées HY sur la carte de l'illustration 29, des puits, notés W, des cours d'eau plus ou moins pérennes et des fossés. Ainsi l'Egassier et le Payroulier (échantillons nommés E et P respectivement) sont des cours d'eau pérennes alors que les échantillons notés F ont été prélevés dans un fossé (remontée de Gappia).

Lors de la campagne de juin 2013, l'acquisition des paramètres in situ montre que la conductivité a tendance à augmenter de l'amont vers l'aval sur l'Egassier (Illustration 30) mais aussi sur les autres cours d'eau. Pour les eaux souterraines, les sources drainant les moyennes terrasses et colluvions ont une conductivité inférieure à celles mesurées dans les puits des basses terrasses et basses plaines.

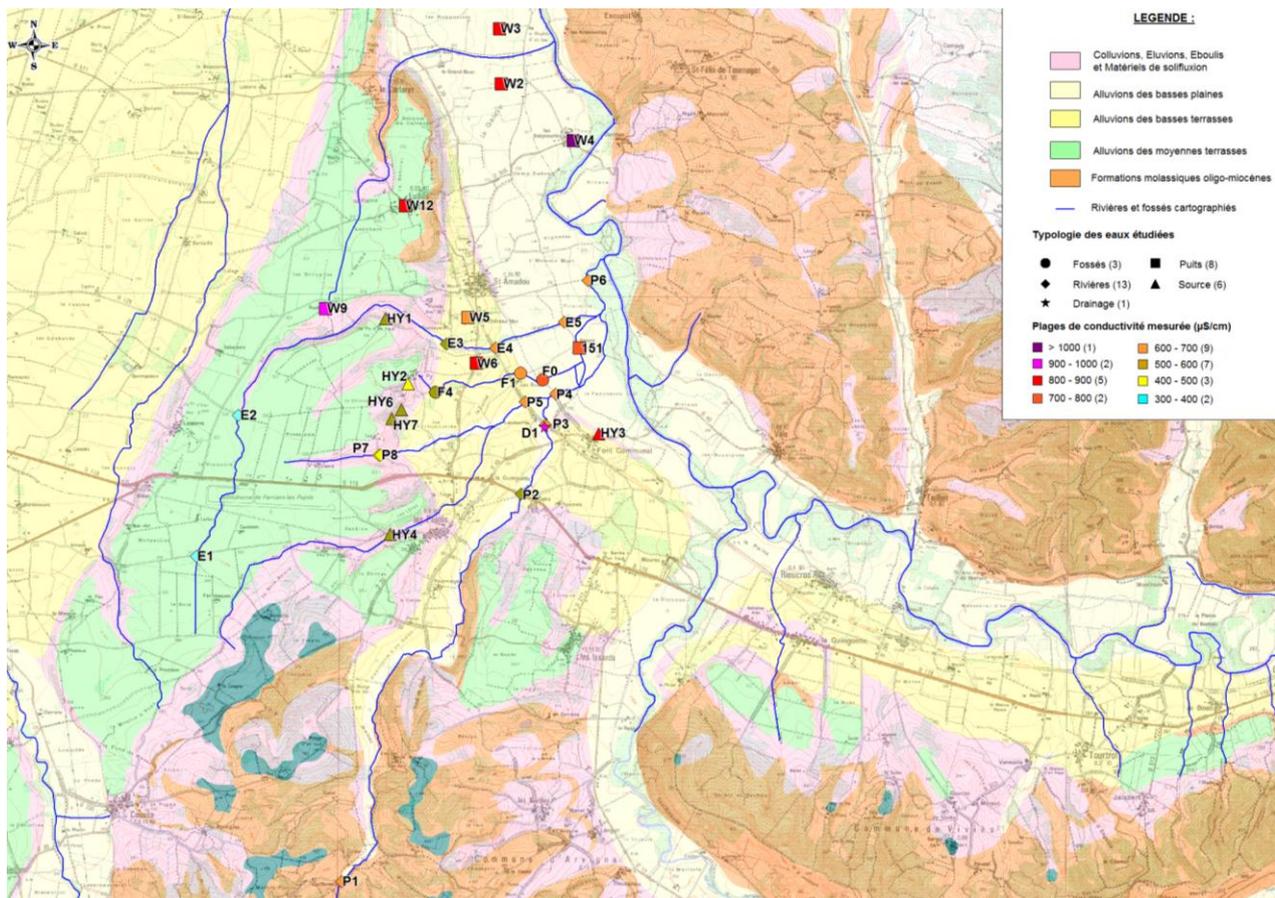


Illustration 30 - Conductivité mesurée aux points de prélèvements– sous secteur de Gappia-Les Pujols – Campagne Juin 2013

Pour les teneurs en nitrate, une forte variabilité est observée avec une différenciation marquée entre les eaux de surface et les eaux souterraines (Illustration 31). Les échantillons d'eaux de surface ont des valeurs comprises entre 50 mg/L et inférieures à la limite de quantification (de 0,5 mg/L), avec une moyenne des teneurs d'environ 26 mg/L. Ainsi, les rivières Egassier et Payroulier montrent une augmentation des teneurs depuis l'amont vers l'aval, le Payroulier étant globalement moins contaminé (valeurs mesurées n'excédant pas les 25 mg/L). Les échantillons d'eaux souterraines présentent des valeurs beaucoup plus élevées, comprises entre 43 mg/L et 148 mg/L, soit une moyenne d'environ 90 mg/L. Une différenciation est à noter entre les sources provenant des moyennes terrasses ayant des teneurs globalement plus faibles que les eaux souterraines collectées dans les ouvrages implantés dans les basses terrasses et basses plaines (hormis pour le puits n°151).

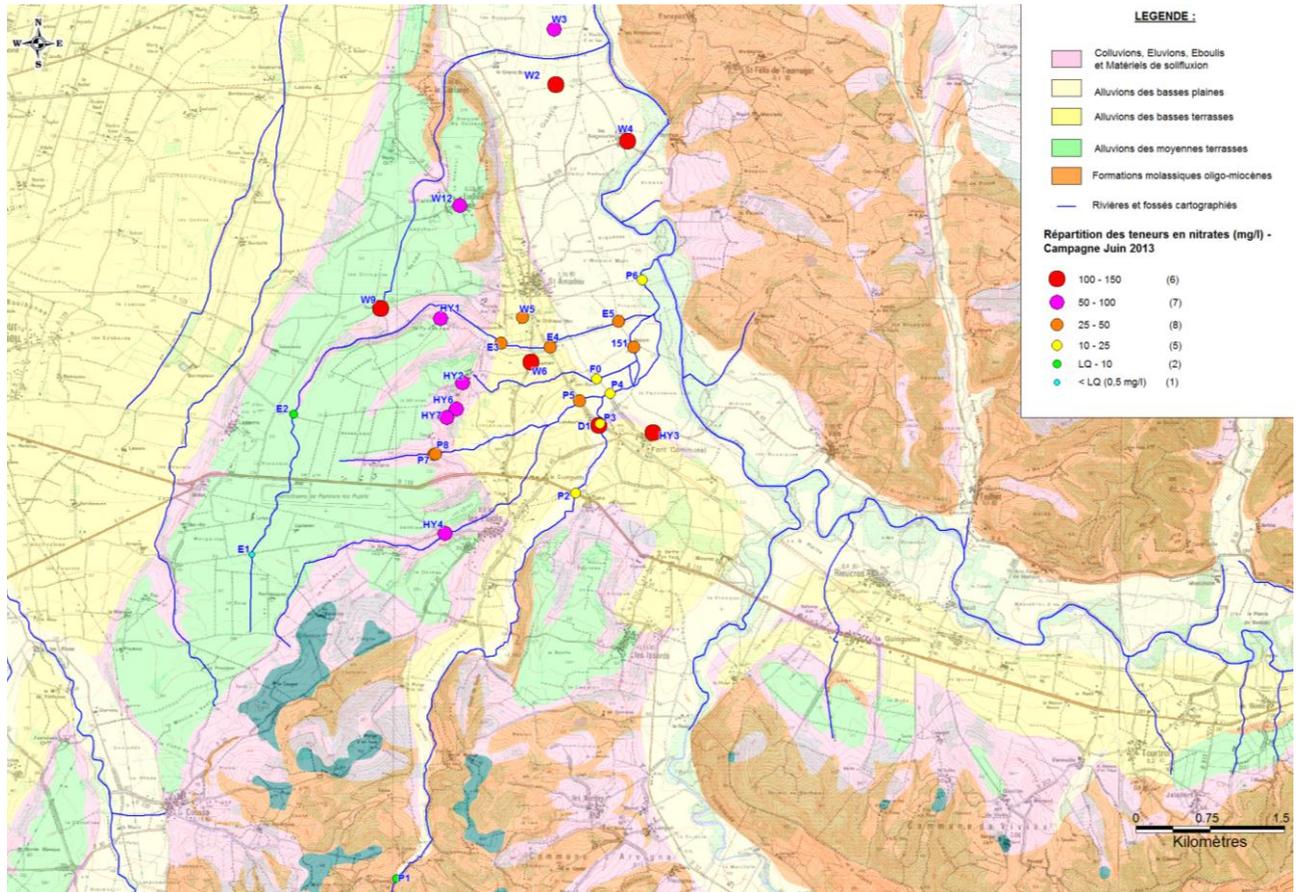


Illustration 31 - Teneurs en nitrates aux points de prélèvements – sous secteur de Gappia-Les Pujols – Campagne Juin 2013

En ce qui concerne le métolachlore et ses métabolites (Illustration 32), pour la plupart des points de mesure, l'ESA métolachlore apparaît comme la molécule prépondérante à l'exception du point d'eau souterraine W2 (où il s'agit du métolachlore). Pour les différentes molécules, les teneurs sont fortement variables de valeurs inférieures à la limite de quantification à plusieurs $\mu\text{g/L}$. Schématiquement les plus fortes concentrations sont plutôt observées pour les eaux souterraines collectées dans les basses plaines. La partie sud du secteur (échantillons P1 et P2 sur le Payroulier) est peu impactée par ces molécules, comme cela a également été observé pour les nitrates.

En complément des mesures de métolachlore, l'acétochlore (un autre herbicide potentiel utilisé sur maïs) et ses métabolites ont également été recherchés (Illustration 33). L'ESA acétochlore apparaît comme la molécule la plus quantifiée des 3 mais avec des teneurs globalement plus faibles que l'ESA métolachlore sans doute du fait d'un usage moindre de l'acétochlore vs. le métolachlore. Par ailleurs, contrairement à l'ESA métolachlore, sur les 11 détections obtenues l'ESA acétochlore a seulement été mesuré sur 2 points de suivi en eaux souterraines. L'impact de cette molécule est majoritairement observé sur l'axe d'écoulement de la rivière Egassier

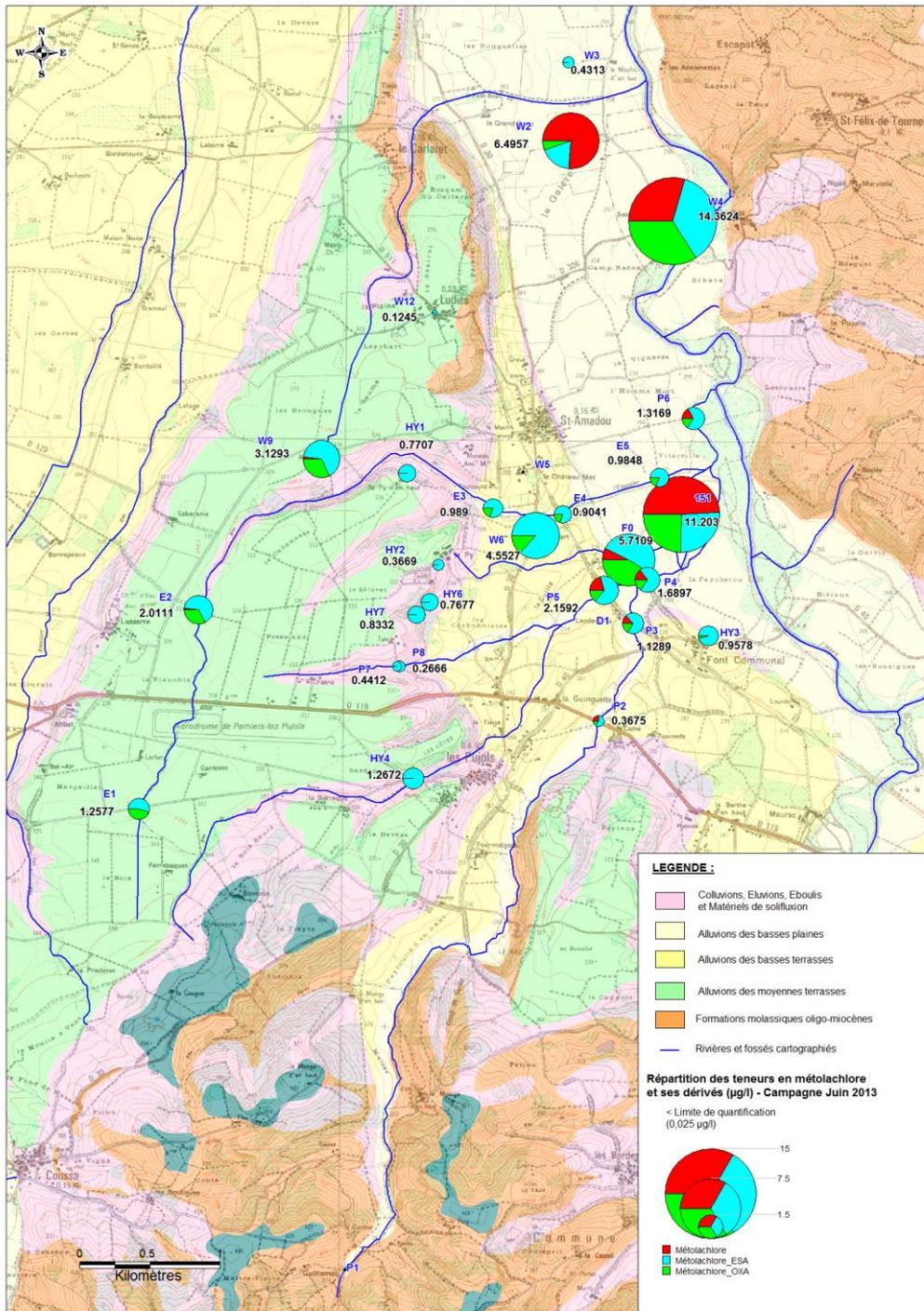


Illustration 32 - Teneurs en métolachlore et métabolites ESA et OXA aux points de prélèvements de juin 2013 – sous secteur de Gappia-Les Pujols

Pour les chloroacétanilides, des potentiels usages récents pourraient expliquer la présence de la molécule mère dans les eaux de surface. Des circulations rapides entre les eaux de surface et les eaux souterraines pourraient expliquer les teneurs mesurées dans les eaux souterraines. Cette hypothèse reste évidemment à tester.

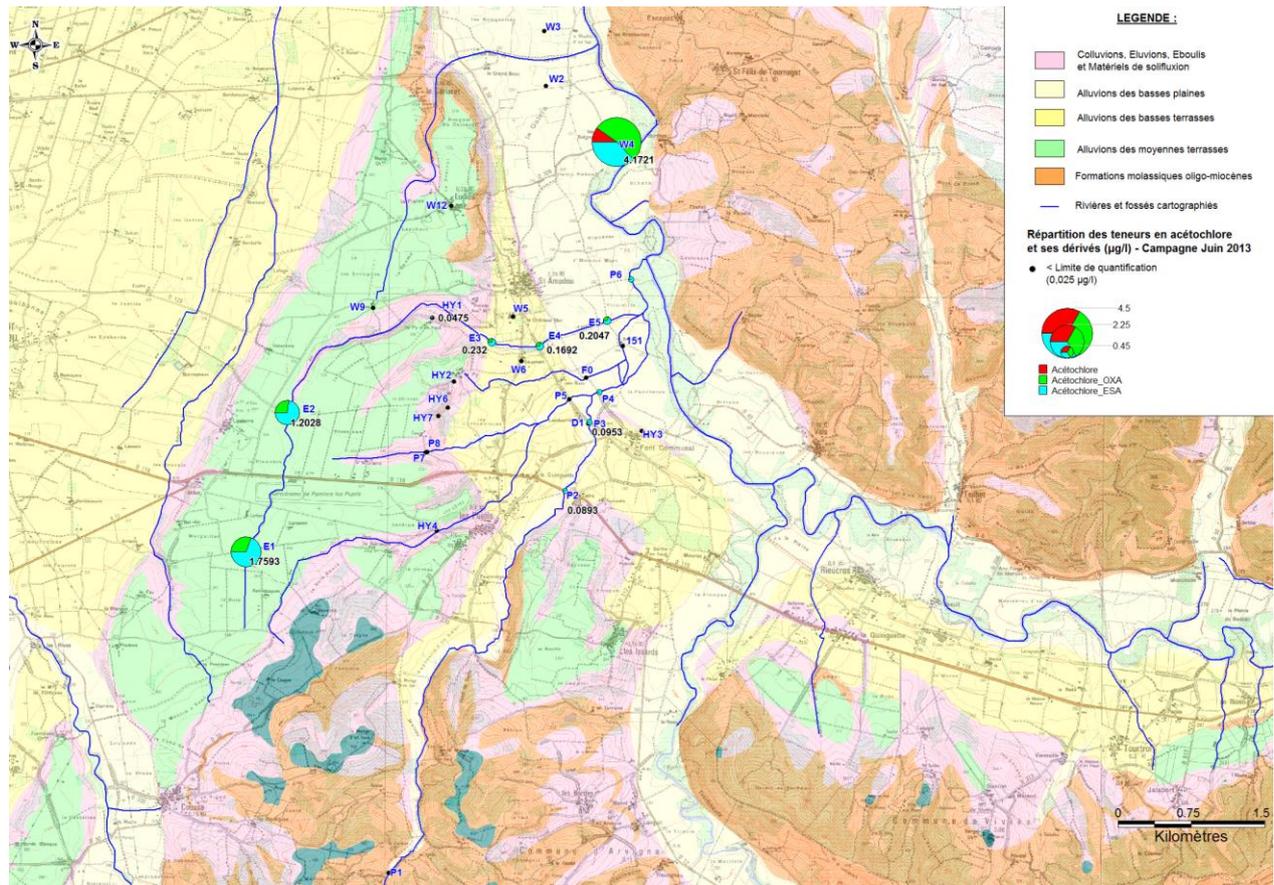


Illustration 33 - Teneurs en acétochllore et métabolites ESA et OXA aux points de prélèvements de juin 2013 – sous secteur de Gappia-Les Pujols

Pour une molécule qui n'a plus d'usage autorisé (atrazine), le métabolite DEA est prédominant (Illustration 34). Contrairement aux chloroacétanilides, les teneurs décroissent d'amont vers l'aval. Ainsi les sources situées au sein des colluvions (HY1, HY2, HY7 et HY4) ont des teneurs de l'ordre de 0.03 à 0.1 µg/L en DEA qui diminuent le long des cours d'eau. A l'exception des points W12 et HY1, les eaux souterraines ont globalement des concentrations inférieures à la limite de quantification. Ce résultat est cohérent avec un arrêt des usages. Il souligne toutefois la continuation du transfert de la DEA.

L'examen du rapport isotopique $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ vs. le rapport des concentrations Na/Sr (Illustration 35) permet d'appréhender les variations spatiales de chimie. Ainsi, P1, P2 et P3 localisés sur le Payroulier constitue un premier groupe de points avec le rapport isotopique et le rapport de concentrations les plus faibles. Ils pourraient correspondre à la signature des basses terrasses. A l'opposé, se trouvent les points d'eau souterraine captant les moyennes terrasses (W9 et W12) ainsi que les sources issues de ces moyennes terrasses situées au sein des colluvions.

P7, P8 et P5 montre une diminution du rapport isotopique lors du déplacement vers l'aval qui se poursuit avec P4. La contribution des eaux provenant des basses terrasses pourrait expliquer l'évolution de cette signature. Pour l'Egassier, en E1, E2 et E3 la rivière s'écoule sur les moyennes terrasses puis sur les colluvions alors qu'en E4 elle traverse la basse terrasse et en E5 la basse plaine. Les signatures de ces deux derniers points restent proches de celle mesurée en E3 laissant suggérer un faible apport des eaux souterraines à la rivière sur ce tronçon.

