HAL
open science

Caractérisation de l'exposition des écosystèmes aquatiques à des produits phytosanitaires : spéciation, biodisponibilité et toxicité.Exemple du cuivre dans les eaux de ruissellementde parcelles viticoles (Roujan, Hérault, France).

Rodolphe Gilbin

▶ **To cite this version:**

Rodolphe Gilbin. Caractérisation de l'exposition des écosystèmes aquatiques à des produits phytosanitaires : spéciation, biodisponibilité et toxicité.Exemple du cuivre dans les eaux de ruissellementde parcelles viticoles (Roujan, Hérault, France).. Autre. Université Montpellier I; University of Geneva, 2001. Français. NNT : . tel-00011143v2

HAL Id: tel-00011143

https://theses.hal.science/tel-00011143v2

Submitted on 5 Dec 2005

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

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

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Section des sciences de la Terre
Institut F.-A. Forel

FACULTE DES SCIENCES
Professeur Walter Wildi

UNIVERSITÉ MONTPELLIER 1
Département Sciences de l'Environnement
et Santé Publique

U.F.R. PHARMACEUTIQUES
Professeur Claude Casellas

Caractérisation de l'exposition des écosystèmes aquatiques à des produits phytosanitaires : spéciation, biodisponibilité et toxicité.

Exemple du cuivre dans les eaux de ruissellement de parcelles viticoles (Roujan, Hérault, France).

THÈSE
en cotutelle

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention interdisciplinaire
et
présentée à l'Université Montpellier 1
pour obtenir le titre de docteur de l'Université Montpellier 1,
spécialité biologie des populations et écologie

par
Rodolphe GILBIN
(France)

Thèse N° 3315

GENÈVE
Atelier de reproduction de la Section de physique
2001

La Faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs W. WILDI, professeur ordinaire (Section des sciences de la Terre, Institut F.A. Forel) et C. CASELLAS, professeur (Université Montpellier 1, France) codirecteurs de thèse, P. ANDRIEUX, docteur (Université Montpellier 1, France), Madame J. GARRIC, docteur (*Cemagref* – Lyon, France), Messieurs F. ARIESE, professeur (Vrije Universiteit - Amsterdam, The Netherlands), P. ARRIZABALAGA, professeur (Service scientifique de l'environnement - Genève) et M. PARDOS, docteur (Section des sciences de la Terre, Institut F.A. Forel), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 20 décembre 2001

Thèse - 3315 -

Le Doyen, Jacques WEBER

Gilbin, R. : Caractérisation de l'exposition des écosystèmes aquatiques à des produits phytosanitaires : spéciation, biodisponibilité et toxicité. Exemple du cuivre dans les eaux de ruissellement de parcelles viticoles (Roujan, Hérault, France).

Terre & Environnement, vol.x, XXIII + 192 pp. (2001)

ISBN 2-940153-xx-x

Section des sciences de la Terre, Institut F.A. Forel, Université de Genève,
10 route de Suisse, CH-1290 Versoix, Suisse.
Téléphone +41 (0) 22 950 9210, Téléfax +41 (0) 22 755 1382
email : wyss@terre.unige.ch

Ce mémoire est le résultat d'un travail de thèse effectué en cotutelle,
suite à un *Accord de coopération pour la mise en œuvre d'une cotutelle de thèse* signé le 2 décembre 1998
entre l'Université de Genève (Suisse)
et l'Université Montpellier 1 (France).

Ce mémoire de thèse est par conséquent déposé conjointement à
l'Université Montpellier 1 (France)
et à l'Université de Genève (Suisse),
en conformité avec la réglementation en vigeur
en France (*arrêté du 25 septembre 1985*)
et à l'Université de Genève (*Règlement et plas d'études, 1998*).

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail effectué à Genève et Montpellier, je voudrais remercier les personnes qui ont eu la gentillesse de m'aider et de me soutenir.

Tout d'abord je remercie mes deux co-directeurs de thèse, Madame le Professeur Claude Casellas (Département Sciences de l'Environnement et Santé Publique à l'Université Montpellier 1), et Monsieur le Professeur Walter Wildi (directeur de l'Institut F.-A. Forel, Université de Genève) qui m'ont fait profiter de leurs visions complémentaires indispensables dans ce travail interdisciplinaire et ont su me guider pour mener à terme mon travail.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur Philippe Arrizabalaga (directeur du Service Scientifique de l'Environnement de l'État de Genève) sans qui cette collaboration franco-suisse n'aurait pas vu le jour.