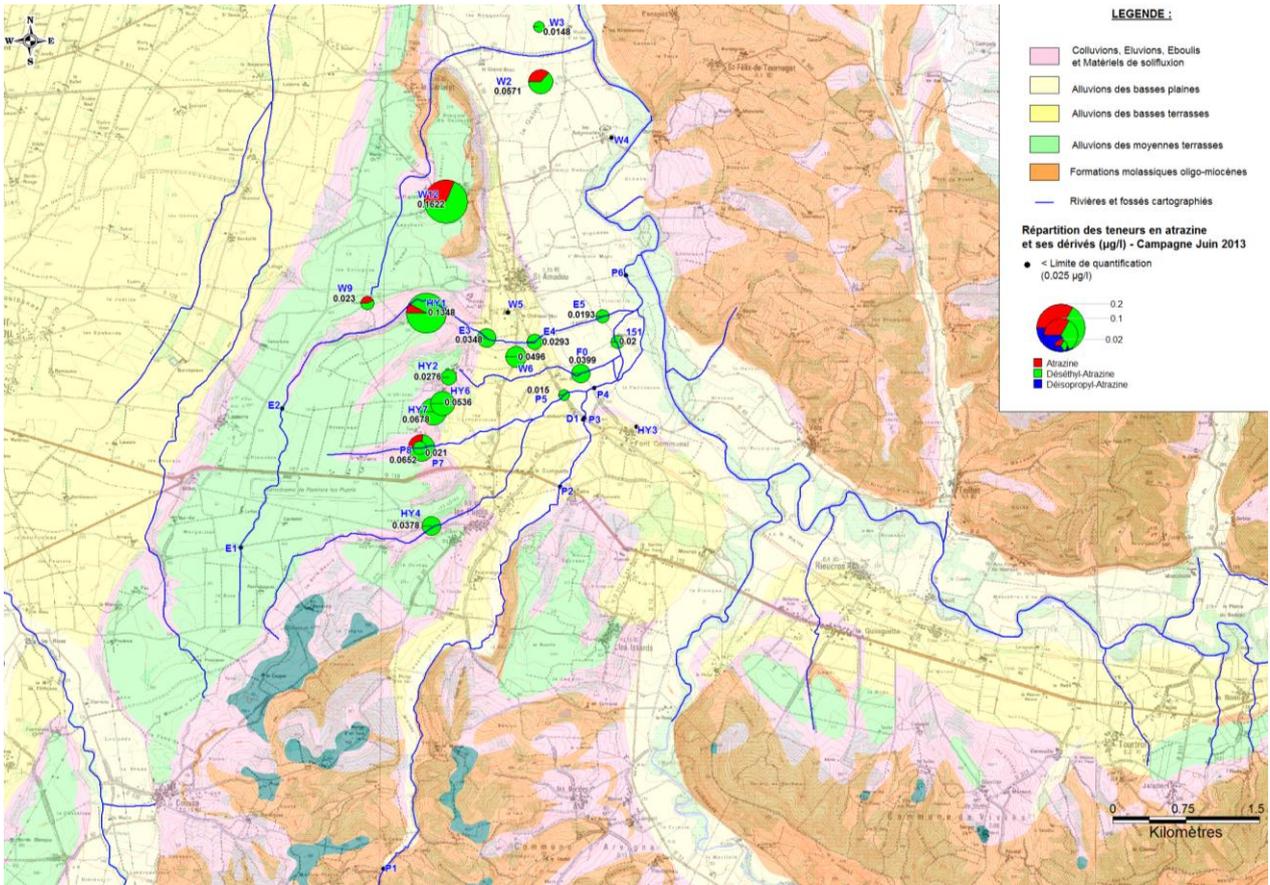


Illustration 34 - Teneurs en atrazine et métabolites DEA et DIA aux points de prélèvements de juin 2013 – sous secteur de Gappia-Les Pujols

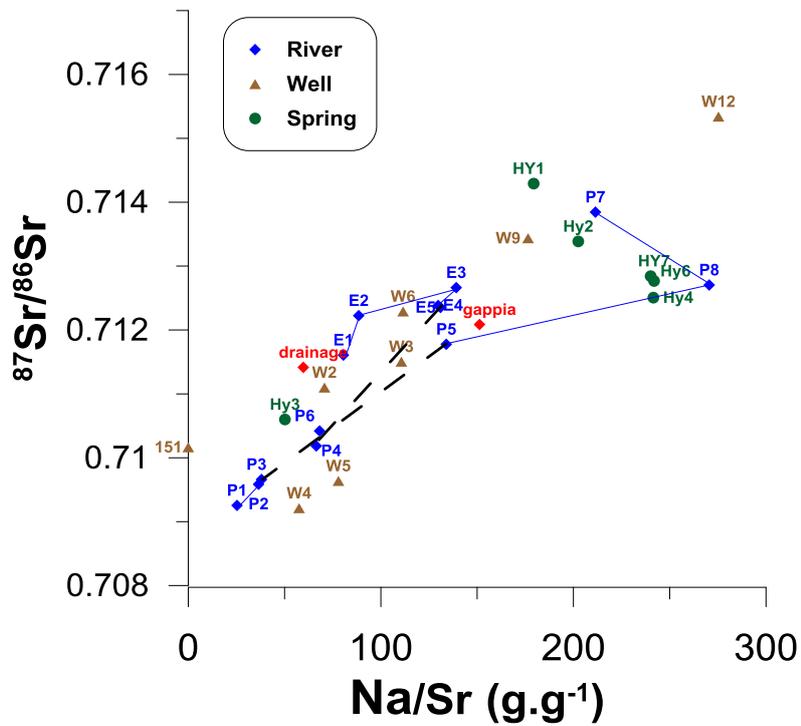


Illustration 35 - Rapport isotopique du strontium vs. le rapport Na/Sr pour les points de prélèvements de juin 2013 – sous secteur de Gappia-Les Pujols

Le point P6 se trouve après la confluence de l'Egassier et du Payroulier. Sa signature est plus proche de celle du Payroulier vs. Egassier, ce qui se corrobore parfaitement avec les données des jaugeages réalisés, puisque la majorité du débit est apportée par le Payroulier (plus de 340 m³/h contre environ 40 m³/h mesurés sur l'Egassier). Ces données expliqueraient également pourquoi les teneurs en nitrate en P6 sont assez faibles (24.9 mg/L) et proches de P4 (23.5 mg/L) au regard de celles de E5 (34.8 mg/L).

A l'échelle de 2 sous-secteurs : Secteur Gappia – Les Pujols et Secteur Penchenie – Montaut

Deux puits (117 et 151), affiliés au suivi mensuel de la qualité des eaux souterraines depuis le projet TRANSPOLAR, révèlent des teneurs très importantes en produits phytosanitaires et en métabolites dans leurs eaux, en comparaison avec les autres ouvrages suivis. Il a donc été décidé d'effectuer un suivi détaillé autour de ces points sur des sous-secteurs en augmentant la fréquence d'analyses et de relevés in situ.

Le puits 151 capte la nappe contenue dans les alluvions de la basse plaine de l'Hers Vif. Elle présente des variations de niveau comprises entre 0,45 et 1,40 m sur une année. Son alimentation est assujettie aux apports pluviométriques et dans une moindre mesure au déversement des nappes des terrasses sus-jacentes, en l'occurrence ici les basses terrasses et la moyenne terrasse (Illustration 37). En effet, de nombreuses sources issues des moyennes terrasses et situées au sein des colluvions donnent naissance et/ou alimentent les fossés et les rivières. Sur ce secteur, la basse terrasse est en continuité hydraulique avec la basse plaine. Certains fossés et rivières drainent également la nappe.

Le puits 117 est situé au sein des alluvions de la basse terrasse où la nappe enregistre un battement d'environ 1,50 m sur une année. Sur ce secteur, l'alimentation de la nappe se fait principalement par les précipitations. De nombreux fossés de drainage, dont certains sont particulièrement profonds, mis en place dans les années 70, quadrillent le territoire. Ces fossés pour la plupart en eau durant toute l'année sont probablement alimentés par la nappe alluviale reconnue à une faible profondeur dans ces secteurs.

Concernant le secteur de Montaut, le fossé étudié, dénommé Penchenié aval, situé à proximité du puits 117 (environ 650 m de distance) correspond à la confluence de plusieurs autres fossés prenant tous naissance dans la basse terrasse de l'Ariège (Illustration 36). Il participe en aval à l'écoulement de la rivière le Raunier, ce dernier étant un affluent de l'Hers Vif.

Pour le secteur correspondant au puits 117, six points de mesures sont considérés. Il s'agit de :

- RP3 et Carrière, correspondant à deux des fossés alimentant Penchenié aval situés à environ 750 m en amont de ce dernier,
- Penchenié gauche (en aval de RP3) et Penchenié droite (en aval de Carrière), situés juste en amont de Penchenié aval,
- Penchenié aval, situé à 650 m du puits 117, et
- le puits 117.

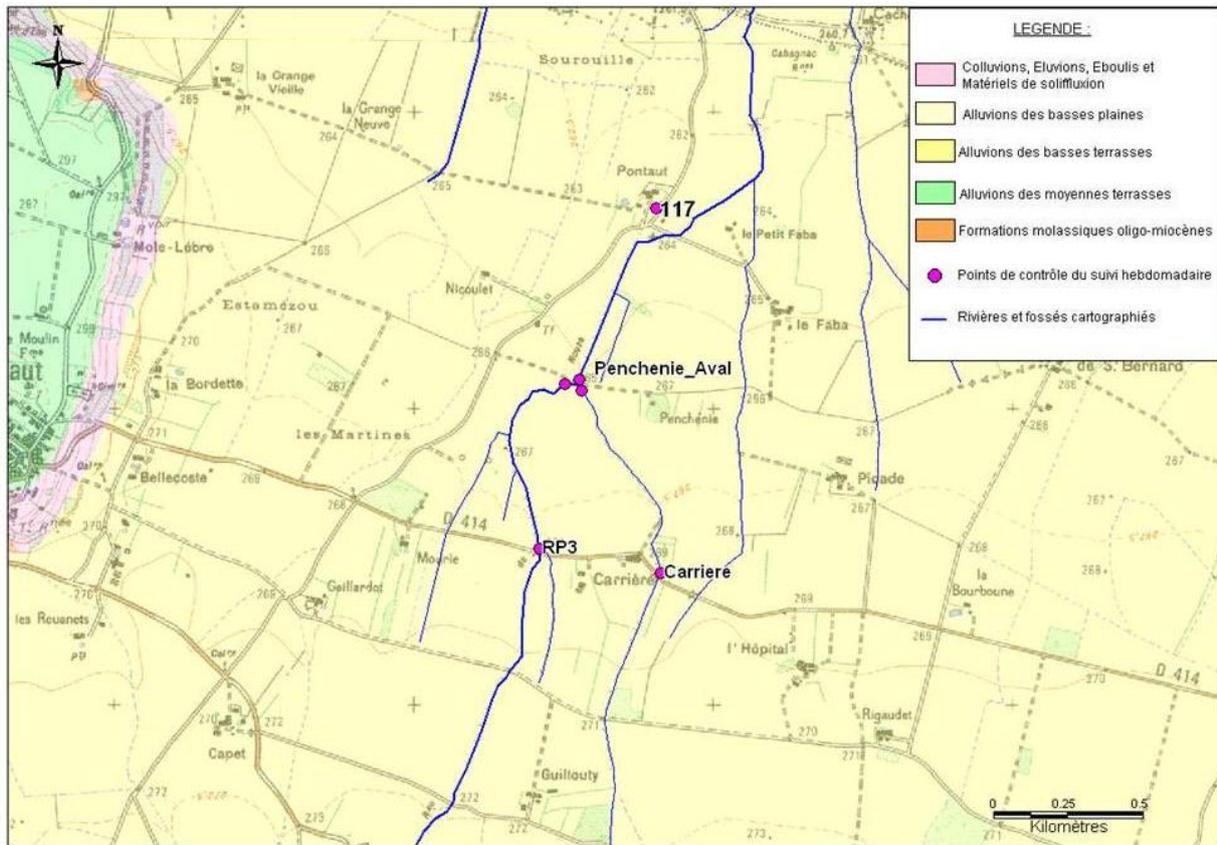


Illustration 36 - Localisation des points de suivis du sous-secteur Montaut-Penchenie

Pour le secteur correspondant au puits 151, dix points de mesures ont été pris en compte (Illustration 37). Il s'agit de

- D0, l'exutoire d'un drain agricole situé à moins de 900 m en amont du puits 151
- P0 et P1, deux points de suivi de la rivière Payroulier, situés respectivement à 20 m et à 300m en aval du drainage agricole,
- la source du lavoir de Py, provenant de la moyenne terrasse et alimentant le fossé dénommé Gappia, située à moins de 2 km du puits,
- F4, F3, F2, F1 et F0, correspondants à 5 points de suivi au niveau du fossé Gappia, et
- le puits 151, situé à 500 m en aval du point F0.

La spécificité de ce fossé est qu'il est régulièrement à sec en aval du point F0 jusqu'à la confluence avec la rivière Egassier en période de moyennes et hautes eaux.

En terme de chimie, le secteur de Les Pujols est le plus étudié (Illustration 37). Les acquisitions se poursuivent et l'interprétation complète des données est prévue en année 3 du projet.

A ce stade, plusieurs observations peuvent toutefois être mentionnées. En ce qui concerne la conductivité, il apparaît que la source de Py présente des eaux avec une conductivité assez faible (de l'ordre de 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$) avec peu de fluctuations au cours de l'année. Cette gamme de valeurs est en adéquation avec celles mesurées au niveau des autres sources identifiées et analysées lors de la campagne isotopique et chimique de juin 2013 (Illustration 30).

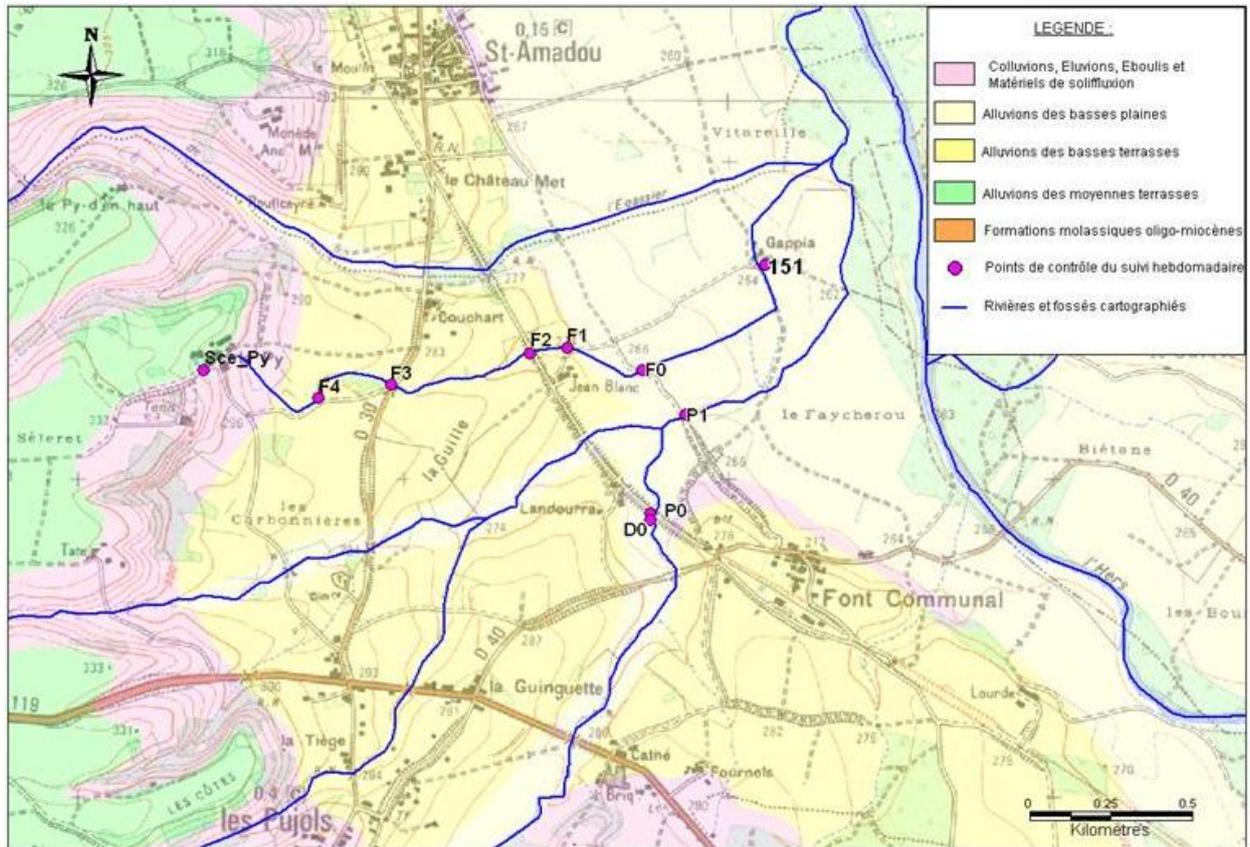


Illustration 37 - Localisation des points de suivis du sous-secteur Les Pujols-Gappia

		Analyse majeurs et produits phytosanitaires	Mesures paramètres physico-chimiques
Secteur de Les Pujols	151	X	X
	F0	X	X
	F1 - F4		X
	Sce du Py	X	X
	D0	X	X
	P0	X	X
Secteur de Montaut	P1	X	X
	117	X	X
	Penchenié aval	X	X
	Penchenié gauche		X
	Penchenié droite		X
	RP3		X
	Carrière		X

Illustration 38 - Liste des analyses et mesures effectuées sur les 2 sous-secteurs

Pour le secteur de Penchenie, il apparait que les paramètres de terrain et notamment la conductivité fluctuent de manière similaire au niveau du fossé Penchenie et ses deux affluents au niveau de RP3 et Carrière (Illustration 39).

A noter, la très forte valeur de conductivité observée sur ces 3 points le 12 décembre 2012. Compte-tenu des similitudes dans les évolutions, les mesures effectuées à Penchenie peuvent être considérées comme représentatives du secteur ; et servir de référence pour les eaux de surface.

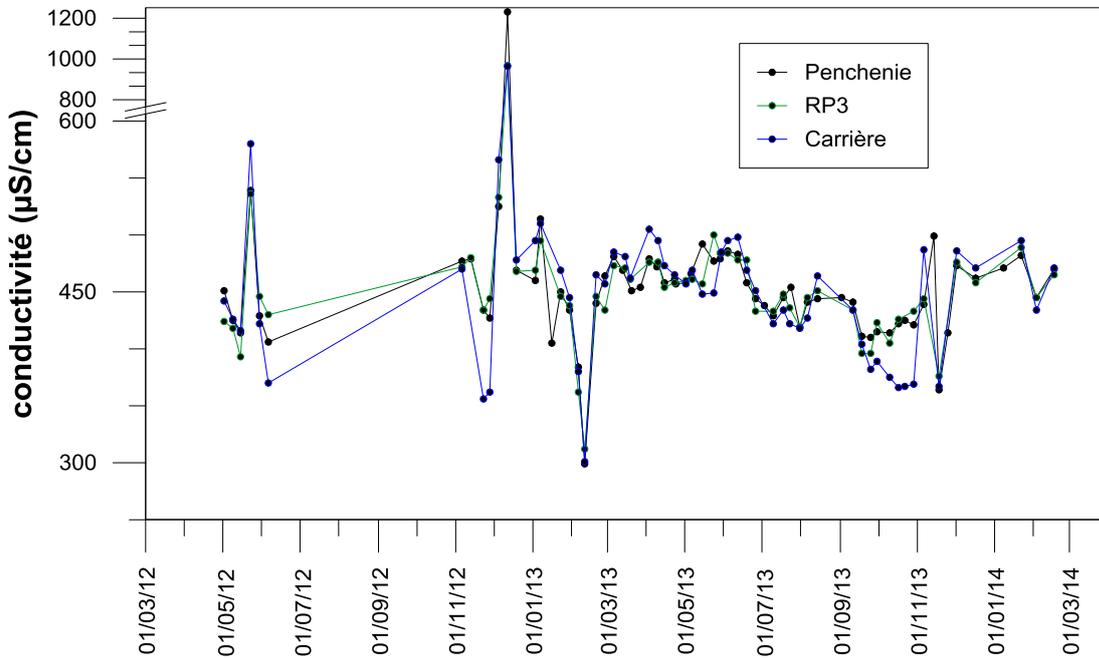


Illustration 39 - Evolution de la conductivité au niveau du fossé Penchenie et à l'amont au niveau de RP3 et Carrière

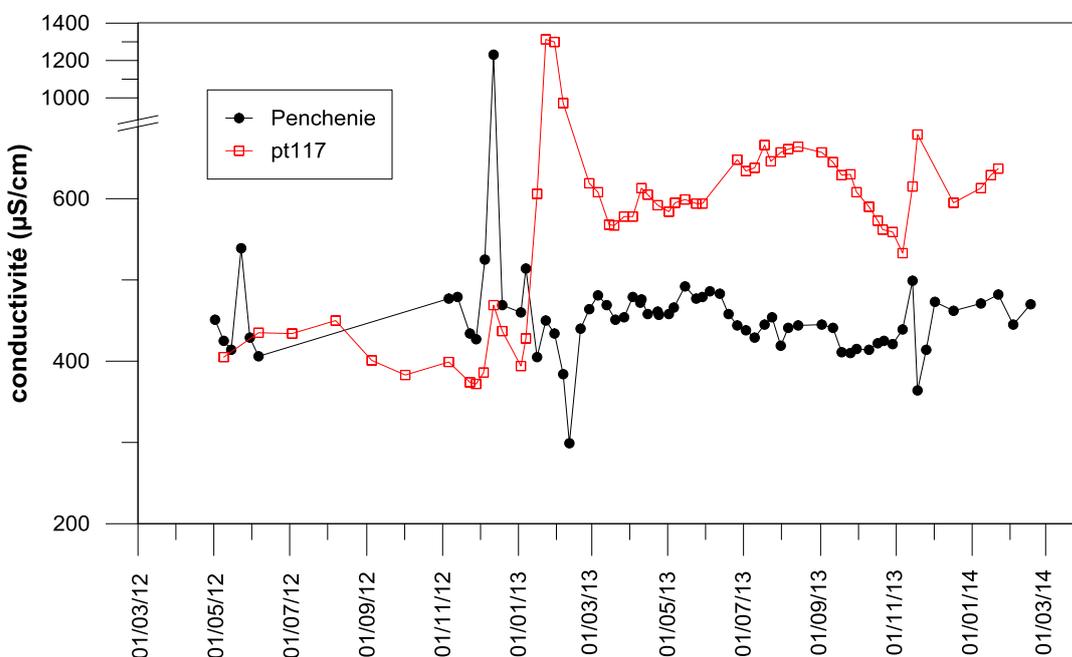


Illustration 40 - Evolution de la conductivité à Penchenie et au point 117 – suivi hebdomadaire

La comparaison avec les données du site 117 (Illustration 40), semble indiquer des évolutions assez similaires entre les eaux du fossé et les eaux souterraines mais avec un décalage temporel de l'ordre du mois. Ainsi les fortes conductivités mesurées en décembre 2012 à Penchenie sont observées en janvier au puits 117. La poursuite des mesures va permettre de confirmer si effectivement les tendances sont comparables et si le décalage temporel pourrait être lié à une épaisseur de zone non saturée plus importante au niveau du puits 117 qu'aux abords de Penchenie. De la même façon, le suivi des produits phytosanitaires permettra de mieux comprendre le fonctionnement de sous-secteur. A ce stade, en utilisant les concentrations en ESA métalachlore (molécule la plus quantifiée sur ces 2 points - Illustration 41), des similitudes sont observables et pourraient servir de marqueurs. En revanche, les fortes teneurs en MESA observées au puits 117 début 2013 ne sont pas visibles à Penchenie. Ces divergences restent à expliquer.

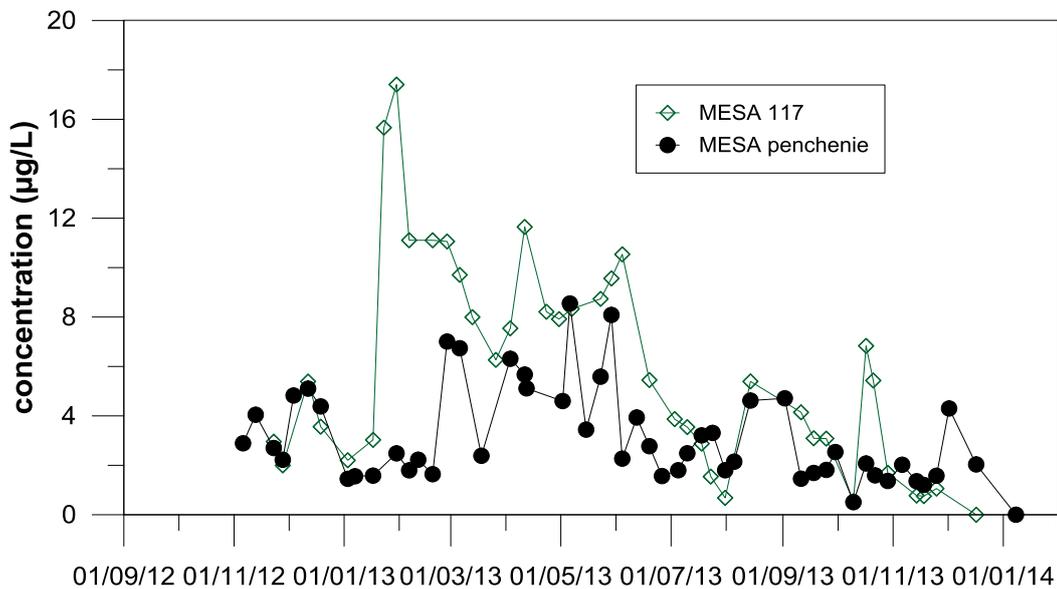


Illustration 41 : Evolution des teneurs en ESA métalachlore à Penchenie et au puits 117 – suivi hebdomadaire

Pour le sous-secteur Gappia – Les pujols, le puits 151 présente une conductivité qui fluctue fortement, globalement d'octobre 2012 à mai 2013 puis à nouveau depuis décembre 2013. De mai à décembre en revanche les fluctuations sont très limitées. Les fortes fluctuations sont observées pendant les périodes de drainage (agricole) qui s'est globalement arrêté de fonctionner en juillet 2013. Le suivi de la qualité d'un exutoire de drainage montre que l'eau qui s'infiltre vers la nappe (si elle n'était pas interceptée par le drain) a une conductivité élevée et fluctuante. Au niveau du fossé Gappia, les valeurs sont moyennes avec des valeurs « plateaux » de l'ordre de 700 µS/cm mais qui décroissent à certaines périodes. Ces décroissances pourraient être liées à de la dilution lors d'épisodes pluvieux alors que le reste de l'année le drainage de la nappe pourrait être observé (Illustration 42).

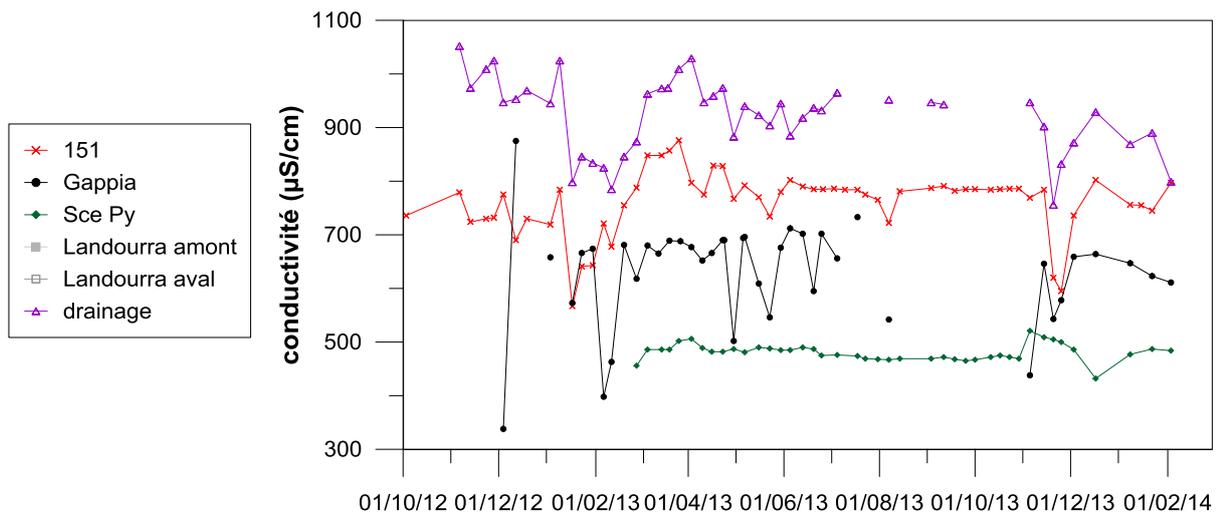


Illustration 42 - Evolution de la conductivité depuis la source du Py au puits 151

Pour les produits phytosanitaires, en prenant l'exemple de l'ESA métolachlore (Illustration 43), les teneurs les plus faibles sont mesurées au niveau du lavoir de Py, source supposée drainer les moyennes terrasses, puis les teneurs augmentent vers l'aval, dans le fossé Gappia et au puits 151. Les plus fortes teneurs sont observées au niveau du drain agricole avec une augmentation pendant la période de recharge de l'aquifère (janvier à avril 2013). Au niveau du puits 151, les teneurs ont également augmenté pendant cette période de recharge puis décroissent régulièrement d'avril à août. Au niveau du fossé Gappia, les plus fortes teneurs sont observées en mai-juin probablement avec des applications récentes de métolachlore. A terme, l'analyse de ces chroniques complétées et la compilation des autres données éclairera sur le fonctionnement global de ce sous-secteur et notamment les relations eau de surface-eau souterraine

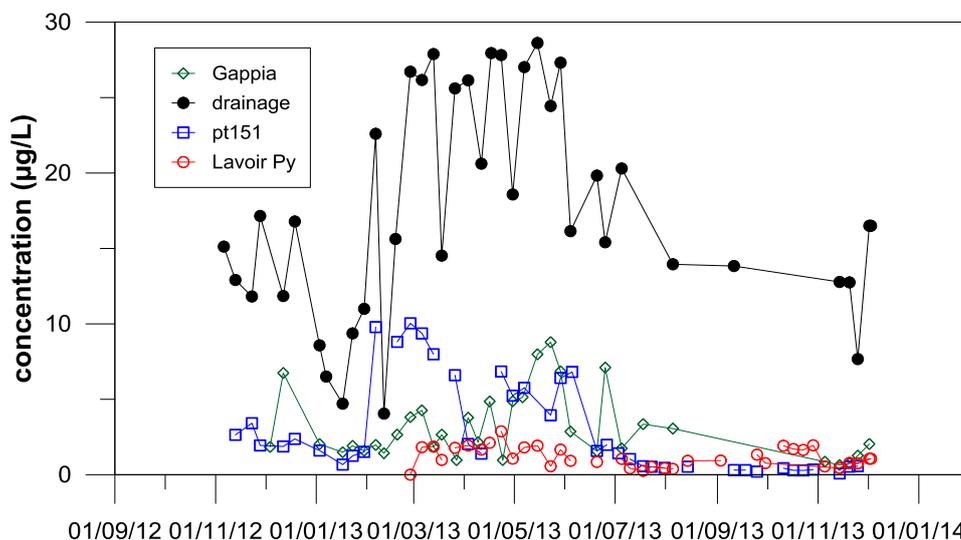


Illustration 43 - Evolution des teneurs en ESA métolachlore au lavoir de Py, dans le fossé Gappia, au niveau du puits 151 et au niveau d'un drainage agricole

3. Etude chez les 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. Les résultats obtenus chez le modèle Xénope ont été présentés dans le rapport année 1. Pour l'année 2, les toxicités chronique, aiguë et génétique du métolachlore ESA et OXA sont étudiées chez le Xénope.

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

Par ailleurs, un suivi a été réalisé sur le terrain en combinant des approches directes et expérimentales. Il s'agit d'estimer la sensibilité des populations naturelles soumises à différents degrés de contamination par le métolachlore et ses dérivés.

3.1. EVALUATION DE LA TOXICITE AIGUE, CHRONIQUE ET GENETIQUE DE L'ESA METOLACHLORE ET L'OXA METOLACHLORE AU LABORATOIRE

Les protocoles des tests d'évaluation des toxicités aiguë, chronique et génétique ont été présentés en détail dans le rapport d'année 1 (rapport BRGM/RP-62056-FR). Ils ne sont pas rappelés dans le présent rapport.

Les deux métabolites du métolachlore étant fréquemment quantifiés dans les eaux souterraines et les eaux de surface de la plaine, il a été décidé d'effectuer les tests sur ces 2 métabolites en complément des résultats obtenus pour la molécule mère, en année 1 du projet.

Pour rappel, chaque essai comprend :

- un lot témoin négatif (T⁻) : larves exposées à l'eau reconstituée (ISO, 2006) exempte de contaminant,
- un lot témoin positif (T⁺) : larves exposées à 20 mg/L de cyclophosphamide monohydrate en eau reconstituée (CP, témoin de génotoxicité ISO, 2006),
- des lots avec les contaminants étudiés en eau reconstituée à une gamme de concentration de 0,01 – 0,1 – 1 mg/L soit en ESA (Acide Ethane Sulfonique), soit en OXA (Acide Oxanilique).

3.1.1. Toxicité aiguë

Les résultats mettent en évidence l'absence de toxicité aiguë significative chez les larves de Xénope exposées à l'OXA et à l'ESA, quelles que soient les concentrations (Illustration 44).

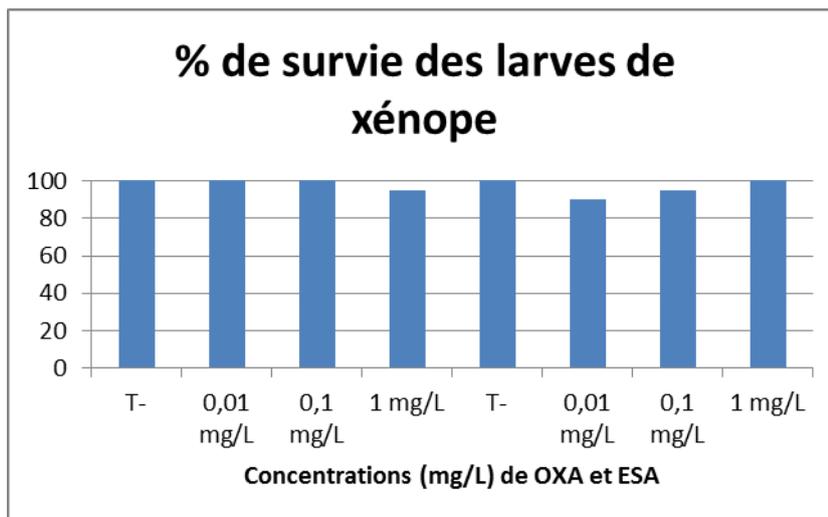


Illustration 44 - Pourcentage de survie des larves exposées à 0,01 – 0,1 – 1 mg/L d'ESA et d'OXA, en comparaison avec les larves T

3.1.2. Toxicité chronique

Les résultats de toxicité chronique (Illustration 45) mettent en évidence une absence de toxicité chronique chez les larves de Xénope exposées quelles que soient les concentrations en ESA et OXA.

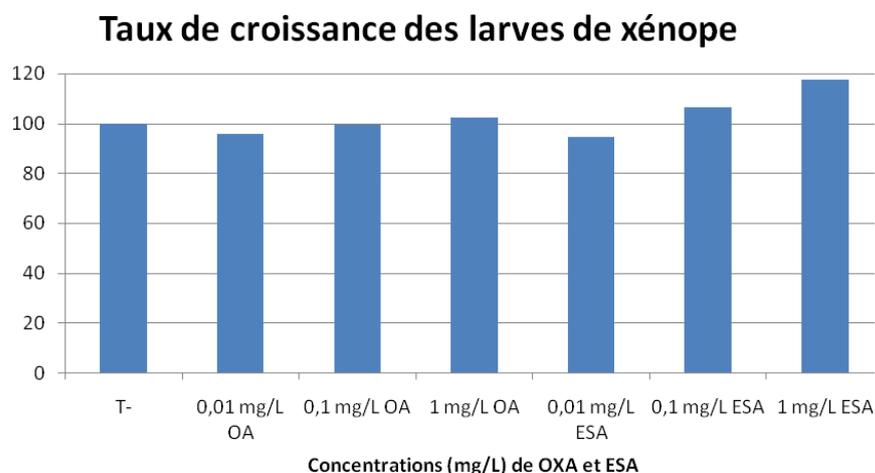


Illustration 45 - Taux de croissance chez les larves de Xénope exposées à 0,01 – 0,1 – 1 mg/l d'ESA et d'OXA, en comparaison avec les larves T

3.1.3. Toxicité génétique

Les résultats mettent en évidence une génotoxicité significative chez les larves de Xénope exposées aux deux plus fortes concentrations d'OXA (0, 1 mg/L et 1 mg/L) par rapport aux larves T (Illustration 46). A noter que l'effet est d'autant plus important que la concentration est forte, (relation effet-dose). En revanche, les résultats (Illustration 47) montrent une absence de réponse génotoxique significative chez les larves exposés aux différentes concentrations d'ESA par rapport au T.

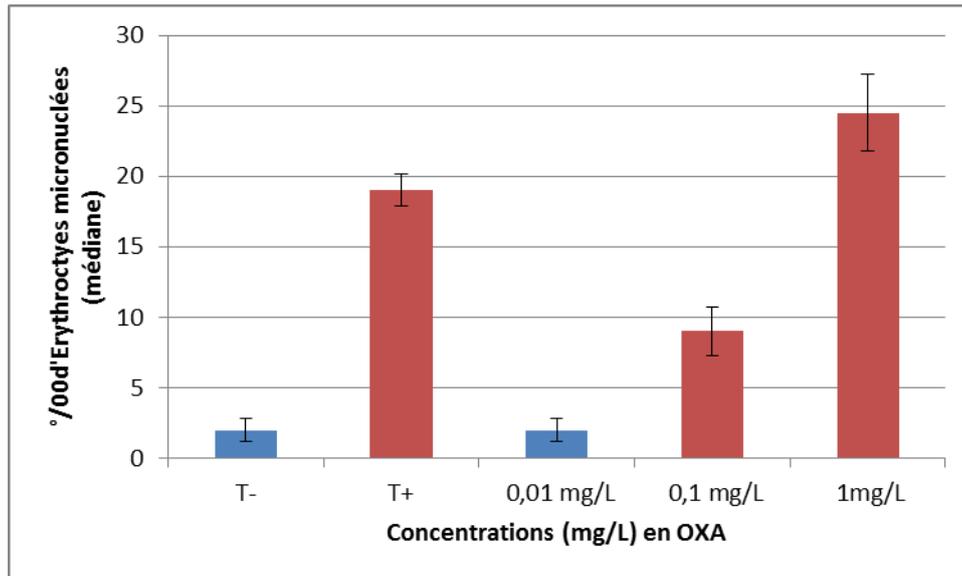


Illustration 46 - Résultats de génotoxicité chez les larves de Xénope exposées à 0,01 – 0,1 et 1 mg/L de OXA. Rouge : génotoxicité significative par rapport au T.

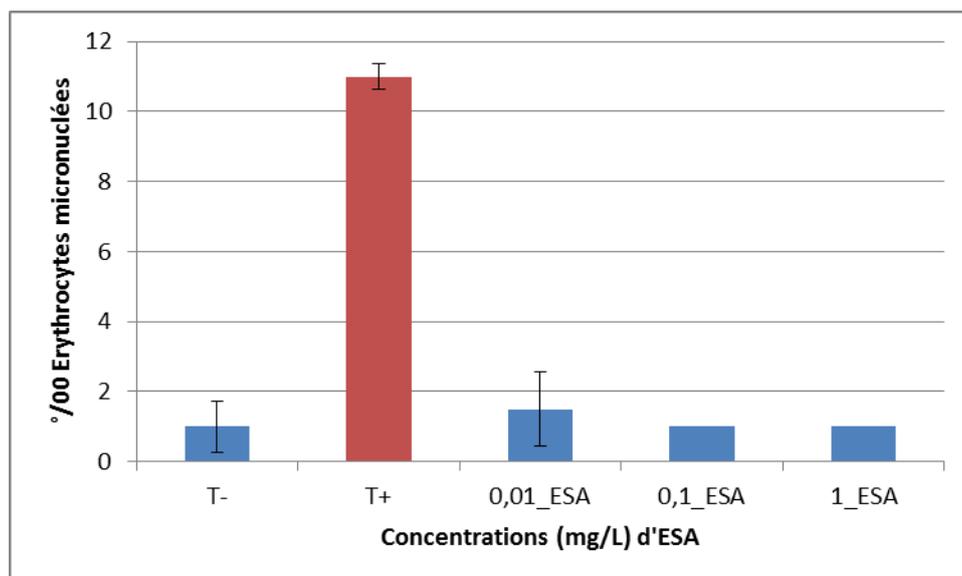


Illustration 47 - Résultats de génotoxicité chez les larves de Xénope exposées à 0,01 – 0,1 et 1 mg/L de ESA. Rouge : génotoxicité significative par rapport au T.

3.2. EXPOSITION EN LABORATOIRE DU MODELE AMPHIBIEN *Xenopus laevis* AUX EAUX DE SURFACE DU SITE D'ETUDE

En 2012, les larves de Xénope ont été exposées à des eaux naturelles prélevées sur 3 sites présentant un degré de contamination variable (rapport BRGM/RP-62056-FR). Lors de l'année 2, ces informations ont été complétées avec une exposition de larves à 7 échantillons d'eau prélevés sur la plaine en mars 2013 (sites 23, 60, 117, 151, 224, 230,261). L'illustration 48 localise ces 7 sites étudiés.

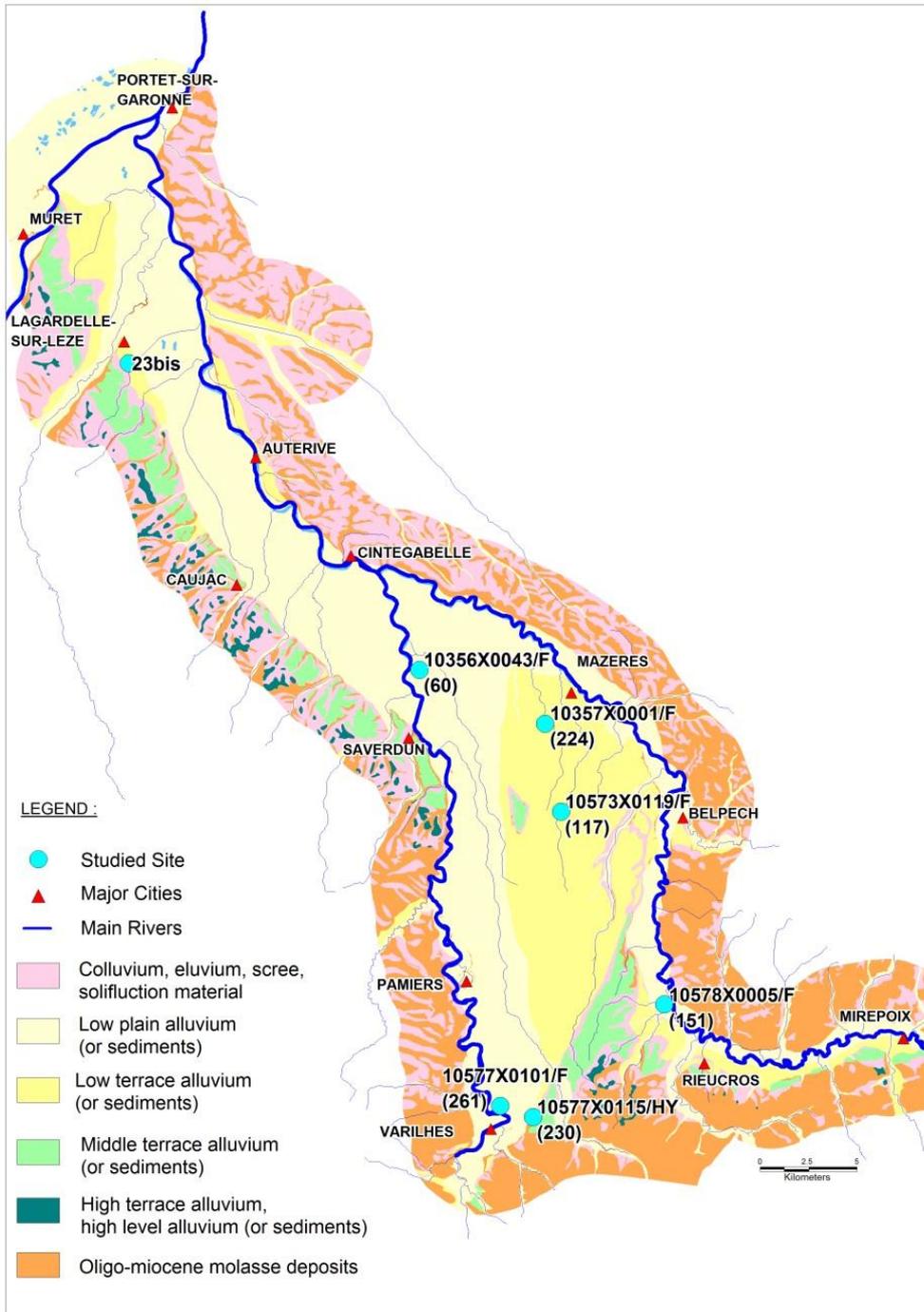


Illustration 48 - Carte de localisation des 7 sites étudiés

Pour rappel, chaque essai comprend :

- un lot témoin négatif (T⁻) : larves exposées à l'eau reconstituée ER (ISO, 2006) seule (absence de contamination)
- un lot témoin positif (T⁺) : larves exposées à 20 mg/L de cyclophosphamide monohydrate en eau reconstituée (CP, témoin de génotoxicité ISO, 2006),
- des lots avec les eaux brutes des 7 sites d'étude sélectionnés

3.2.1. Toxicité aiguë

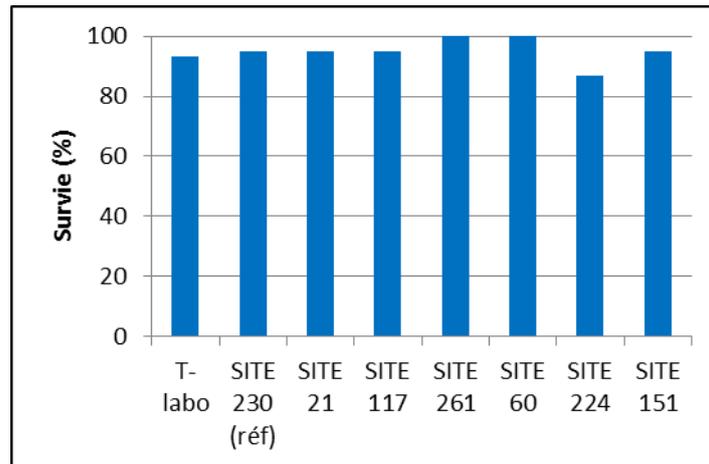


Illustration 49 - Pourcentage de survie chez les larves exposées aux eaux des 7 sites. T_{labo} : eau reconstituée.

Les résultats montrent qu'il n'y a pas de toxicité aiguë significative chez les larves exposées aux eaux prélevées sur le terrain (Illustration 49).

3.2.2. Toxicité chronique

Deux types de comparaison statistique des résultats de croissance des larves ont été effectués. La première comparaison a été réalisée par rapport aux larves exposées à l'eau reconstituée seule (T) et la seconde par rapport aux larves exposées au site de référence (« non contaminé », site 230). Les résultats obtenus (Illustration 50) montrent que les comparaisons, T vs sites, et site de référence (site 230) vs autres sites, conduisent à la même conclusion statistique. Les larves exposées aux eaux de deux sites (site 23 et site 117) présentent une différence significative de croissance (inhibition de croissance) par rapport aux larves T et par rapport à celles exposées à l'eau du site de référence 230.

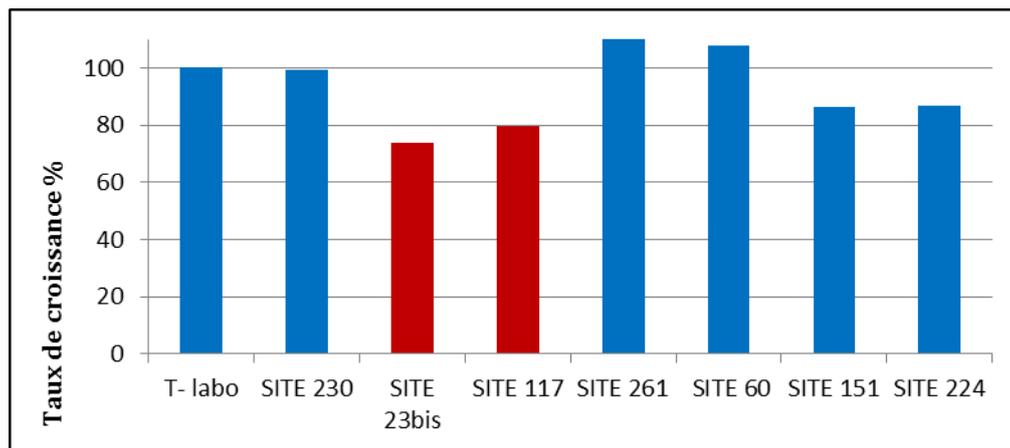


Illustration 50 - Taux de croissance chez les larves de Xénope exposées aux eaux des 7 sites, en comparaison avec les larves du témoin négatif (T) et celles exposées à l'eau du site 230 (référence). Rouge : inhibition de croissance significative par rapport au T.

3.2.3. Toxicité génétique

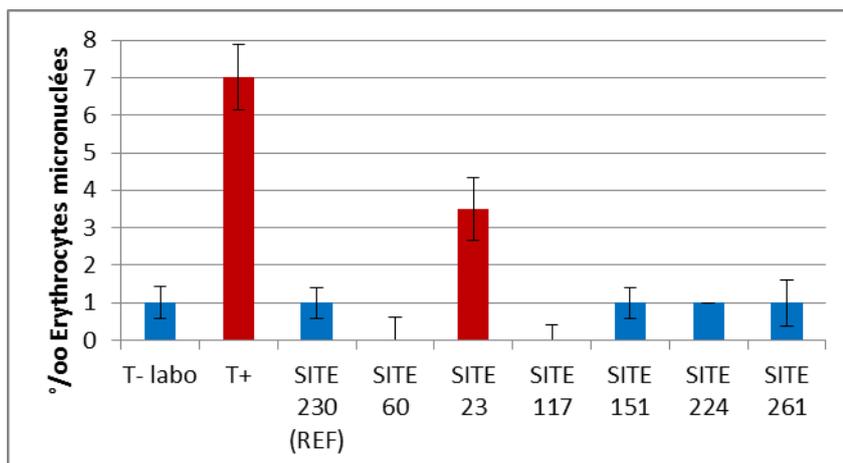


Illustration 51 - Résultats de génotoxicité des larves de *Xénope* exposées aux eaux des sites, à 20 mg/l de cyclophosphamide (T^+), et en eau reconstituée (T_{labo}). Rouge : génotoxicité significative par rapport au T^- .

Une différence significative de génotoxicité est observée chez les larves exposées à l'eau du site 23 par rapport aux larves T^- (Illustration 51). De même, la comparaison de la génotoxicité chez les larves exposées aux différentes eaux par rapport à celle des larves exposées à l'eau de référence (site 230) met en évidence une réponse génotoxique significative chez les larves exposées à l'eau du site 23.

3.3. SUIVI SUR LE TERRAIN

Au cours de l'année 2 du projet, 7 sites ont été suivis vis-à-vis des amphibiens. Les relevés de terrain ont permis d'une part de caractériser la diversité des espèces et d'appréhender en partie l'état des populations étudiées.

3.3.1. Etude de la diversité

Sur l'ensemble des sites, un total de 8 espèces a été observé. La richesse spécifique a été estimée en prenant compte l'ensemble des stades présents (Illustration 52). Les sites 117 et 224 montrent une diversité sensiblement plus faible que les autres. La présence du triton marbré en plaine agricole mérite d'être soulignée. Il n'a pas été possible de déterminer avec certitude les différents taxons de grenouilles vertes, c'est pourquoi ce terme générique a été conservé.

	23	60	117	151	224	230
Grenouille verte	J A	J A	J A	A	J A	J A
Grenouille agile		P L J				P L J A
Crapaud commun	P L A			L		
Alyte	L					

Pélodyte ponctué	P L		
Salamandre tachetée	L	L	L A
Triton marbré	A		A
Triton palmé	P A	P A	P L A

Illustration 52 - Richesse spécifique établi à partir des données cumulées printemps 2012 et printemps 2013. P : ponte, L : Larves, J : juvéniles, A : adultes.

En complément à cette estimation de la batracofaune, une étude de la matrice paysagère a été entreprise (Illustration 53). Celle-ci a clairement mise en évidence l'importance de la proximité du couvert forestier pour le maintien de nombreuses espèces d'amphibiens. Il apparaît que la diversité spécifique est davantage liée à la présence d'arbres qu'au niveau de contamination observée.

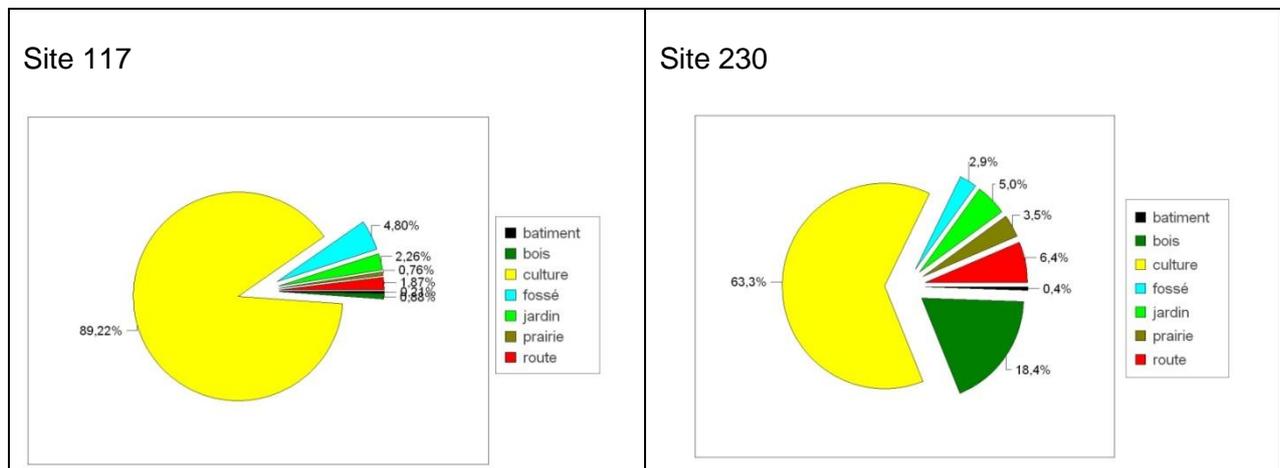


Illustration 53 - Proportion des différentes catégories paysagère dans un rayon de 500 m autour du point d'eau pour les sites 117 et 230

3.3.2. Etat des populations

La reproduction est effective sur la plupart des sites et des espèces. Cependant, il est surprenant qu'aucune ponte n'ait été observée pour les sites 117, 151 et 224. La poursuite en 2014 du suivi apportera confirmation ou non de cette observation.

La proportion d'animaux présentant des malformations est extrêmement faible. Aucune observation n'a été faite chez les adultes capturés. Chez les larves, la fréquence des malformations est de 0,005 au niveau du stade 25. Par la suite, on ne note pas une augmentation de cette fréquence.

Aucune présence de parasites ou de maladies n'a été décelée.

Comme pour l'année 1 du programme, la taille des adultes de tritons palmés est supérieure pour les individus du site 230 par rapport à ceux du site 60. Malheureusement, les effectifs sont faibles pour les deux populations cette année.

Il faut noter un fait important, propre à l'année 2012. La période de reproduction a été suivie de gelées assez forte et nous avons constaté un développement très hétérogène des pontes et un développement plus long des animaux.

3.4. APPROCHES EXPERIMENTALES

3.4.1. Suivi des cohortes de grenouilles agiles

Un suivi de grenouilles agiles provenant du site 230 a été effectué en condition expérimentale (Illustration 54). Les eaux d'exposition étaient prélevées sur les différents sites. Un changement d'eau avait lieu toutes les 2 semaines. La physico-chimie et les contaminants étaient mesurés par le BRGM avant et après chaque changement d'eau.



Illustration 54 - Disposition du suivi d'adaptation en condition ex situ. Séries rouge et bleue avec 30 têtards chacune et série verte dépourvue de têtards.

Le suivi a duré un mois (de mi-mars à mi-avril). Excepté pour le site 60 et dans une moindre mesure le site 224, la mortalité des larves est restée inférieure à 15 % quel que soit le site (Illustration 55)

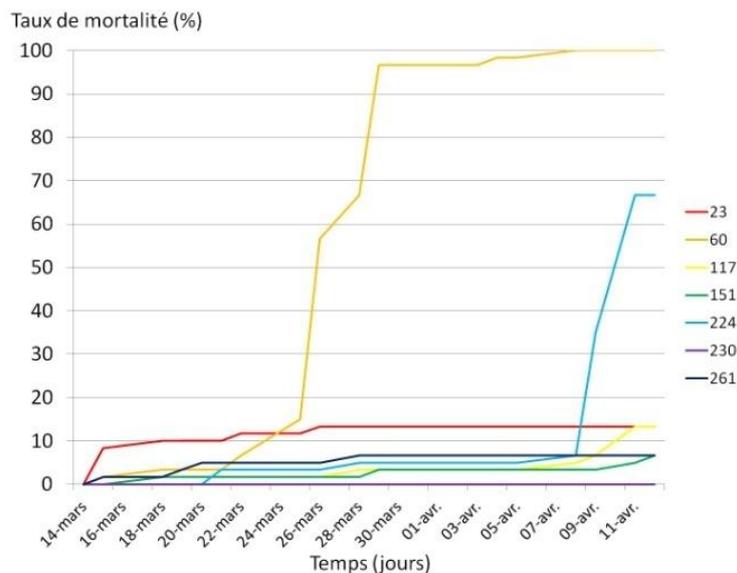


Illustration 55 - Taux de mortalité des larves exposées aux eaux des 7 sites en conditions ex-situ.

3.4.2. Ecotoxicologie comportementale

Le comportement de nage a été étudié chez deux espèces : la grenouille agile et le crapaud commun. Dix têtards sont placés dans 300 mL de solution de différentes concentrations en S-métolachlore pendant 72h. A l'issue de cette exposition, leur comportement de nage est évalué. (Illustration 56).

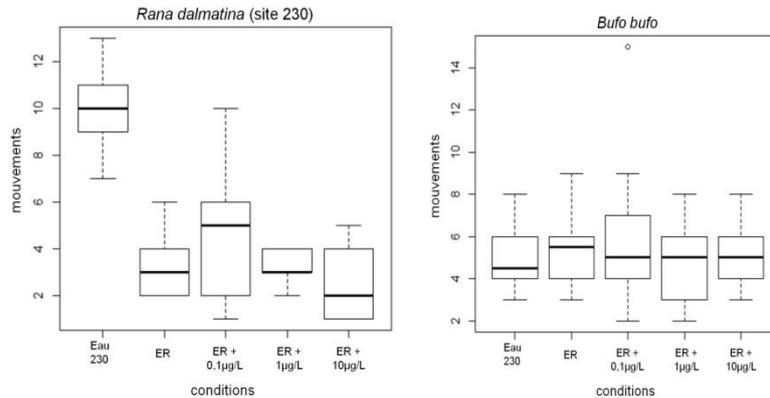


Illustration 56 - Répartition du nombre de mouvements des têtards par condition chez *R. dalmatina* et *B. bufo*. ER : eau reconstituée (ISO, 2006).

Chez les grenouilles agiles, les animaux ne montrent pas une activité de nage différente quel que soit le traitement. Par contre ils sont significativement plus actifs quand ils sont dans leur eau d'origine (site 230). Chez les crapauds, on ne note pas de différence de comportement entre les eaux.

3.4.3. Asymétrie fluctuante

Chez un organisme bilatéral, les deux côtés du corps sont soumis à l'expression des mêmes gènes et des mêmes conditions environnementales. Sa capacité à produire une « forme idéale » avec une symétrie parfaite, reflète la stabilité du développement. Etudier l'écart par rapport à la symétrie parfaite en s'appuyant sur la différence de taille entre les côtés droit et gauche, permet donc d'étudier de manière indirecte l'instabilité du développement. L'asymétrie fluctuante représente des déviations par rapport à la symétrie parfaite, la distribution des différences droite-gauche suit une loi normale et est centrée sur zéro. Les stress extrinsèques, i.e. environnementaux, et intrinsèques, i.e. facteurs génétiques, peuvent influencer sur l'asymétrie fluctuante. Elle constitue donc un proxy des effets du stress sur le développement des individus.

Il s'agissait ici de conduire des études de faisabilité non pas sur le stade adultes mais sur les stades prémétamorphe et métamorphe.

Les résultats obtenus montrent clairement que l'estimation de l'asymétrie fluctuante est possible sur de petits organismes.

3.5. DISCUSSION SUR LES RESULTATS OBTENUS POUR LES AMPHIBIENS

L'exposition des larves de *Xénope* aux métabolites ESA et OXA du S-métolachlore n'entraîne ni toxicité aiguë (mortalité) ni chronique (croissance) en condition de laboratoire (ISO, 2006). En revanche, les résultats montrent une génotoxicité significative chez les larves exposées à l'OXA (avec effet dose) et une absence d'effet chez celles exposées à l'ESA.

A ce jour, peu d'études sur l'action de ces métabolites ont été réalisées à notre connaissance et aucune donnée sur leur toxicité n'est disponible dans la littérature. La molécule mère, S-métolachlore, n'a pas d'action sur le matériel génétique (rapport année 1) alors qu'un de ses métabolites (OXA) induit des dommages à l'ADN. Les différences d'action des métabolites pourraient s'expliquer par leur mécanisme de synthèse. En effet la formation de l'OXA est induite par le Cytochrome P450 tandis que l'ESA est induit par la Gluthatione S-transférase. La contamination des différents sites étudiés sur le terrain est évaluée à partir des données fournies par le BRGM, pour permettre de déterminer quels sites étaient plus ou moins contaminés (relevées physico-chimiques de 2012).

Un indice de pollution pour chaque site a été calculé pour illustrer le niveau de contamination entre les sites. Le calcul de ces indices a été fait :

- (i) en n'utilisant que les substances étudiées cette année et l'année précédente (Métolachlore, OXA et ESA)
- (ii) en prenant en compte tous les pesticides présents sur chaque site, pour voir si cela modifie le classement des niveaux de contamination entre les sites
- (iii) en prenant en compte les concentrations en pesticides (ii) additionnés de la fraction minérale

Le calcul de cet indice permet de montrer que ce classement varie en fonction des pesticides que l'on prend en compte (Illustration 57).

A	Met/OXA/ESA		B	Tous les Pesticides présents		C	Pesticides + Fraction minérale	
	Sites	Indices de Pollution		Sites	Indices de Pollution		Sites	Indices de Pollution
	261	3		261	27		261	28
	230	5		230	29		230	34
	23	9		23	43		23	49
	60bis	12		60bis	55		60	59
	117	14		224bis	61		224	64
	224bis	14		151	61		151	68
	151	17		117	67		117	69

Illustration 57 - Indices de pollutions pour les sites étudiés (Année 2012).

A : calcul avec Métolachlore, OXA et ESA. **B** : calcul avec tous les pesticides présents. **C** : calcul avec les pesticides présents + la fraction minérale.

D'après les indices de pollution, le site le moins contaminé correspond au site 261, ce qui peut s'expliquer par le fait qu'il s'agisse d'un puits encore utilisé à des fins de distribution d'eau potable. Dans les deux cas de calcul d'indices, les sites suivants, du moins pollués au plus pollués, sont le 230, le 23 et le 60bis. Pour les trois autres sites suivants, leur classement est différent en fonction de la méthode de calcul. En effet, lorsqu'on prend en compte tous les polluants, le site 117 devient le site le plus pollué et les sites 224bis et 151 perdent un rang.

Le classement obtenu en utilisant seulement le métolachlore et ses métabolites ne doit pas être utilisé seul si on veut rendre compte de la contamination du site en fonction des résultats obtenus en laboratoire. En effet dans la nature, les organismes aquatiques ne sont jamais exposés à un seul pesticide mais à un mélange de pesticides qu'on qualifie de cocktails. Il faut donc prendre en compte ce cocktail de pesticides si on veut rendre compte du réel impact de la qualité des eaux sur les organismes et les écosystèmes associés. En effet, il a été montré que les larves exposées au S-métolachlore présentent une mortalité de 7,8%, tandis que d'autres exposées à une formulation commerciale, le Bicep II Magnum (mélange d'atrazine et de S-

métolachlore), ont aussi une faible mortalité mais un taux de survie à la métamorphose de 65% (Hayes et al., 2006). Le mélange de pesticides peut donc avoir plus d'effets que les pesticides seuls. L'étude de ces mélanges de pesticides est donc un enjeu important pour prédire leurs effets sur le milieu et les organismes aquatiques.

Tout comme l'exposition à l'OXA et l'ESA, l'exposition aux eaux des sites naturels n'entraîne pas de mortalité chez les larves de Xénope. La composition de ces eaux ne paraît donc pas impacter la survie. Pour l'analyse de la toxicité chronique, les résultats ont été obtenus en utilisant deux références pour la comparaison, (i) le témoin négatif de laboratoire en eau reconstituée standardisée (T) et (ii) le site utilisé comme référence (site 230). Cependant, les résultats montrent que dans le seul cas des deux sites 23 et 117, les larves présentent un taux de croissance significativement différent de celles exposées aux eaux des deux références (T et site 230). On observe une toxicité génétique significativement différente de celle du témoin négatif (T) et du site 230 (eau de référence) chez les larves exposées à l'eau du site 23, or d'après les indices de pollutions obtenus pour l'année 2012, ce site ne fait pas partie des sites les plus contaminés. Il conviendra de considérer les résultats de la qualité d'eau obtenus les mois suivants.

Les populations naturelles ne semblent pas affectées par les contaminants présents dans leur milieu de reproduction. Leur état sanitaire paraît bon. Cependant une différence significative de taille chez le triton palmé a été mesurée l'année précédente. L'action des contaminants pourrait donc davantage s'établir au niveau de la croissance des individus après la métamorphose. En l'état de nos connaissances, il est impossible de conclure car les fortes doses de contaminants sont observées en fin de saison de reproduction alors qu'une grande partie des individus ont déjà quitté les points d'eau.

Les études de comportement n'ont pas permis de mettre en évidence un effet du métolachlore sur l'activité de nage. Il faut noter que seulement un faible échantillon a été testé. Par ailleurs, l'effet des dérivés ESA et OXA du métolachlore n'a pas encore été testé.

Cette seconde année a été néanmoins très fructueuse car elle nous a permis (1) d'estimer la faisabilité et de valider plusieurs protocoles (comportement, asymétrie fluctuante), (2) de récolter des échantillons à analyser et (3) de concevoir des approches expérimentales en conditions contrôlées afin d'appréhender plus finement la sensibilité du métolachlore et de ses dérivés sur les populations d'amphibiens.

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 sa fréquence dans les eaux souterraines de la plaine alluviale. Le rapport d'année 1 (rapport BRGM/RP-62056-FR) présentait les premiers résultats obtenus en laboratoire pour le S-métolachlore. Pour l'année 2, les efforts pour les expérimentations de laboratoire ont portés sur l'approfondissement des effets du S-métolachlore, sur les effets de la dééthylatrazine, un métabolite de l'atrazine fréquemment quantifiée sur la plaine ainsi que sur les effets du mélange de ces deux substances.

Pour les expérimentations in situ, la qualité des eaux souterraines peut être impactée par une ou plusieurs substances. Un nouveau test d'exposition de sentinelles a été réalisé en juillet 2013.

La deuxième année du projet a également permis la finalisation de l'étude de la biodiversité des espèces souterraines entamée en janvier 2012. La constitution d'une base de données génétiques constitue un support à l'identification des espèces.

4.1. TESTS DE LABORATOIRE DE TOXICITE

Les protocoles expérimentaux détaillés sont présentés dans le rapport d'année 1. Seuls les résultats obtenus en année 2 sont présentés ici.

4.1.1. Exposition aigue au S-métolachlore

L'exposition aigue au S-métolachlore a été étudiée sur 4 espèces de Crustacés aquatiques pouvant jouer le rôle de sentinelles dans les études de contamination des eaux souterraines : *Gammarus pulex*, *G. ariegi*, *Asellus aquaticus* (trois espèces vivant dans les eaux de surface; espèces dites épigées) et *Niphargus rhenorhodanensis* (espèces vivant dans les eaux souterraines; espèce dite hypogée).

G. pulex et *A. aquaticus* sont des organismes largement utilisés en Europe pour estimer la toxicité des substances chimiques. Nous avons ajouté *G. ariegi* car elle représente une espèce d'Amphipode épigée locale. De la même manière, nous aurions aimé réaliser des mesures sur *Niphargus ciliatus* (une espèce souterraine locale) mais le nombre d'individus disponibles n'était pas suffisant pour ces expérimentations. Nous nous sommes donc limités à *N. rhenorhodanensis* espèce hypogée facile à collecter près du laboratoire.

Les résultats des mesures de toxicité aigüe du S-métolachlore (Illustration 58) soulignent trois principaux faits :

- Cette molécule est très faiblement toxique, du moins pour ces Crustacés aquatiques, sur une durée d'exposition de 96 h (une durée classiquement retenue) sa DL₅₀ varie de 12 à 42 mg/L selon les espèces. Ces valeurs sont bien plus fortes que toutes les concentrations mesurées dans les eaux souterraines de la nappe de l'Ariège.

- Les deux Gammares épigés ont une sensibilité assez similaire, avec une DL₅₀ variant entre 28 à 30 mg/L sur 24 h à des valeurs oscillant entre 5 et 10 mg/L pour 7 jours d'exposition. Les valeurs de DL₅₀ à 96h sont de 12,6 (± 3,2) mg/L pour *G. ariegi* et de 14,9 (± 2,1) mg/L pour *G. pulex*. Ces deux espèces vivent dans des eaux courantes et sont donc assez exigeantes d'un point de vue de la qualité du milieu, mais les valeurs de DL₅₀ soulignent donc bien leur faible sensibilité au S-métolachlore.
- L'Isopode *Asellus aquaticus* est beaucoup plus résistant avec des DL₅₀ de plus de 90 mg/L après 24h d'exposition. A 96h, la DL₅₀ est de 15,3 (± 1,8) mg/L. Cette espèce vit dans des ruisseaux très calmes et des zones humides stagnantes, elle est considérée comme résistante aux contraintes chimiques du milieu, sa résistance au S-métolachlore n'est donc pas surprenante.
- Enfin, l'Amphipode hypogé *Niphargus rhenorhodanensis* montre des DL₅₀ les plus élevées (plus de 110 mg/L à 24h, 42,5 (± 3,1) mg/L à 96h). Cette espèce souterraine peut coloniser des habitats très contraignants, comme des nappes très peu oxygénées, grâce à un métabolisme très bas et une grande capacité à résister aux toxiques.

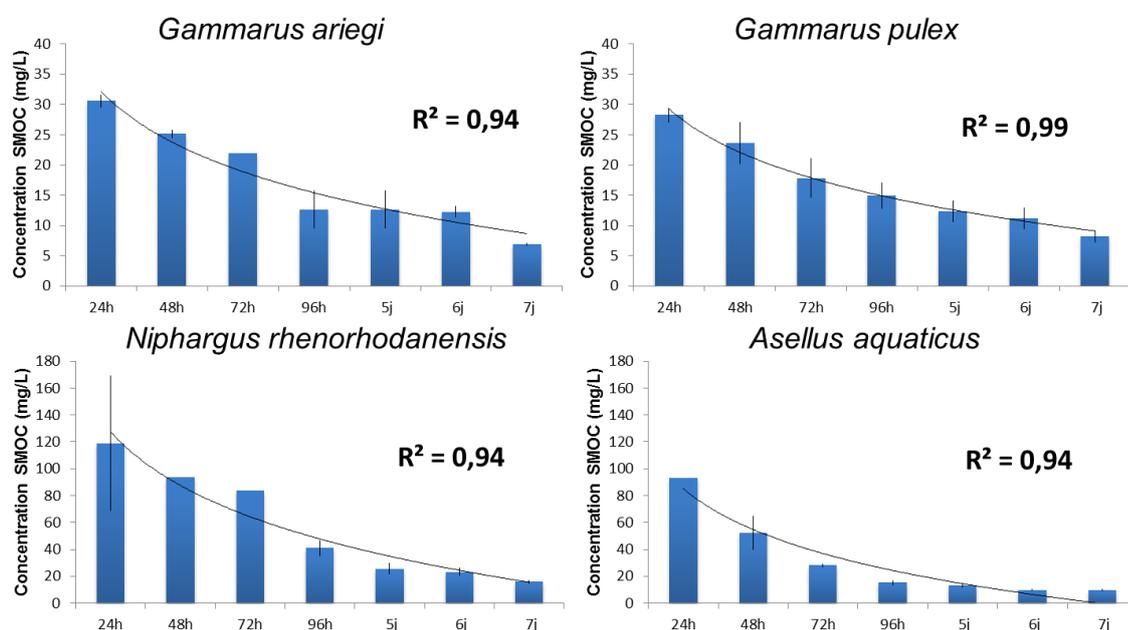


Illustration 58 - Exposition aigüe au S-métolachlore de trois espèces de Crustacés Amphipodes (*G. pulex*, *G. ariegi*, *N. rhenorhodanensis*) et d'un Isopode (*A. aquaticus*). Graphe donnant les concentrations provoquant 50% de mortalité (DL₅₀) à différentes durées d'exposition (de 24h à 7 jours).

4.1.2. Exposition aigue à la dééthylatrazine

Les mêmes quatre espèces ont été exposées selon le même protocole à la dééthylatrazine. Les valeurs de DL₅₀ obtenues varient fortement selon l'espèce considérée :

- La DL₅₀ est faible chez *G. pulex* (1,77 ± 1 mg/L pour 96h) bien plus faible que pour le S-métolachlore. Cette espèce apparaît ainsi comme assez sensible à la dééthylatrazine, même si les valeurs de DL₅₀ restent bien plus fortes que les teneurs mesurées dans la nappe de l'Ariège.
- Elle est à peu près identique au S-métolachlore chez l'Isopode *A. aquaticus* (16,1 ± 3,3 mg/L pour 96h)
- Elle est beaucoup plus forte que pour le S-métolachlore chez l'Amphipode local *G. ariegi* (23,1 ± 12,2 mg/L pour 96h).

- Enfin, la DL₅₀ de la dééthylatrazine n'a pu être mesurée chez l'Amphipode hypogé *N. rhenorhodanensis* car aucune mortalité supérieure au témoin n'a pu être observée même après 7 jours d'exposition aux concentrations les plus fortes (100 mg/L).

4.1.3. Exposition aigue au mélange S-métolachlore – dééthylatrazine

Les expériences d'exposition au mélange des deux substances (Illustration 59) permettent d'étudier leur effet combiné sur les quatre espèces de Crustacés aquatiques :

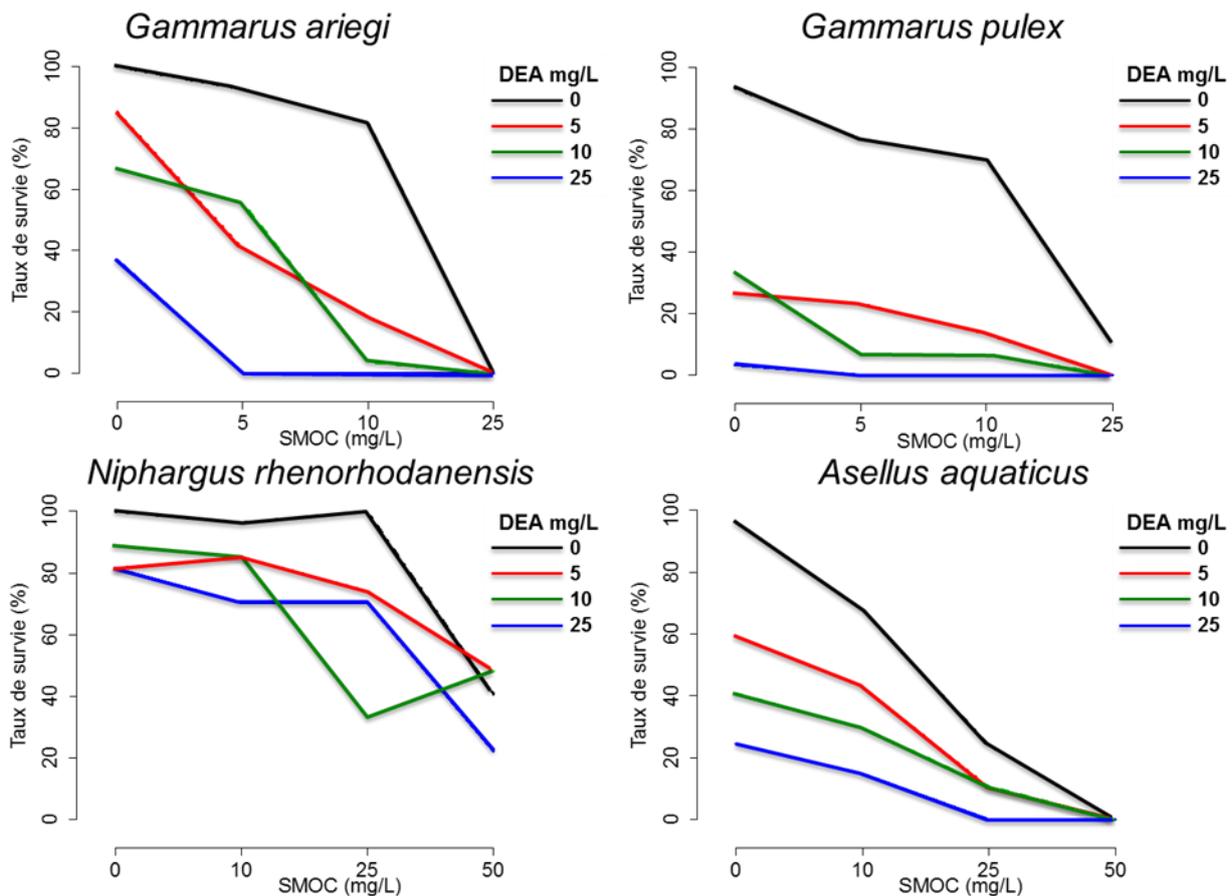


Illustration 59 - Taux de survie à 96h des quatre espèces de Crustacés aquatiques, trois espèces de Crustacés Amphipodes (*G. pulex*, *G. ariegi*, *N. rhenorhodanensis*) et un Isopode (*A. aquaticus*), au mélange S-métolachlore (en abscisse) et dééthylatrazine (différentes courbes).

- L'Amphipode souterrain *N. rhenorhodanensis* montre une faible réaction à l'ajout de dééthylatrazine au S-métolachlore si l'on considère les taux de survie à 96h. Ces survies sont très similaires quelle que soit la concentration de dééthylatrazine ajoutée en mélange.
- L'ajout de dééthylatrazine au mélange auquel sont confrontés l'Amphipode *G. ariegi* et l'Isopode *A. aquaticus* a un effet très progressif, avec des taux de survie diminuant régulièrement aussi bien avec les concentrations en S-métolachlore qu'avec les concentrations en dééthylatrazine. *A. aquaticus* peut être considéré comme plus résistant que *G. ariegi* (voir les teneurs de S-métolachlore en abscisse beaucoup plus fortes pour *A. aquaticus*).

- Enfin, l'Amphipode *G. pulex* semble le plus sensible au mélange des deux substances avec un effondrement des taux de survie dès que les teneurs en S-métolachlore et dééthylatrazine dépassent 5 mg/L.

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 dont le nombre d'individus récoltés était insuffisant pour envisager un encagement, l'étude de la qualité de la nappe par exposition de sentinelles a été réalisée en juillet 2013 en utilisant une espèce de surface locale que l'on retrouve aussi à l'interface eau de surface - eau souterraine : *G. ariegi*. Elle vient compléter la première expérimentation menée en septembre 2012, les mêmes puits ont été retenus. Le protocole détaillé est présenté dans le rapport d'année 1.

Les taux de survie étant peu explicatifs de la qualité de la nappe dans les dix puits étudiés, un Indice Ecophysiologiques (EPI) a été calculé (Illustration 60). Cet indice combine les taux de survie à l'état des réserves énergétiques des sentinelles. Les teneurs en réserve des sentinelles étant différentes en 2012 (période de basses eaux) et en 2013 (hautes eaux), les valeurs de l'indice ont été rapportées à celles obtenus sur le lot témoin conservé au laboratoire et non exposé à un toxique.

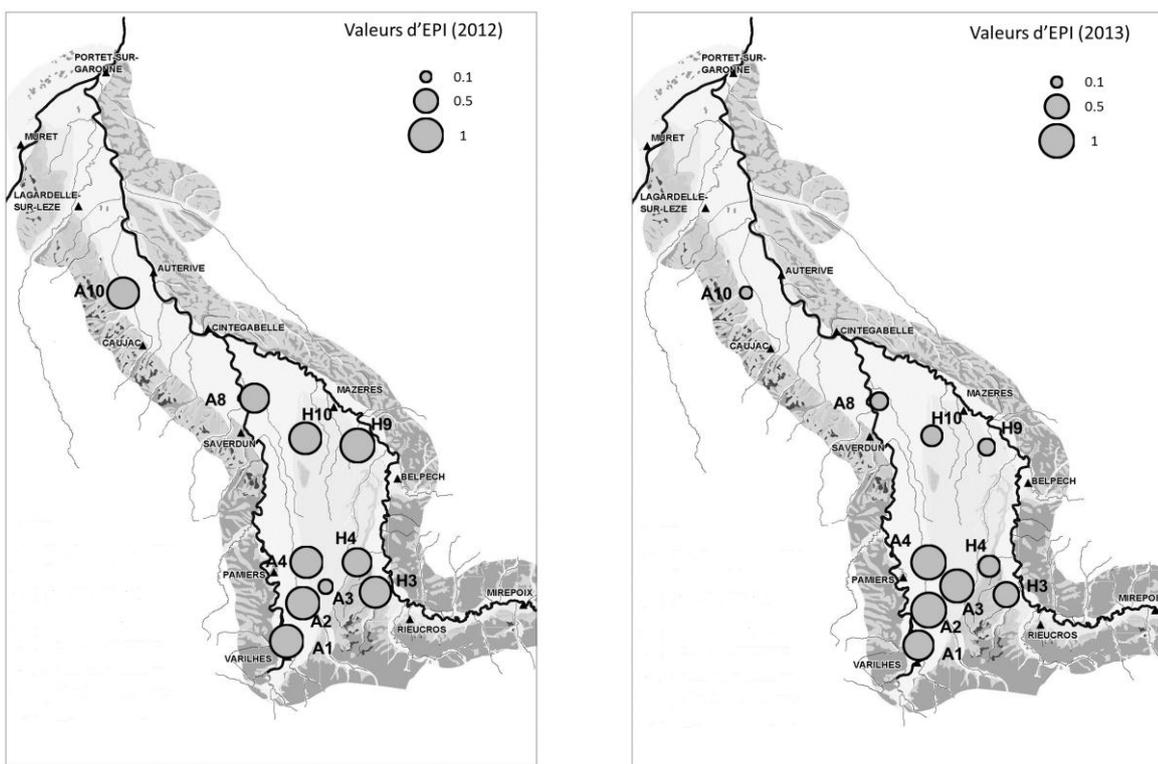


Illustration 60 - Valeur de l'Indice Ecophysiologique (EPI) traduisant la survie et l'état de santé des Crustacés sentinelles exposés dans 10 puits de la plaine de l'Ariège en 2012 (période de basses eaux) et 2013 (période de hautes eaux). Les valeurs de l'indice sont exprimées en ratio à un lot témoin exposé au laboratoire à une eau sans toxique et varient donc entre 0 et 1.

L'image des perturbations de la nappe à l'échelle de la plaine de l'Ariège (Illustration 60) est beaucoup plus contrastée en 2013 (hautes eaux) qu'en 2012 (basses eaux). Cette deuxième

année d'étude montre clairement un gradient très net entre le Sud de la plaine (partie amont de la nappe où la qualité de la nappe est moins marquée par les activités humaines) où les valeurs d'EPI sont très proches des valeurs obtenues au laboratoire, et le Nord de cette plaine (zone plus marquée par les activités humaines) où les valeurs d'EPI sont parfois très faibles. Ce gradient est assez similaire au gradient des teneurs en nitrates qui augmentent du Sud vers le Nord. Il existe en 2013, une corrélation significativement négative entre teneurs en nitrates et EPI ($r^2 = 0,37$, $p=0,03$).

Nous pouvons donc conclure que les activités humaines induisent une dégradation des qualités environnementales de la nappe de la plaine de l'Ariège qui se traduit par une dégradation de l'état de santé des Crustacés sentinelles implantés dans les puits. Cette dégradation est plus marquée dans la partie centrale de la nappe que celle très amont. Cette dégradation est aussi plus marquée en hautes eaux qu'en basses eaux.

4.3. DISTRIBUTION SPATIALE DES COMMUNAUTES SOUTERRAINES SUR LA PLAINE

La distribution spatiale des invertébrés souterrains a été étudiée à grande échelle sur la plaine de l'Ariège en échantillonnant un nombre important de stations. La sélection des stations a été réalisée en utilisant les données géochimiques obtenues sur 144 points lors d'une campagne de mesures réalisée en avril 2008. Le diagramme de Piper 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, 29 correspondent à des puits et 7 à des sources (rapport BRGM/RP-62056-FR).

4.3.1. Composition de la faune des puits et répartition spatiale des communautés

Pour chaque prélèvement, tous les individus ont été triés et identifiés par le LEHNA-Université Claude Bernard Lyon1.

Sur la totalité des sites échantillonnés, un nombre important d'organismes a été récolté (12 155 individus). 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 4 espèces d'ostracodes souterrains (non décrites). Ces identifications morphologiques demandent à être confirmées par les analyses moléculaires (en particulier pour les Amphipodes hypogés), les résultats présentés ci-dessous pourront donc être nuancés en fonction des analyses moléculaires en cours.

Si l'on compare la faune échantillonnée en 2012 aux faunes récoltées par Dumas en 1999 et Janiaud en 2003, des différences marquées apparaissent :

- deux copépodes hypogés récoltés en 1999 et 2003 (*Graeteriella unisetigera* et *Graeteriella sp.*) ne sont pas retrouvés, alors que deux espèces (*Diacyclops belgicus* et *Ceuthonectes gallicus*) apparaissent dans la collection de 2012. L'espèce *Diacyclops languidoides*, observée en 1999 est sans doute un synonyme de *Diacyclops paolae* récoltée en 2012,
- Quatre espèces d'Amphipodes (*Niphargus robustus*, *N. gineti*, *Salentinella gineti* et *Ingolfiella thibaudi*) présentes en 1999 ne sont pas retrouvées en 2012, alors que trois espèces apparaissent dans la collection de 2012 (*Niphargus forelli*, *N. ciliatus* et *Salentinella major*).

Ces différences sont sans doute liées à deux causes principales. D'une part, la zone d'étude de 2012 est différente de celle explorée en 1999, puisque des puits ont été échantillonnés en 2012 dans la plaine alluviale de l'Hers qui n'avait pas été explorée en 1999 et 2003. D'autre part, il semble que des changements faunistiques soient intervenus entre ces deux périodes pour les puits proches de l'Ariège. Il semble difficile pour le moment d'attribuer ces changements faunistiques à des modifications de la qualité du milieu.

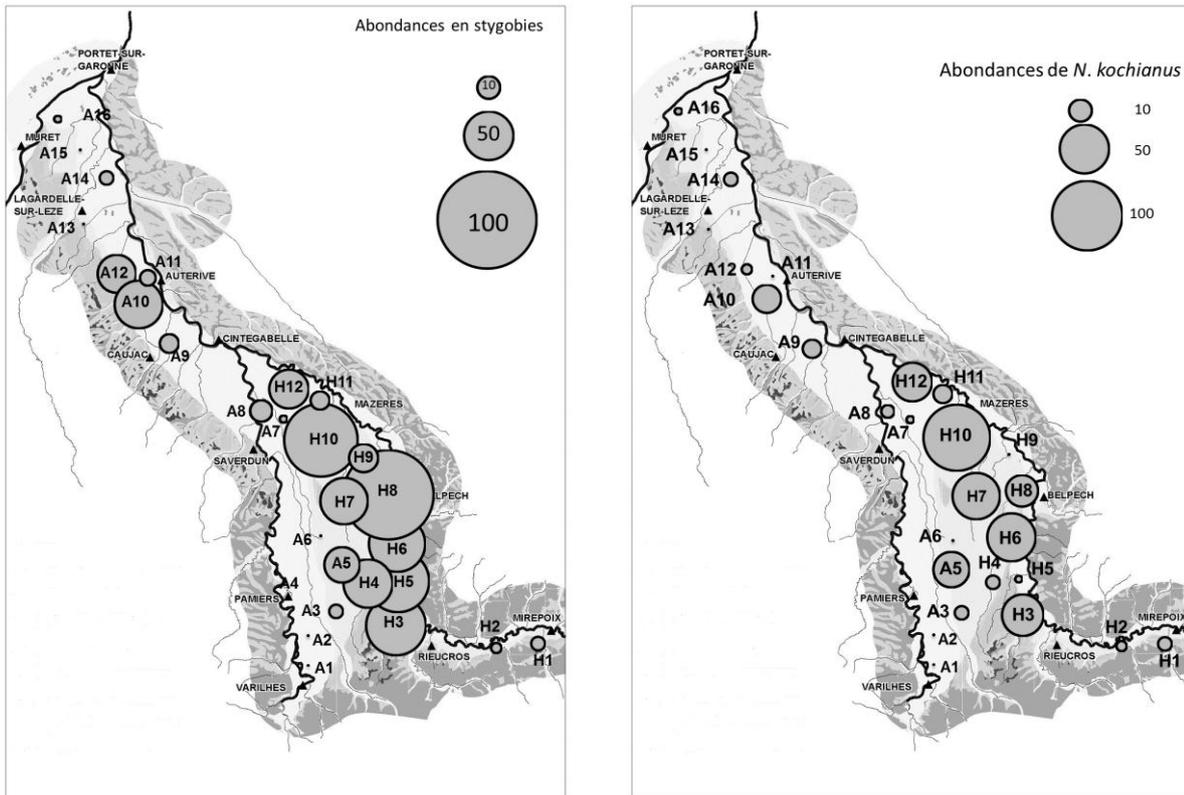


Illustration 61 - Répartition des abondances en organismes hypogés (à gauche) et de l'Amphipode *Niphargus gr kochianus* (à droite) dans les puits échantillonnés dans la plaine de l'Ariège. Ces résultats pourront être modifiés en fonction des futures identifications moléculaires (en cours).

La distribution de la faune souterraine dans la nappe de l'Ariège (Illustration 61) est très hétérogène tant du point de vue du nombre d'individus hypogés que de l'espèce la plus abondante dans ce secteur (l'Amphipode *Niphargus gr kochianus*). Les organismes souterrains sont plus abondants dans les puits proches de l'Hers et dans la partie Sud de la zone d'étude. Ce gradient Sud-Nord d'abondance de la faune souterraine rappelle le gradient observé pour l'Indice Ecophysiological des Crustacés sentinelles en 2013 (Illustration 60) et semble confirmer une dégradation de la qualité des eaux souterraines dans la partie la plus agricole de la zone d'étude.

4.3.2. Validation moléculaire des taxons de la faune souterraine

Les informations détaillées sur la démarche et les premiers tests d'amplification de l'ADN ont été présentées dans le rapport d'année 1 (rapport BRGM/RP-62056-FR). Le présent rapport porte sur la comparaison des résultats obtenus par identification visuelle et détermination moléculaire. Un bilan des premiers essais de développement de microsatellites destinés à l'étude des populations est également réalisé.

Identification et validation moléculaire de la détermination visuelle

Etant donné la qualité médiocre des extractions d'ADN et l'impossibilité technique d'améliorer le protocole d'extraction, nous avons opté pour une stratégie moléculaire visant à déterminer les espèces sur un fragment extrêmement court d'ADN (< 500 paires de bases). A partir des résultats présentés dans le rapport d'année 1, nous avons donc cherché une (des) portion(s) du gène mitochondrial 28S étant suffisamment polymorphe pour identifier avec certitude les différentes espèces présentes sur les sites d'échantillonnages. Notre choix s'est porté sur une (des) portion(s) présentant un polymorphisme de « taille », c'est-à-dire qui une fois amplifiée présentait un nombre de paires de bases différent entre les espèces. Cette approche offre l'avantage de différencier les espèces sur la base de gel d'agarose ou de génotypage et élimine ainsi l'étape coûteuse de séquençage. Nous avons ainsi identifiés deux portions du gène 28S (deux « combos ») qui semblaient suffisamment polymorphes pour différencier les différentes espèces (Illustration 62). Le combo le plus pertinent est le « combo D » qui permet notamment de différencier sans ambiguïté l'espèce la plus abondante (groupe *kochianus*) des autres espèces présentes sur les sites. Dans un premier temps, notre objectif était de rapidement quantifier et différencier les individus attribuables au groupe *kochianus* de ceux attribuables à un des autres groupes. Dans ce cas la détermination c'est donc fait sur gel d'agarose.

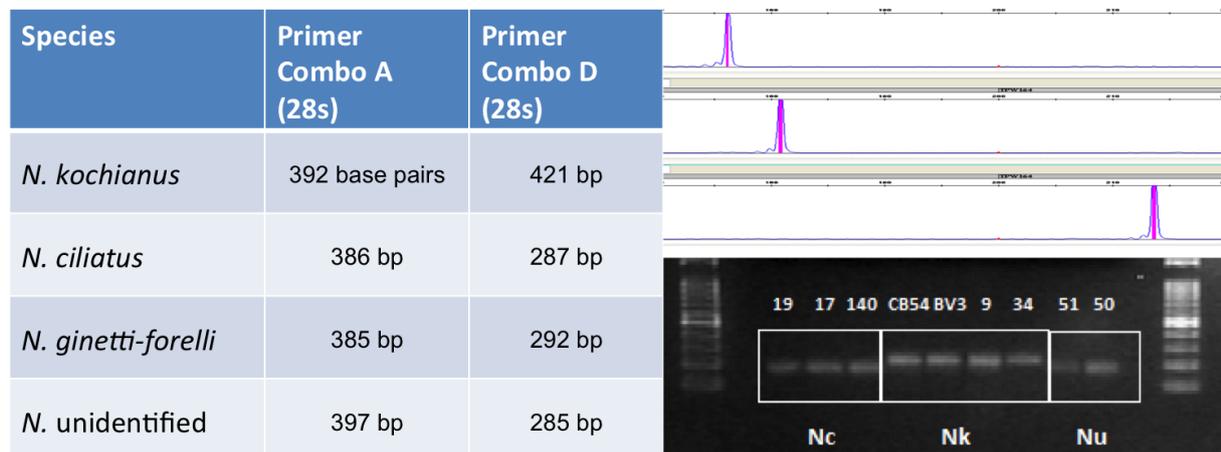


Illustration 62 - Illustration des combos mis en place afin de déterminer rapidement les différentes espèces sur la base du polymorphisme de séquences. Ici deux combos (A et B) sont illustrés. La taille des fragments d'ADN obtenus pour chaque espèce après amplification des amorces spécifiques à chaque combo est mentionné. En haut à droite les trois lignes représentent une visualisation des amplicons de chaque espèce (pour le combo D) après génotypage sur séquenceur. Les pics sont très bien différenciés. En bas à droite on a une représentation d'un gel pour le combo A et pour trois espèces. Chaque bande est un individu et la hauteur de la bande correspond à sa taille.

L'ADN de 318 individus a été extrait et amplifié à l'aide des amorces du combo D. Aucun résultat interprétable n'a été obtenu pour 64 individus, probablement dû à une mauvaise qualité de l'ADN. Parmi les 254 individus ayant fonctionné, 198 ont été identifiés visuellement comme appartenant au groupe *kochianus* et cette identification a été confirmée pour 165 individus (taux d'erreur, $T_e = 17.7\%$). 45 individus ont été identifiés visuellement comme appartenant à un des autres groupes (majoritairement *ciliatus*) et cette identification a été confirmée pour 35 spécimens (taux d'erreur, $T_e = 23\%$, les 10 individus mis-classifiés étant moléculairement attribués au groupe *kochianus*). Finalement, 11 individus n'avaient pas pu être identifiés visuellement, parmi ceux-ci 6 ont été attribués moléculairement au groupe *kochianus* et 5 à une autre des espèces présentes sur les sites.

Le taux d'erreurs moyen semble donc approcher les 20 % lors de l'identification visuelle. Toutefois il est bon de préciser que dans 83% des cas, la personne ayant identifié les spécimens avait elle-même un doute sur l'identification. Ces premiers résultats permettront d'affiner les cartes de distribution du groupe *kochianus* (Illustration 61) dans la zone d'étude. La dernière étape de cette validation consistera à différencier les espèces qui n'ont pas été identifiées comme appartenant au groupe *kochianus* (i.e. 73 individus). Pour ces spécimens, les réactions PCR seront analysées par génotypage sur un séquenceur à capillaire (Illustration 62, image en haut à droite) qui offre la précision nécessaire à une identification plus fine. En cas de doute ils seront séquencés. Cette double approche (gel agarose puis génotypage) offre l'avantage d'être rapide et peu coûteuse.

Développement des banques microsatellites

Les marqueurs microsatellites sont constitués de séquences répétées de 2-6 paires de bases d'ADN. Ils ont la particularité d'être neutres (non-affectés) par la sélection naturelle (car ne codant pas pour des protéines) et d'avoir un taux de mutation assez élevé. Cela en fait des marqueurs de choix pour l'étude des patrons de diversité génétique intra-populationnelle. Dans ce projet, notre objectif initial était de développer une banque de marqueurs microsatellites (car non disponible dans la littérature) pour l'espèce du groupe *kochianus* (espèce la plus représentée dans la zone). Cette étape est nécessaire pour l'étude proprement dite de la diversité génétique de ces populations.

Nous avons pour cela utilisé une technique récente basée sur le séquençage massif du génome de l'espèce d'intérêt. Cette technique a été développée par la plateforme privée GenoScreen à Lille avec qui nous avons travaillé pour le développement de la base microsatellite pour le groupe *kochianus*. Bien que cette technique soit extrêmement fiable et puissante, les résultats obtenus pour notre espèce sont très décevants et inexploitable. En effet, la plateforme a été capable d'identifier 32 marqueurs microsatellites sur l'ensemble du génome pour notre espèce d'intérêt. C'est extrêmement faible puisque à titre de comparaison, pour un Copépode (*Tracheliastes polycolpus*) sur lequel nous travaillons par ailleurs la même technique nous a permis de générer plus de 8000 microsatellites. En outre, l'analyse des profils des microsatellites (réalisée par GenoScreen et ensuite par nos soins et ceux sur deux sets indépendants d'individus et sur deux séquenceurs différents) a révélé que aucun de ces 32 marqueurs n'était exploitable. En effet, les profils étaient trop irréguliers d'un individu à l'autre et extrêmement difficile à interpréter. Il est fort probable que le manque de réussite de cette étape soit la résultante de la mauvaise qualité de l'ADN extrait sur ces individus. Nous avons dernièrement essayé une ultime recette d'extraction d'ADN (avec l'idée de refaire faire une base microsatellite) sur des nouveaux individus (de grande taille) mais les résultats restent toujours très mauvais. Cette étape étant cruciale pour le reste des analyses, nous en sommes venue à la conclusion qu'il serait très hasardeux de continuer à s'obstiner sur cette espèce, tout au moins d'un point de vue populationnelle.

En concertation avec les différents interlocuteurs du projet, nous sommes donc en pleine réflexion pour réaliser ces analyses populationnelles sur d'autres espèces du groupe *Gammarus* qui ont été utilisées comme sentinelles (voir ci-dessus). Par ailleurs, des approches d'analyses d'expression de gènes pourraient être entreprises chez ces espèces dans des milieux contrôlés en laboratoire, ce qui permettrait d'affiner les résultats expérimentaux présentés ci-dessus.

4.4. DISCUSSION SUR LES RESULTATS OBTENUS SUR LES MACRO-ORGANISMES SOUTERRAINS

Trois principales conclusions émergent de l'ensemble de ces résultats :

- Il existe des différences fortes dans la faune souterraine échantillonnée entre le Sud (en particulier les puits proches de l'Hers) et la zone centrale de la zone d'étude, cette dernière hébergeant des communautés avec un nombre d'organismes hypogés (vivant dans les eaux souterraines) plus faible. Ces différences sont sans doute liées à la répartition géographique des espèces souterraines, mais aussi aux conséquences des activités humaines sur la qualité des eaux souterraines.
- L'état de santé des organismes sentinelles est moins bon dans les puits situés dans la partie centrale et Nord de la zone d'étude, là où les activités humaines (en particulier les activités agricoles) sont les plus fortes.
- La toxicité des deux molécules étudiées (un herbicide, le S-métolachlore et un métabolite d'herbicide, la dééthylatrazine) est très faible pour les quatre espèces de Crustacés aquatiques considérées dans cette étude. Elle est toutefois variable selon les espèces. Les teneurs observées dans la nappe de l'Ariège ne devraient pas induire de mortalité aiguë de la faune souterraine, mais peut-être induire des effets chroniques et un affaiblissement des populations.

Le gradient Sud-Nord observé pour les communautés échantillonnées dans les puits et pour l'état de santé des organismes sentinelles ne semble donc pas directement lié à la présence de ces deux molécules, mais pourrait être lié à la combinaison de plusieurs perturbations, dont les apports en pesticides ne seraient qu'un élément venant réduire la viabilité des populations. Des études de la toxicité à long terme des pesticides présents sur le secteur d'étude pourraient permettre de mieux comprendre le lien entre les activités humaines et la dégradation des communautés souterraines dans la plaine alluviale de l'Hers et de l'Ariège.

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.

L'année 1 (rapport BRGM/RP-62056-FR) a permis de développer une procédure d'extraction de l'ADN bactérien et d'analyse de structure de la communauté bactérienne par génotypage T-RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux) adaptée aux eaux souterraines de la nappe d'Ariège. Il est ainsi possible d'extraire et d'amplifier l'ADN bactérien à partir d'échantillons d'eau souterraine. La méthode de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (T-RFLP) des gènes de l'ARNr 16S amplifiés par PCR a été optimisée pour évaluer la dynamique de la structure de la communauté bactérienne. La procédure retenue est résumée dans l'illustration 63.

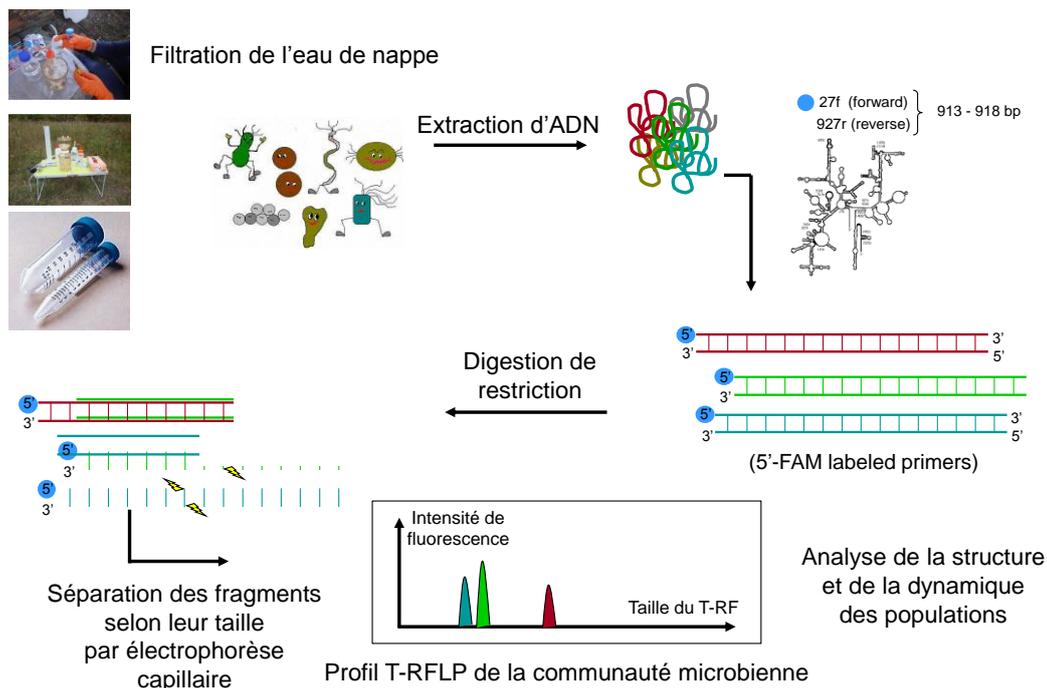


Illustration 63 - Principe de la méthode de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (T-RFLP) des gènes bactériens de l'ARNr 16S amplifiés par PCR pour évaluer la dynamique de la structure des communautés bactériennes de la nappe d'Ariège. Un fragment du gène de l'ARN 16S est généré à partir de l'ADN extrait de la nappe de l'Ariège. Les amplicons marqués (6-FAM- ou de carboxy-X-rhodamine (ROX)) sont digérés par des enzymes de restriction et les fragments sont séparés selon leur taille par électrophorèse capillaire. Les électrophorégrammes T-RFLP ont été alignés et analysés avec le logiciel GeneScan V3.7 (Applied Biosystems). Le traitement numérique et l'analyse des données ont été effectués avec le logiciel R (<http://www.r-project.org>). Une analyse de positionnement multidimensionnelle non-métrique (nMDS) a été réalisée pour étudier les changements de la communauté bactérienne.

L'application de ce protocole sur des échantillons d'eau collectés à différentes dates et présentant des contaminations différentes a été réalisée en année 2.

5.1. EVOLUTION DE LA FLORE BACTERIENNE SOUTERRAINE

5.1.1. Points d'eau étudiés

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, juillet, et septembre 2012, ainsi qu'en février et mai 2013. Tous les prélèvements ont été faits en duplicats. Les points privilégiés pour le suivi temporel correspondent aux puits (donnés en ordre décroissant de concentrations en pesticides) 151>60>117>230>224 qui présentent des concentrations en pesticides et ions majeurs variables. Ces points représentent ceux suivis plus spécifiquement pour l'étude des amphibiens et macro-organismes souterrains dans le cadre du projet ELISE. D'autres puits ont toutefois également été analysés (272, 23 et 60).

5.1.2. Evolution spatiale et temporelle des communautés bactériennes

Une analyse de positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS) des profils T-RFLP obtenus à partir des échantillons d'eau de la nappe de l'Ariège dans les puits 151, 60, 117, 230, 224, 272, 23 et 60 présentant des concentrations en pesticides et ions majeurs variables, lors des campagnes de mai (C1), juillet (C2), septembre (C3) et décembre (C4) 2012, ainsi qu'en février (C5) et mai (C6) 2013 (Illustration 64). Dans une projection nMDS en 2 dimensions, la distance entre les points reflète le degré de similitude entre les profils T-RFLP. Par conséquent, les échantillons présentant une structure communautaire similaire se trouvent à proximité les uns des autres dans cette représentation.

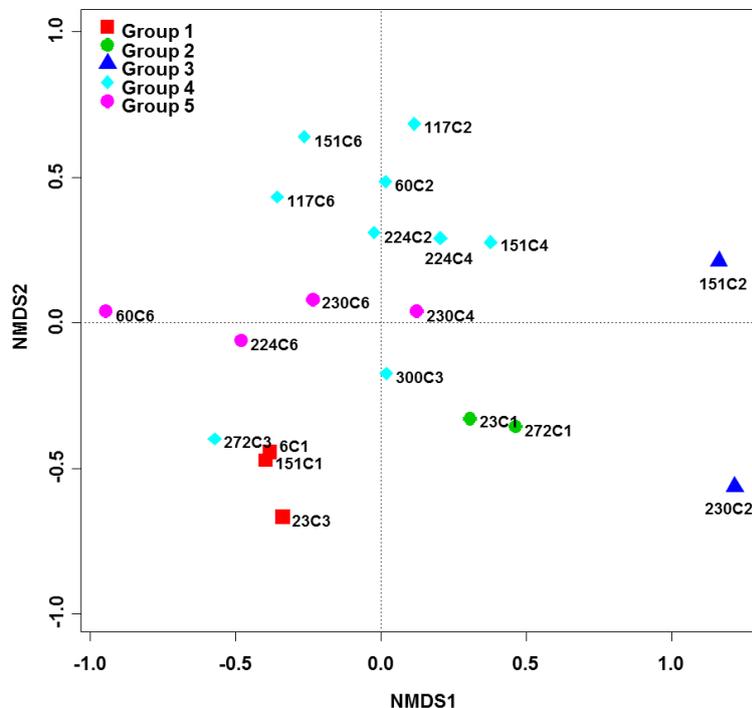


Illustration 64 - Analyse multidimensionnelle non-métrique (nMDS) des profils T-RFLP de la communauté bactérienne à partir échantillon d'eau de la nappe de l'Ariège dans les puits 151, 60, 117, 230, 224, 272, 23 et 60 présentant des concentrations en pesticides et ions majeurs variables, lors des campagnes de mai (C1), juillet (C2), septembre (C3) et décembre (C4) 2012, ainsi qu'en février (C5) et mai (C6) 2013. Stress de l'analyse = 0.15%.

L'analyse statistique des profils T-RFLP révèle l'existence de 5 groupes principaux d'échantillons. Ces groupes ne sont pas clairement séparés, suggérant l'absence de structure spécifique de la communauté bactérienne dominante dans chaque puits, et donc en fonction de l'exposition aux contaminants ou par période d'échantillonnage. Une fraction importante de pics T-RFs est commune aux différents puits, indiquant l'existence possible d'un microbiome de base, commun aux différents puits étudiés, et potentiellement utilisable pour évaluer voire prédire la réponse de la communauté dominante à des perturbations plus importantes. A ce stade, il apparaît que le degré de contamination des puits par les pesticides et les produits de dégradation ne semble pas impacter de façon significative les communautés bactériennes de la nappe.

L'analyse statistique de la relation entre la dynamique de la communauté bactérienne et les caractéristiques physico-chimiques des eaux de la nappe, incluant les pesticides et leurs produits de dégradation et les ions, souligne que la teneur en nitrate apparaît comme le seul déterminant potentiellement associée aux changements de communautés. Ces résultats indiquent que les pesticides et leurs produits de dégradation ne semblent pas générer de changements significatifs de la diversité des communautés bactériennes de la nappe, sur la base des échantillons étudiés et de l'approche utilisée.

Au cours de l'année 2, la recherche de bio-indicateurs microbiens du métabolisme du métolachlore s'est également poursuivie.

5.2. BIOINDICATEURS MICROBIENS DU METABOLISME DU METOLACHLORE

Des cultures d'enrichissement bactériennes ont été mises en place pour **l'étude spécifique des bactéries impliquées dans le métabolisme du métolachlore et des gènes correspondants** (rapport BRGM/RP-62056-FR).

Une analyse bioinformatique des bases de données de séquences disponibles, y compris celles de génomique et de métagénomique microbienne, a permis le dessin d'amorces oligonucléotidiques correspondant à de brèves séquences conservées et correspondants aux **familles d'enzymes des glutathion S-transférases (GST), de la catéchol dioxygénase et des amidases**.

Plusieurs paires d'amorces (PmF and PmR, OaF and OaR, StrepF and StrepR) ont été conçues pour amplifier différents sous-ensembles de GST bactériennes et d'étudier leur lien possible avec l'exposition au métolachlore et/ou la dégradation du métolachlore dans la nappe de l'Ariège (Illustration 65). Les séquences de protéines de deux représentants de la classe bêta de la GST de *Proteus mirabilis* (PmGST) et *Ochrobactrum anthropi* (OaGST) et un représentant Gram positif de la GST bactérienne de la classe XI (souche *Streptomyces avermitilis* MA-4680, ci-après appelé StrepGST) ont été choisis comme référence pour concevoir les amorces. La séquence protéique du gène *cmeH* de l'amidase de *Sphingobium quisquiliarum* potentiellement impliqués dans la dégradation de l'acétochlore a été utilisé en tant que séquences protéiques de référence pour concevoir des amorces ciblant le gène *cmeH* et ses homologues.

Les paires d'amorces ont été testées et leur amplification par PCR a été optimisée à partir d'ADN extrait de souches bactériennes utilisées comme contrôle positif (i.e. contenant les séquences de référence utilisées pour la conception des paires d'amorce) (Illustration 65). Concernant la paire d'amorces CmeH, une souche contenant une protéine homologue a été utilisée car aucune souche de référence n'a pu être obtenue. Pour la paire d'amorces CatA ciblant le gène 1,2- catéchol dioxygénase, l'ADN utilisé comme contrôle positif provient d'une souche affiliée à *Pseudomonas stutzeri*.

5.3. DISCUSSION SUR LES RESULTATS OBTENUS POUR LES MICRO-ORGANISMES SOUTERRAINS

Concernant l'approche microbiologique, les développements méthodologiques et expérimentaux ont permis d'évaluer des bio-indicateurs microbiens tant au niveau structurel (signature du gène de l'ARN 16S) qu'au niveau fonctionnel (étude des gènes impliqués dans le métabolisme du métolachlore).

Un protocole pour l'étude spécifique de la microflore microbienne des eaux de nappe par une approche PCR – T-RFLP a été développé, validé et appliqué à l'étude des communautés bactérienne de la nappe de l'Ariège. L'évaluation du lien entre les concentrations en pesticides, en produits de dégradation et en ions sur la dynamique structurelle de la microflore microbienne suggère que la présence de pesticides n'influence pas de façon significative la dynamique structurelle de la microflore microbienne de la nappe. L'étude statistique de la relation entre la dynamique de la communauté bactérienne et les caractéristiques physico-chimiques des eaux de la nappe en incorporant systématiquement les profils bactériens correspondant aux puits 151>60>117>230>224 est en cours pour l'ensemble des campagnes. L'étude sur l'ensemble des campagnes réalisées permettra d'identifier des déterminants potentiellement associées à ces changements dans ce gradient de contamination, dont le métolachlore et ses métabolites.

Des cultures d'enrichissement bactériennes ont permis l'étude spécifique de bactéries impliquées dans le métabolisme du métolachlore et des gènes correspondants. Des amorces oligonucléotidiques correspondant à de brèves séquences conservées et correspondants à différentes familles d'enzymes impliquées dans le métabolisme du métolachlore ont été conçues et utilisées aussi bien sur des souches de références que des échantillons environnementaux pour permettre la détection qualitative et quantitative de gènes fonctionnel d'intérêt par PCR. Ces tests moléculaires spécifiques au métabolisme du métolachlore pourront être utilisés aussi bien à partir des échantillons d'eau de la nappe, des échantillons de sols agricoles ou d'échantillons issus de cultures microbiennes pour évaluer le potentiel de dégradation *in situ* du métolachlore et d'autres herbicides de la famille des chloroacétanilides.

6. Premières conclusions et perspectives du projet

A l'issue de la deuxième année de cette étude qui se déroule sur 3 années, plusieurs faits marquants peuvent être soulignés. Les faits marquants obtenus en année 1 sont présentés dans le rapport BRGM/RP-62056-FR.

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).

Le suivi mensuel réalisé sur 17 points d'eau montre que **pour les eaux souterraines** (315 échantillons analysés) des molécules nouvellement recherchées dans le projet ELISE sont quantifiées. Il s'agit notamment du glyphosate et de son métabolite AMPA, ainsi que de produits de transformation du métolachlore (notamment le métolachlore morpholinone, le deschlorométolachlore et l'hydroxymétolachlore). On notera aussi que des molécules historiquement recherchées ont été un peu plus quantifiées comme le métazachlore. Les molécules les plus fréquemment quantifiées et concernant la presque totalité des points d'eau souterraines restent la déséthylatrazine, l'acide éthane sulfonique du métalochlore puis la simazine, l'atrazine, la désisopropyltriazine et un troisième groupe constitué de l'acide oxanilique du métalochlore, l'acide éthane sulfonique de l'alachlore et le métolachlore.

Pour les 3 points d'eau de surface, les données sont un peu moins nombreuses puisqu'à ce stade cela représente 37 échantillons pour seulement 3 points d'eau. Si l'ordre établi suivant les fréquences de quantification est un peu différent entre les eaux de surface et les eaux souterraines, la plupart des molécules (parmi les 25 les plus quantifiées) est commune. En revanche, d'autres ressortent un peu plus. Il s'agit par exemple de l'isoproturon ou d'autres métabolites dits neutres des chloroacétanilides.

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.

La réalisation sur 3 sites dits expérimentaux de piézomètres en flûte de pans a permis d'une part d'améliorer la connaissance de la géologie (logs détaillés), les caractéristiques hydrodynamiques (pompages d'essais et traçage pour le site de Villeneuve du Paréage) et le prélèvement d'eau à des niveaux spécifiques de la nappe. Les premières analyses en produits phytosanitaires semblent indiquer une variabilité des concentrations sur une verticale à une date donnée et une évolution temporelle pouvant être importante. Suivant les molécules et les périodes, la concentration maximale ne semble pas nécessairement être observée dans la partie supérieure de l'aquifère. Ces observations seront complétées en année 3.

Parallèlement à ces investigations d'autres approches de géochimie et de géochimie isotopique ont été mises en œuvre à différentes échelles spatiales et temporelles, à l'échelle de la plaine

en octobre 2012 pour voir les relations entre les cours d'eau majeurs et la nappe et au niveau du « modèle réduit » de la nappe en juin 2013 pour voir les relations eau de surface-eau souterraine mais aussi les relations entre les différentes terrasses alluviales. **A l'échelle de la plaine, à la date de la campagne**, une contribution à l'Hers Vif dans sa partie aval des cours d'eau autochtones de la plaine et/ou d'eau souterraine a pu être mise en évidence. A l'inverse, les faibles variations observées sur l'Ariège d'amont en aval semble indiquer une absence ou une faible contribution des cours d'eau ou d'un drainage de la nappe. Pour le modèle réduit de la nappe alluviale (sous-secteur Les Pujols – Gappia), les terrasses alluviales présentent des signatures contrastées. De la même façon les eaux de surface et les eaux souterraines présentent des caractéristiques différentes. L'examen de l'ensemble des données complétées par le suivi hebdomadaire va permettre à l'issue de projet de mieux définir les échanges eau de surface-eau souterraine et leurs impacts sur la qualité des eaux.

Afin d'appréhender l'impact des pesticides sur différents organismes, des expérimentations d'exposition ont débuté en année 1 et se sont poursuivies en année 2 à la fois en conditions contrôlées de laboratoire et en conditions naturelles.

En laboratoire, **des tests d'exposition** destinés à évaluer la toxicité aiguë, chronique et génétique ont été effectués pour les métabolites ESA et OXA du métolachlore en complément des informations obtenues en année 1 pour la substance mère, le S-métolachlore sur **le modèle amphibien *Xenopus laevis***. L'exposition des larves de Xénope aux métabolites ESA et OXA du S-métolachlore n'entraîne ni toxicité aiguë (mortalité) ni chronique (croissance) en condition de laboratoire (ISO, 2006). En revanche, les résultats montrent une génotoxicité significative chez les larves exposées à l'OXA (avec effet dose) et une absence d'effet chez celles exposées à l'ESA. Des tests d'exposition de Xénopes ont également été réalisés en utilisant des eaux prélevées sur 7 sites différents présentant une qualité variable en complément des résultats obtenus en année sur 3 sites. Tout comme l'exposition à l'OXA et l'ESA, **l'exposition aux eaux des sites naturels n'entraîne pas de mortalité chez les larves de Xénope**. Cependant, les résultats montrent que dans le seul cas des deux sites 23 et 117, les larves présentent un taux de croissance significativement différent de celles exposées aux eaux des deux références (T⁻ et site 230). On observe une toxicité génétique significativement différente de celle du témoin négatif (T⁻) et du site 230 (eau de référence) chez les larves exposées à l'eau du site 23. Le facteur explicatif reste toutefois à déterminer.

Les populations naturelles d'amphibiens ne semblent pas affectées par les contaminants présents dans leur milieu de reproduction. Leur état sanitaire paraît bon. Cependant une différence significative de taille chez le triton palmé a été mesurée l'année précédente. L'action des contaminants pourrait donc davantage s'établir au niveau de la croissance des individus après la métamorphose. En l'état de nos connaissances, il est impossible de conclure car les fortes doses de contaminants sont observées en fin de saison de reproduction alors qu'une grande partie des individus ont déjà quitté les points d'eau.

Cette seconde année a permis pour les amphibiens (1) d'estimer la faisabilité et de valider plusieurs protocoles (comportement, asymétrie fluctuante), (2) de récolter des échantillons à analyser et (3) de concevoir des approches expérimentale en conditions contrôlées afin d'appréhender plus finement la sensibilité du métolachlore et de ses dérivés sur les populations d'amphibiens.

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* a été réalisée en juillet 2013 en en complément de la 1^{ère} campagne réalisée en septembre 2012. Les mêmes puits ont été étudiés. La disponibilité d'un nombre suffisant d'individus souterrains est apparue comme un point bloquant. Les expositions

n'ont ainsi pu être réalisées qu'avec une espèce de surface, le Gammarun Ariegi. Il apparaît que les activités humaines induisent une dégradation des qualités environnementales de la nappe de la plaine de l'Ariège qui se traduit par une dégradation de l'état de santé des Crustacés sentinelles implantés dans les puits. Cette dégradation est plus marquée dans la partie centrale de la nappe que celle très amont. Cette dégradation est aussi plus marquée en hautes eaux qu'en basses eaux (données 2012 et 2013).

Pour les macro-organismes, les tests de toxicité aiguë réalisés en laboratoire en année 1 pour le S-métolachlore notamment montrent que les espèces souterraines sont plus résistantes que les espèces de surface. Des expérimentations complémentaires ont été réalisées pour évaluer l'effet synergétique ou antagoniste du S-métolachlore avec la dééthylatrazine, métabolite de l'atrazine. Le choix de ce mélange est basé sur la présence presque ubiquiste de la dééthylatrazine dans les eaux souterraines de la plaine. Il apparaît que la toxicité des deux molécules étudiées (un herbicide, le S-métolachlore et un métabolite d'herbicide, la dééthylatrazine) est très faible pour les quatre espèces de Crustacés aquatiques considérées dans cette étude. Elle est toutefois variable selon les espèces. Les teneurs observées dans la nappe de l'Ariège ne devraient pas induire de mortalité aiguë de la faune souterraine, mais peut-être induire des effets chroniques et un affaiblissement des populations.

L'étude de la distribution spatiale des macro-organismes souterrains s'appuie sur une vaste campagne de collecte des individus réalisée en janvier 2012. L'année 2 a permis la finalisation de l'identification visuelle des individus. Si l'on compare la faune échantillonnée en 2012 aux faunes récoltées par Dumas en 1999 et Janiaud en 2003, des différences marquées apparaissent : i) deux copépodes hypogés récoltés en 1999 et 2003 (*Graeteriella unisetigera* et *Graeteriella* sp.) ne sont pas retrouvés, alors que deux espèces (*Diacyclops belgicus* et *Ceuthonectes gallicus*) apparaissent dans la collection de 2012. L'espèce *Diacyclops languidoides*, observée en 1999 est sans doute un synonyme de *Diacyclops paolae* récoltée en 2012 ii) Quatre espèces d'Amphipodes (*Niphargus robustus*, *N. gineti*, *Salentinella gineti* et *Ingolfiella thibaudi*) présentes en 1999 ne sont pas retrouvées en 2012, alors que trois espèces apparaissent dans la collection de 2012 (*Niphargus forelli*, *N. ciliatus* et *Salentinella major*). Ces différences sont sans doute liées à deux causes principales. D'une part, la zone d'étude de 2012 est différente de celle explorée en 1999, puisque des puits ont été échantillonnés en 2012 dans la plaine alluviale de l'Hers qui n'avait pas été explorée en 1999 et 2003. D'autre part, il semble que des changements faunistiques soient intervenus entre ces deux périodes pour les puits proches de l'Ariège. Il semble difficile pour le moment d'attribuer ces changements faunistiques à des modifications de la qualité du milieu.

En complément de l'identification morphologique et/ou anatomique, **la méthode du « code barre ADN » est appliquée**. Des contraintes techniques identifiées en année 1 ont été levées. Une nouvelle technique d'amplification de l'ADN a été développée permettant ainsi d'accroître le nombre d'individus séquencés. Ainsi un total de 318 individus a été extrait et amplifié à l'aide des amorces du combo D. Aucun résultat interprétable n'a été obtenu pour 64 individus, probablement dû à une mauvaise qualité de l'ADN. Parmi les 254 individus ayant fonctionné, 198 ont été identifiés visuellement comme appartenant au groupe *kochianus* et cette identification a été confirmée pour 165 individus (taux d'erreur, $T_e = 17.7\%$). 45 individus ont été identifiés visuellement comme appartenant à un des autres groupes (majoritairement *ciliatus*) et cette identification a été confirmée pour 35 spécimens (taux d'erreur, $T_e = 23\%$, les 10 individus mis-classifiés étant moléculairement attribués au groupe *kochianus*).

Pour l'étude des populations de *Niphargus Kochianus*, la constitution d'une banque microsattellites est nécessaire. Elle se heurte à plusieurs échecs qui vont sûrement conduire à l'abandon de cette piste de travail.

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 en année 1. Il a été décliné sur les échantillons d'eau souterraine collectés depuis mai 2012 et plus spécifiquement sur 5 puits dits d'intérêt car présentation des contaminations contrastées tant du point de vue du cocktail de substances rencontrées que des gammes de concentrations observées. L'examen statistique des données montre que la présence de pesticides, même en mélange, ne semble pas influencer la dynamique structurelle de la microflore microbienne de la nappe. Le deuxième volet concerne la **recherche d'un marqueur fonctionnel** lié au métabolisme du métolachlore qui pourrait être utilisé à terme comme bio-indicateur. Des tests moléculaires spécifiques au métabolisme du métolachlore ont été développés et pourront être utilisés aussi bien à partir des échantillons d'eau de la nappe, des échantillons de sols agricoles ou d'échantillons issus de cultures microbiennes pour évaluer le potentiel de dégradation *in situ* du métolachlore et d'autres herbicides de la famille des chloroacétanilides.

A l'issue des deux premières années de projet, plusieurs avancées significatives peuvent être mentionnées (développement analytique, réalisation des tests de toxicité en laboratoire sur différentes espèces, 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 à l'issue de la dernière année du projet. L'acquisition de données complémentaires et la compilation de l'ensemble des données permettront de mieux appréhender la dynamique de transferts des contaminations, leur devenir mais aussi leur potentiel impact sur les écosystèmes souterrains et de surface.

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.

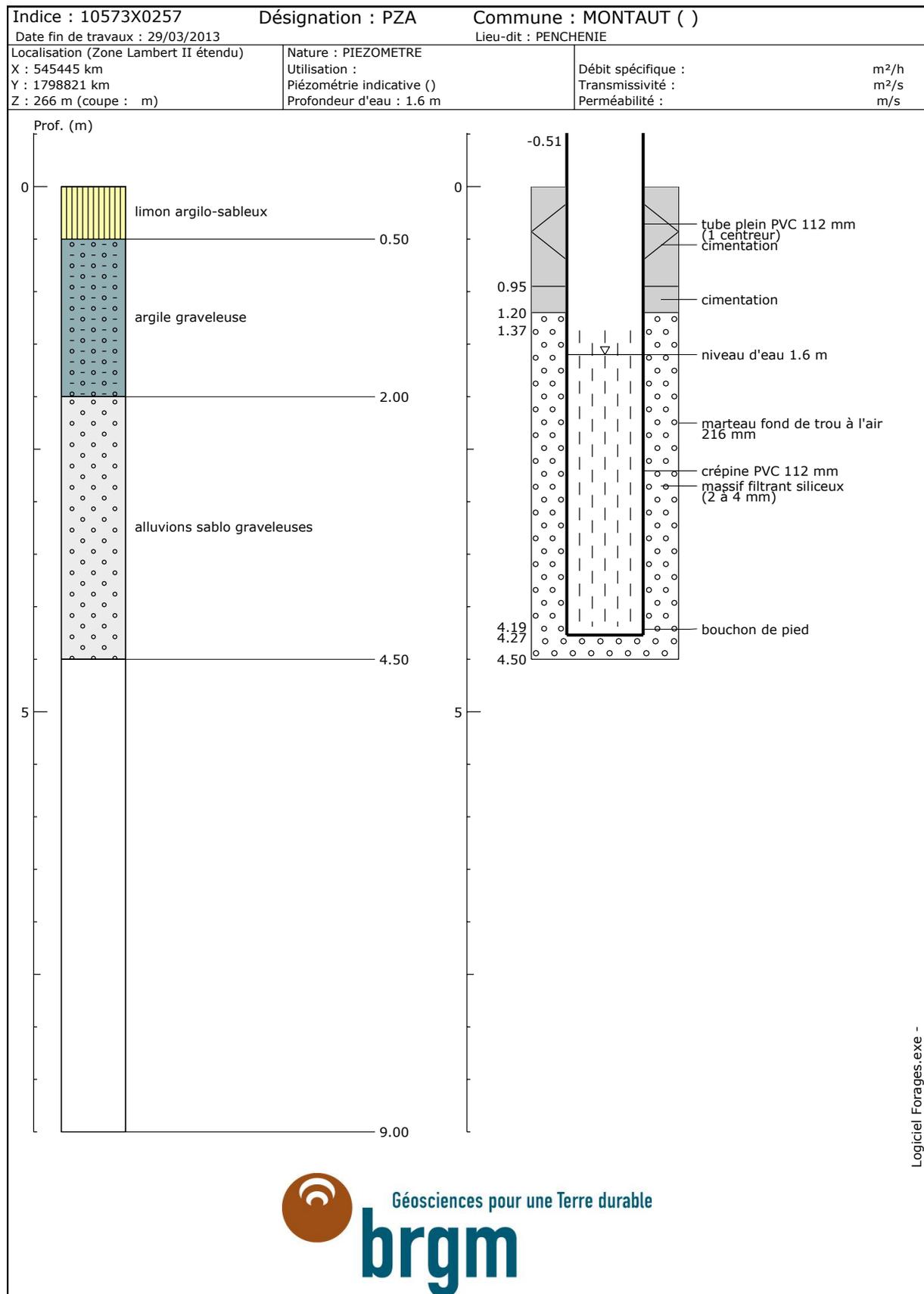
Polard T., 2011. Caractérisation des effets génotoxiques sur poissons de produits phytosanitaires en période de crue. Thèse de l'Université Paul Sabatier, p177.

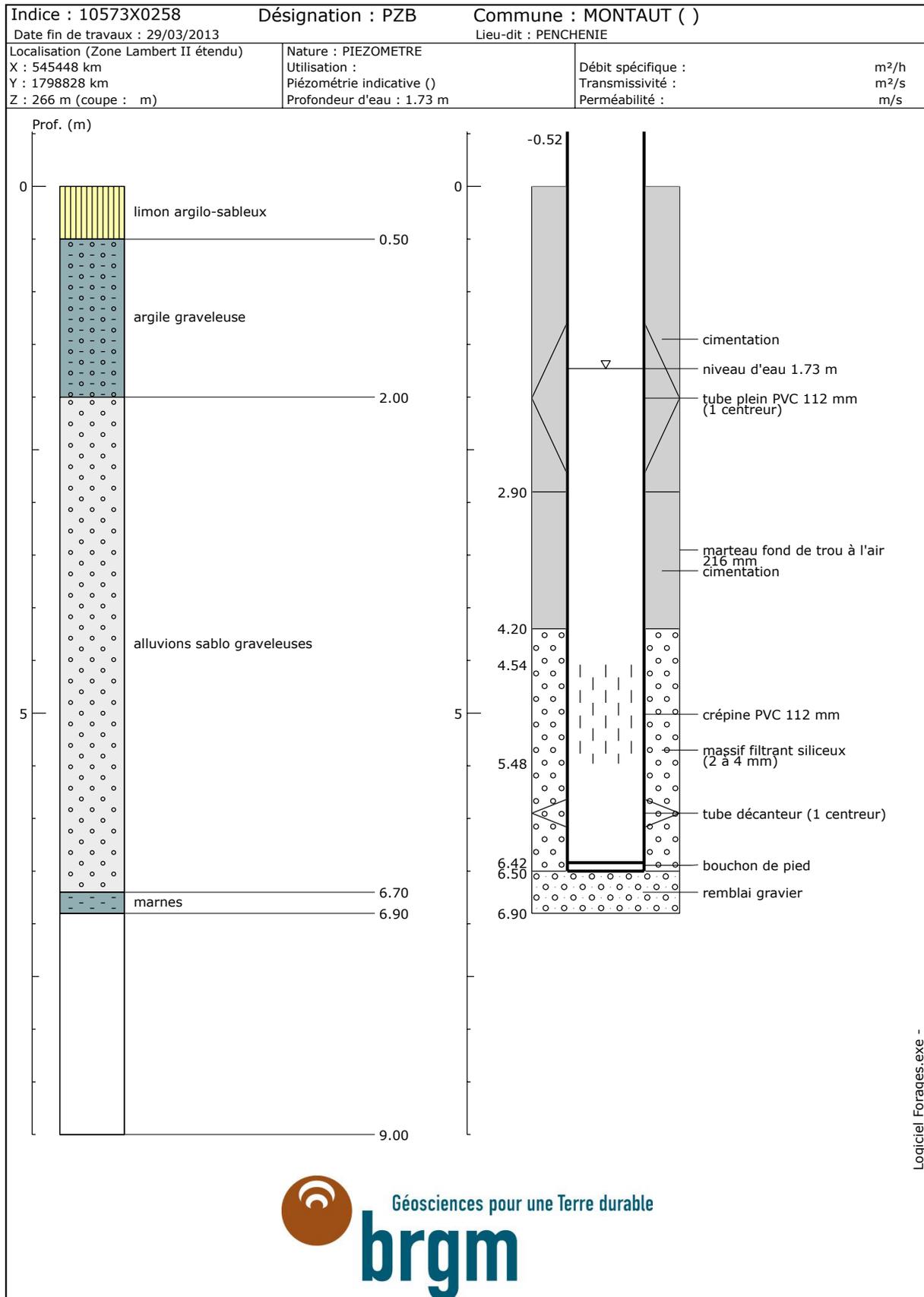
Sankula S., Lin J., Odenkirchen E., Khan F., 2010. Risks of Metolachlor and S-Metolachlor Use to Federally Threatened Delta Smelt (*Hypomesus transpacificus*) and California Tiger Salamander (*Ambystoma californiense*) (Central California Distinct Population Segment) and Federally Endangered Sonoma County 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.

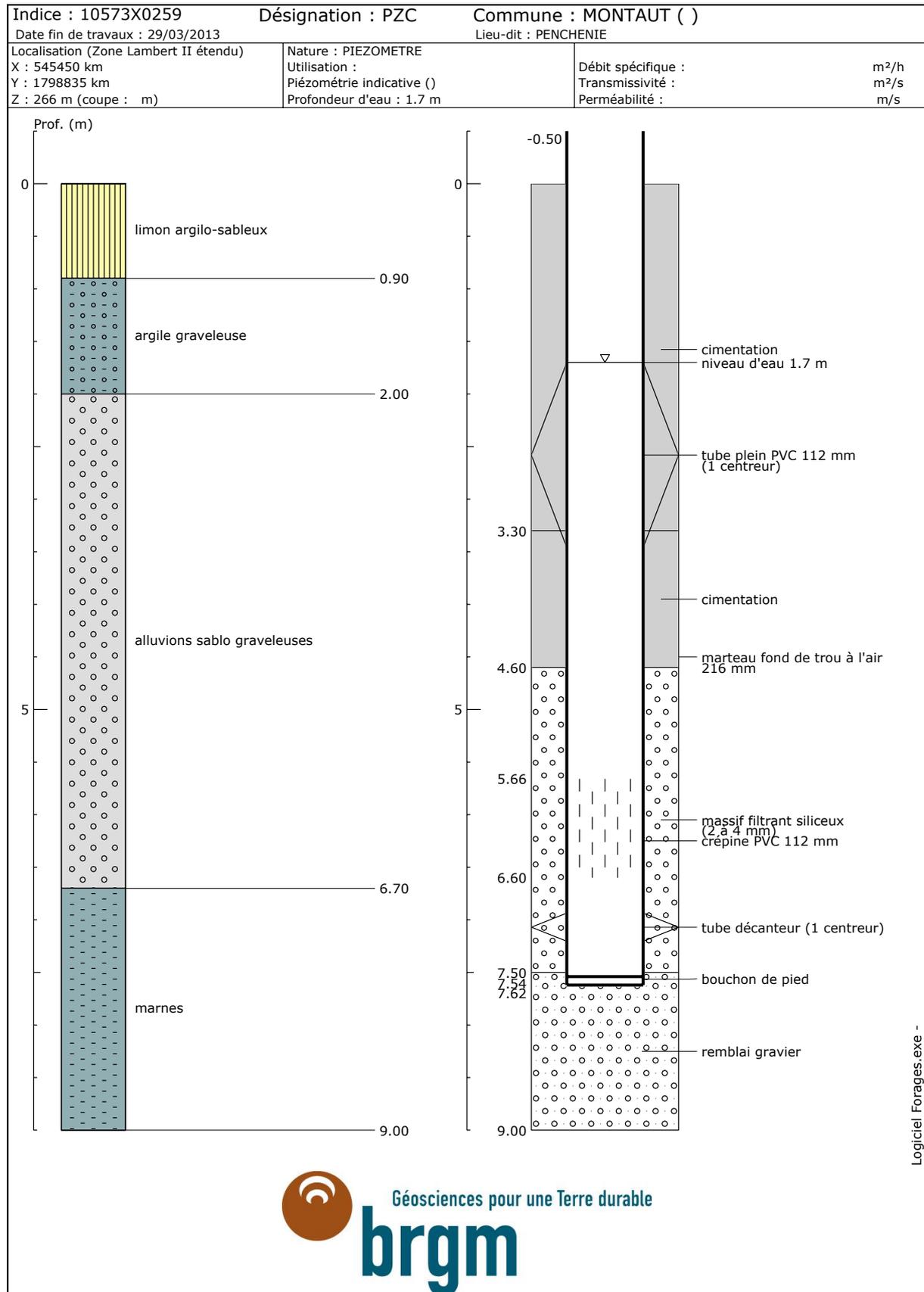
Steyermark A.C., 2002. A high standard metabolic rate constrains juvenile growth. *Zoology* 105 : 147–151.

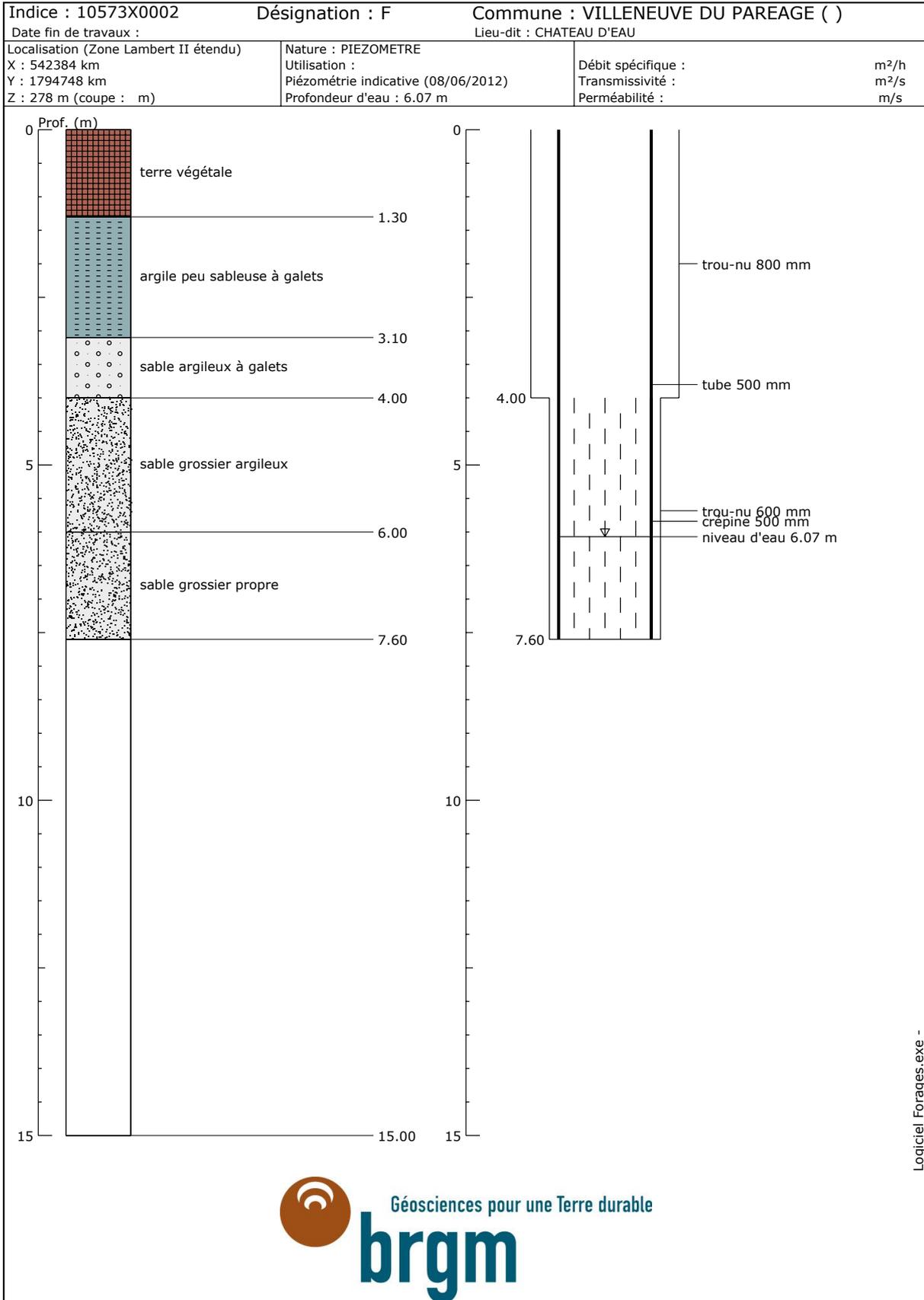
Annexe 1

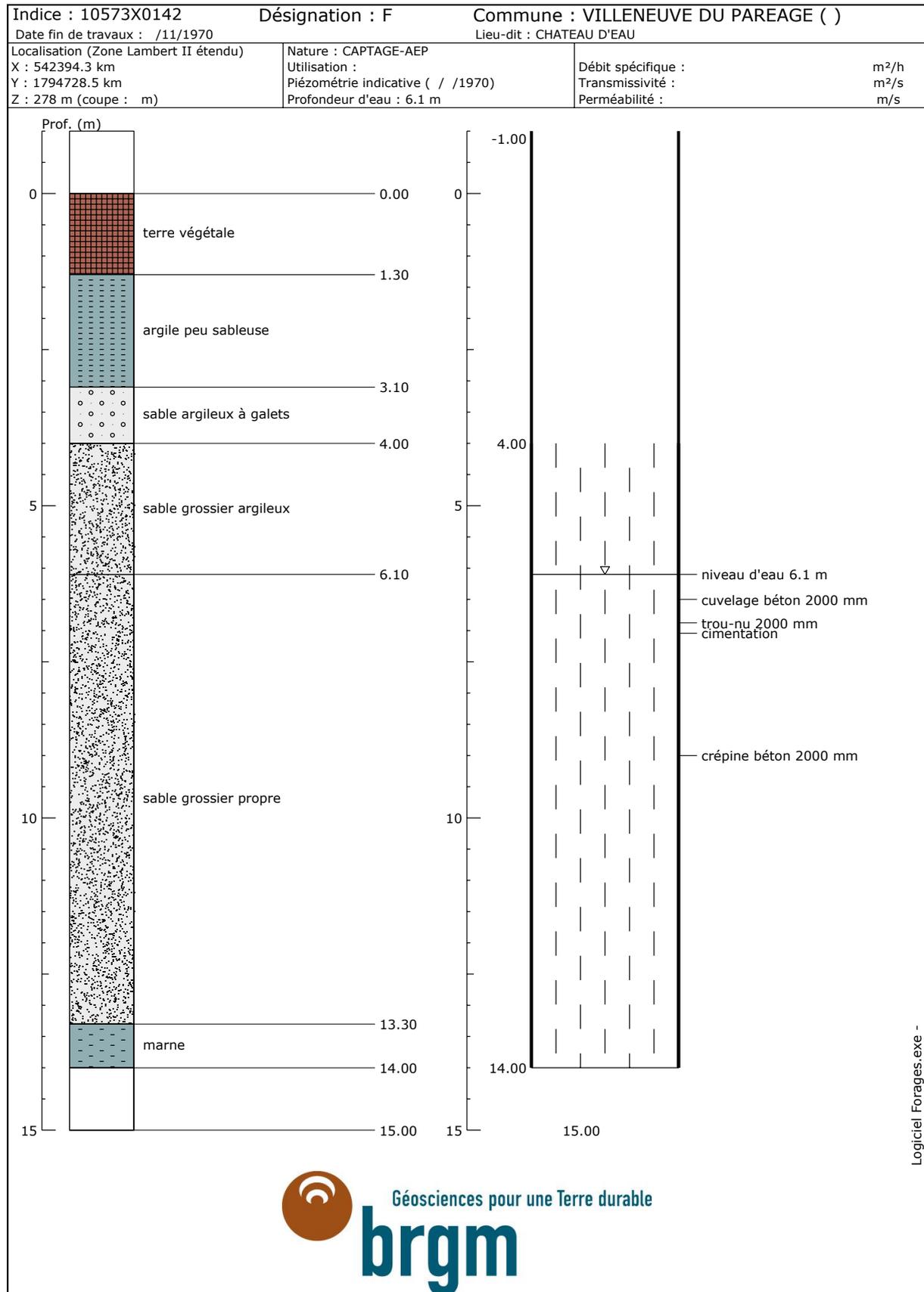
Coupes techniques et géologiques des piézomètres forés

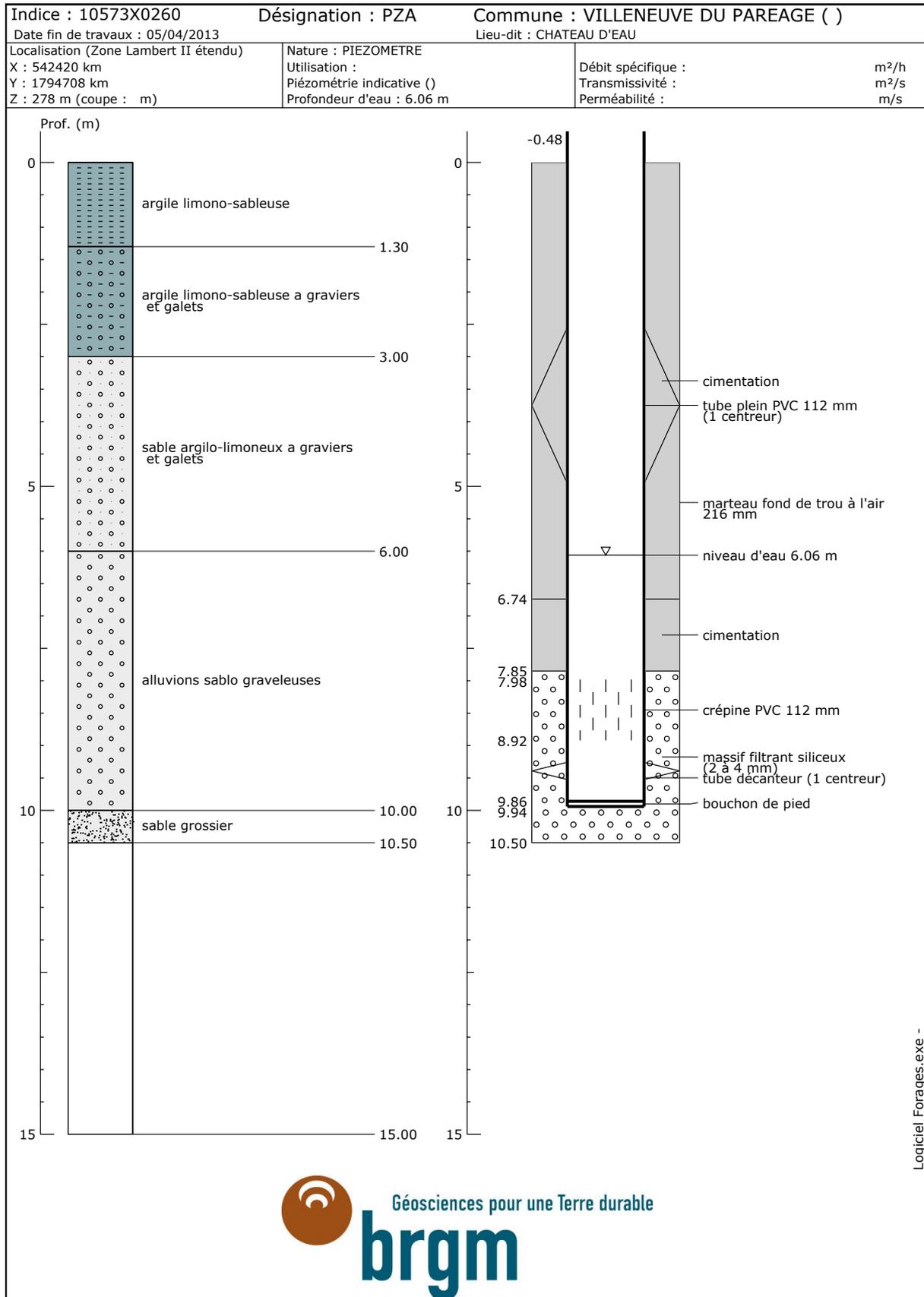


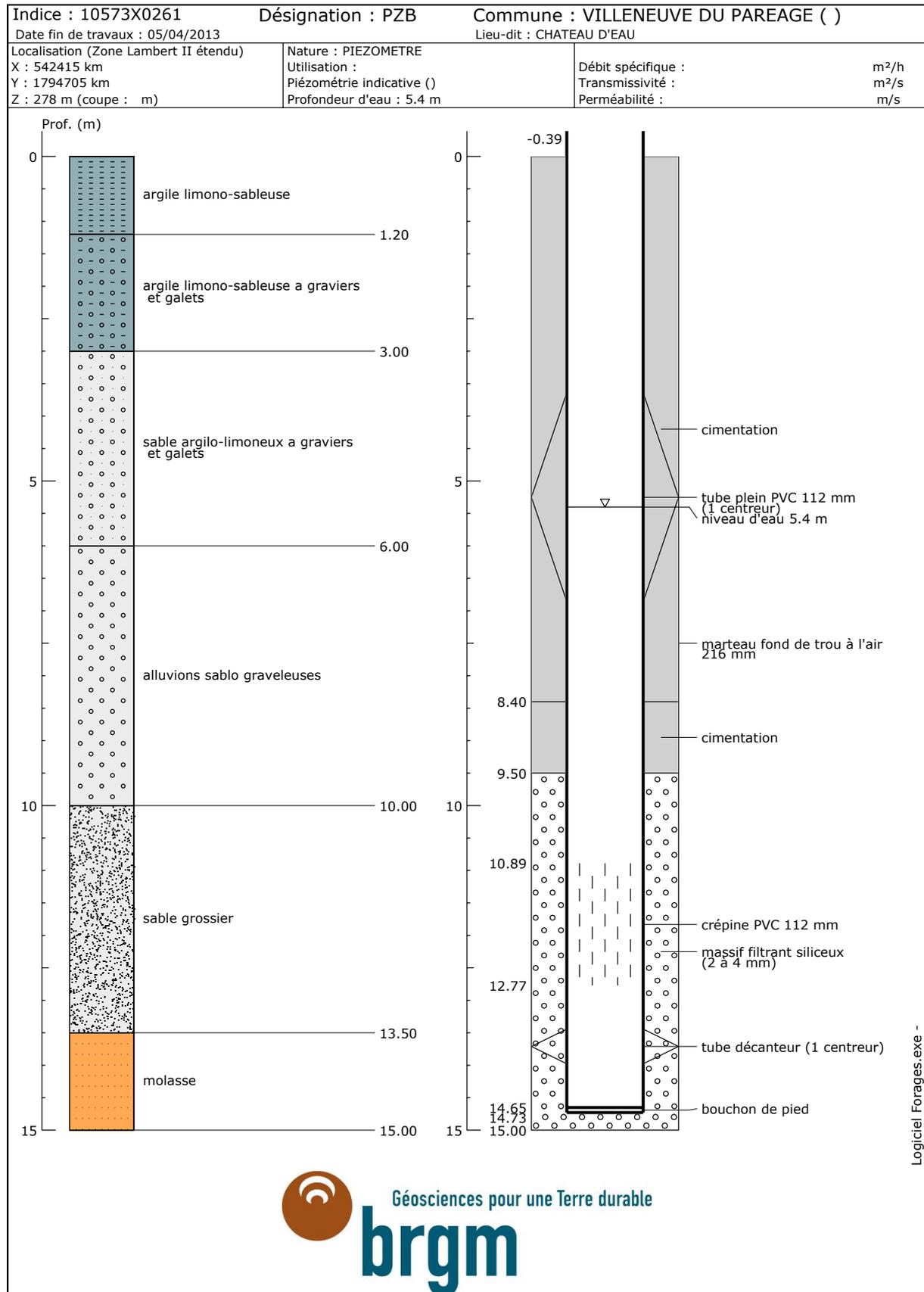


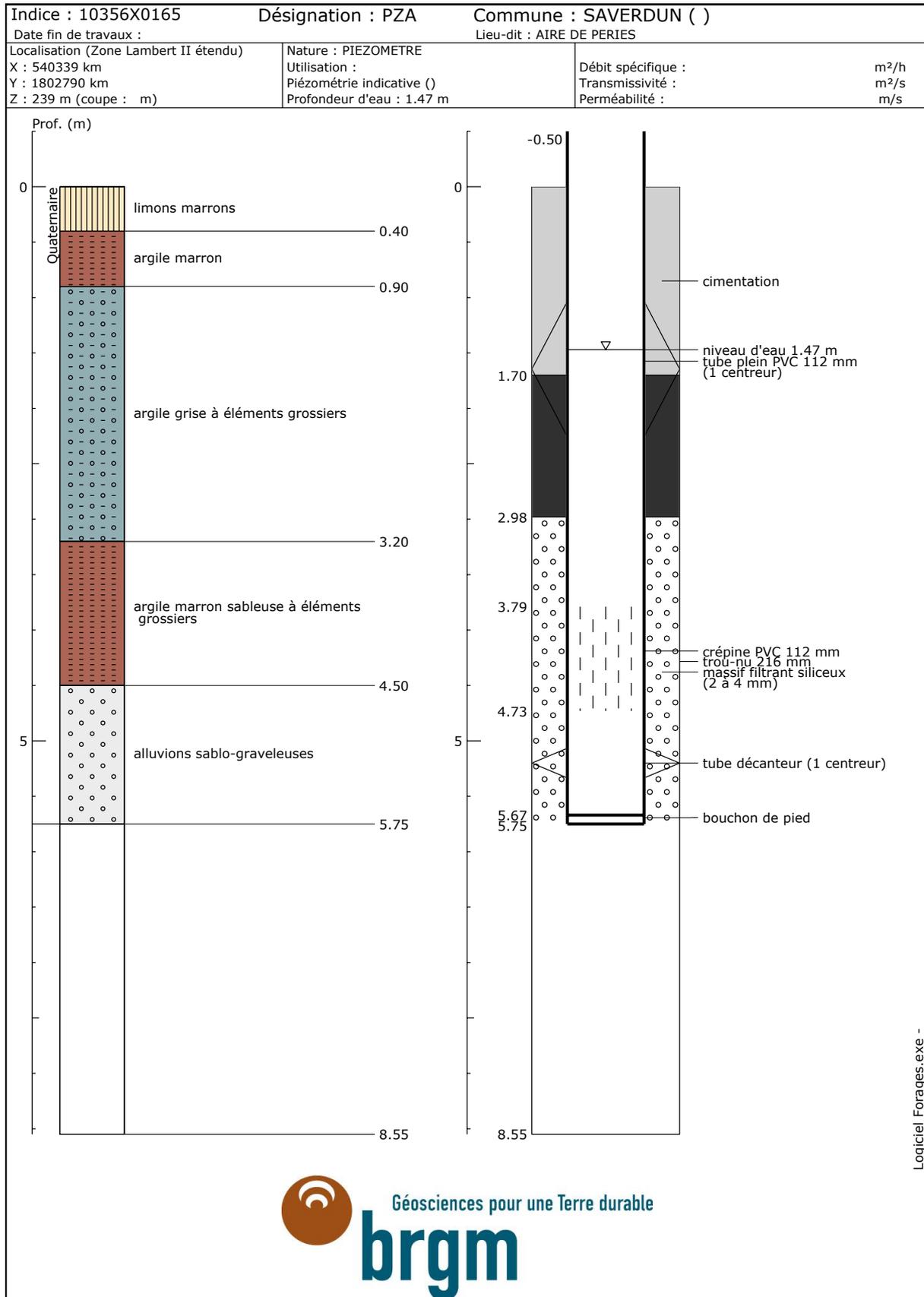


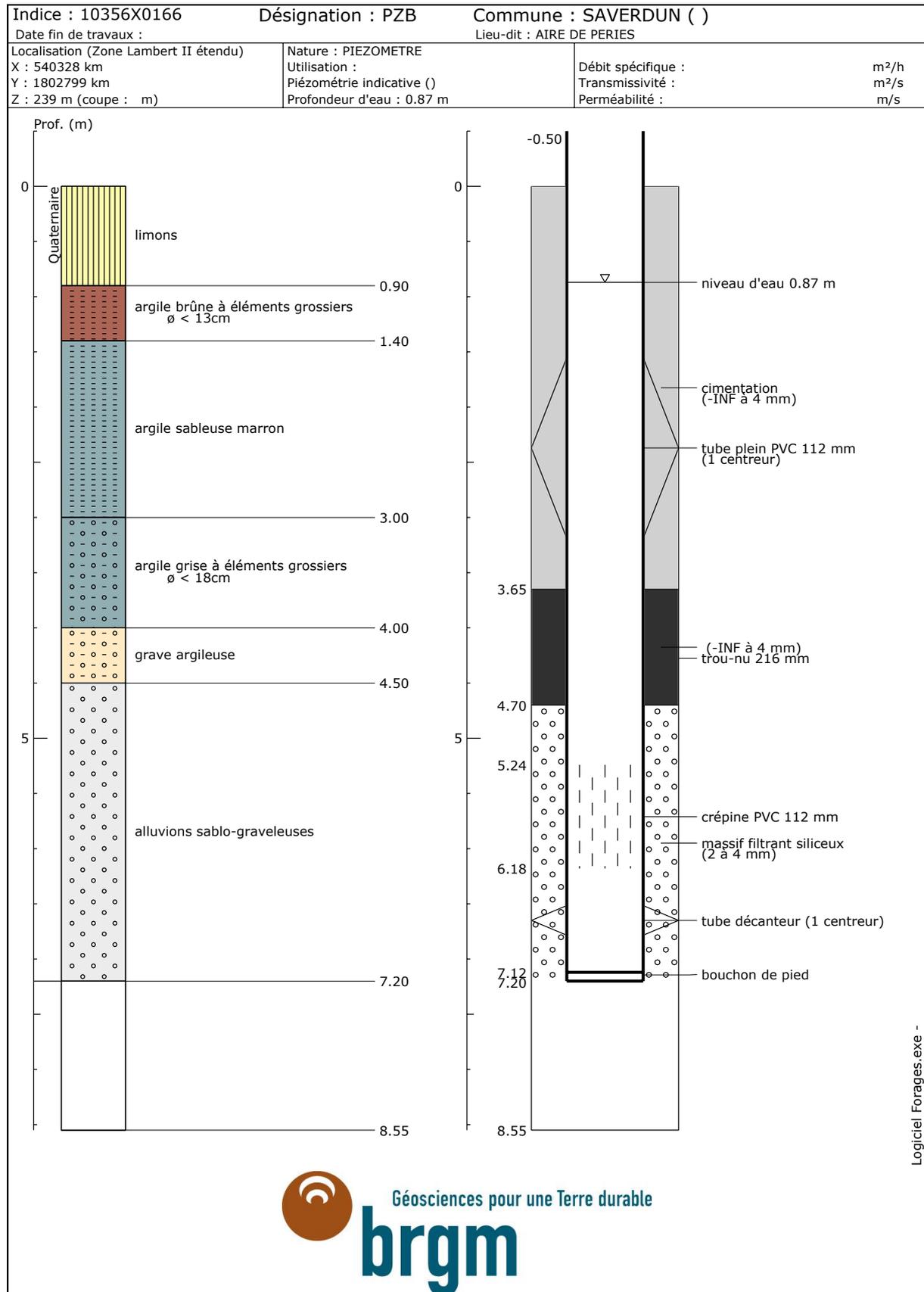


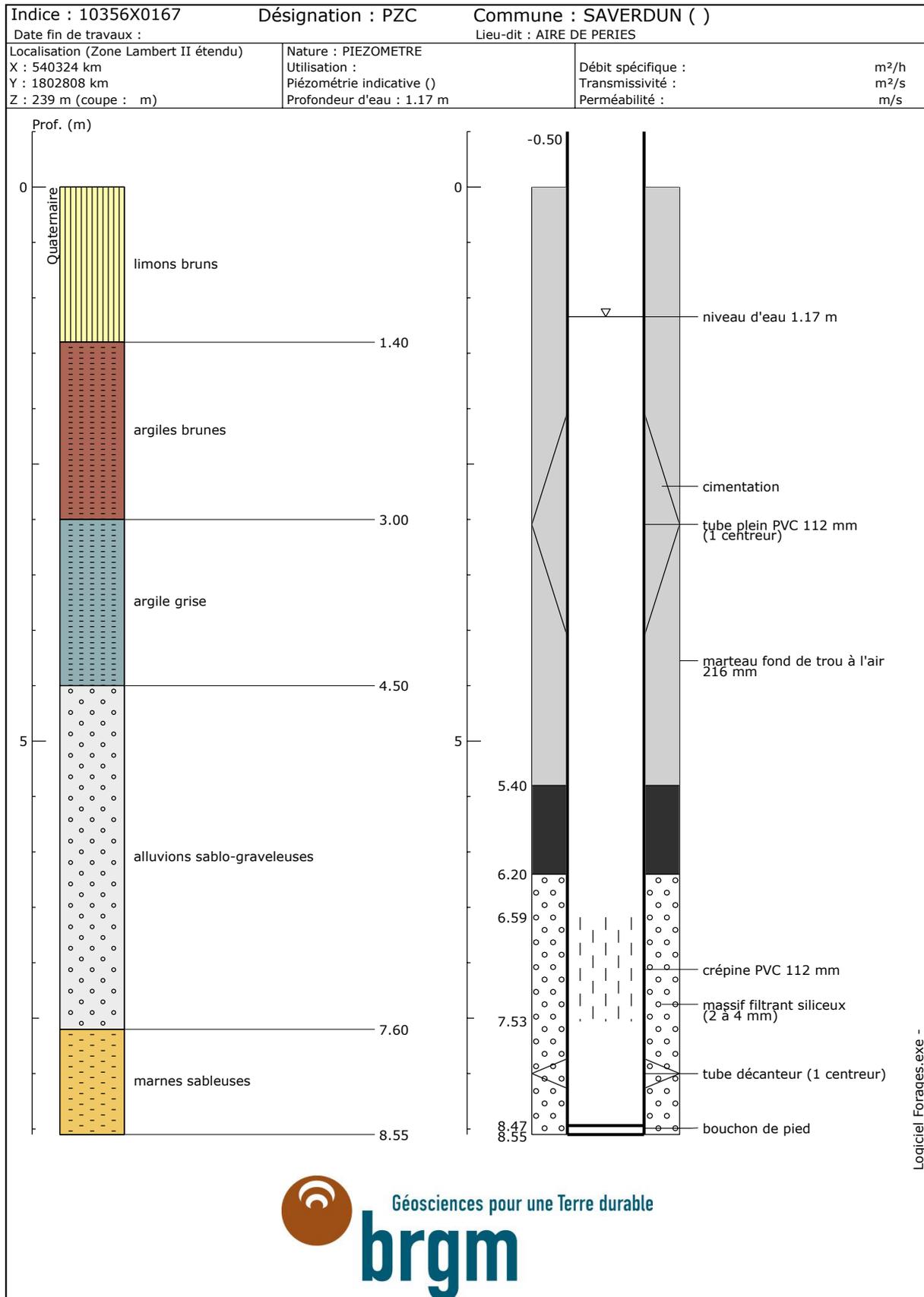














Géosciences pour une Terre durable

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