Mes remerciements vont au Docteur Michel Pardos, à qui je dois de nombreux conseils avertis. Son éloignement du domaine de la recherche en écotoxicologie est pour nous tous un grand manque. Je lui souhaite bonne chance dans sa nouvelle carrière.

Je remercie le Docteur Patrick Andrieux (ingénieur de recherche au laboratoire Sol et Environnement de l'INRA de Montpellier), dont les conseils et les connaissances du site de Roujan m'auront été très utiles. Je le remercie d'avoir accepté de juger ce mémoire.

Je remercie le Docteur Jeanne Garric (directrice du Laboratoire d'écotoxicologie au Cemagref de Lyon) et le Docteur Freek Ariese (Department of Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Vrije University, Amsterdam) d'avoir accepté d'être rapporteurs et de juger ce travail.

J'exprime ma grande gratitude à Monsieur le Professeur Janusz Dominik, qui m'a permis de participer au Projet FNSRS 1999-2001 (Fonds National Suisse de Recherche Scientifique) n° 2000-057189 *« Partition of trace metals and their bioavailability in continental surface water »*.

Ma reconnaissance va au Docteur Philippe Hinsinger, qui a dirigé le programme PNETOX 1999-2001 (Programme National de Recherche en Écotoxicologie en France) « Spéciation, biodisponibilité et toxicité du cuivre dans les sols et les sédiments d'un bassin versant viticole en Languedoc-Roussillon ».

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Jean Bontoux et Monsieur le Professeur André Rambaud pour m'avoir accueilli au Département Sciences de l'Environnement et Santé Publique à l'Université Montpellier I. Je remercie tout particulièrement le Docteur Elena Gomez et le Docteur Hélène Fenet qui ont toujours été disponibles pour me donner conseil. Je remercie David Rosain sans qui le laboratiore ne serait pas ce qu'il est, ainsi que Dominique Bardos. Enfin, merci aux doctorants du laboratoire pour leur soutien : Joëlle Paing, Laurence Chantoiseau, Pascal Pagand et Aurélie Devez qui a pris en charge depuis son DEA la mise en place de la DPASV.

Je remercie le Docteur Françoise Elbaz-Poulichet (Laboratoire Hydrosciences, Maison des sciences de l'eau de Montpellier) pour ses conseils dans le domaine de la biogéochimie des métaux et de l'arsenic. Je la remercie aussi grandement, ainsi que Jean-Luc Seidel, pour m'avoir permis d'effectuer dans leur laboratoire les analyses de spéciation de l'arsenic par HG-ICP-MS et la quantification des ions majeurs par électrophorèse capillaire.

Je remercie chaleureusement le Docteur Françoise Persin (Institut Européen des membranes de Montpellier) pour son aide dans le domaine de la spéciation chimique des métaux et de l'électrochimie.

Tous mes remerciements au Docteur Catherine Aliaume-Zerbi (Université Montpellier 2), qui m'a guidé pour l'analyse statistique des données de l'étude de terrain.

Je remercie au laboratoire Sol et Environnement de l'INRA de Montpellier les personnes qui m'ont permis de profiter des équipements disponibles sur le bassin versant expérimental de Roujan et m'ont fait part de leurs nombreuses connaissances : le Docteur Marc Voltz, le Docteur Xavier Louchart, Guillaume Coulouma ainsi que Gaëlle Rolland, Angélique Adivèze.

A l'Institut F.-A. Forel, j'aimerais exprimer ma reconnaissance au Docteur Pierre-Yves Favarger qui m'a fait découvrir les subtilités de l'analyse des métaux traces en conditions propres par ICP-MS. Je remercie les personnes ayant participé au projet FNSRS pour leurs conseils : le Docteur Jean-Luc Loizeau, Philippe Arpagaus et les doctorants avec qui des discussions constructives m'ont permis d'avancer dans la réflexion : Tamara Dvorak, Davide Vignati, Patrick Rossé et en particulier Brahim Koukal avec qui j'ai partagé le laboratoire d'écotoxicologie et Céline Guéguen dont les connaissances en chimie des métaux et des colloïdes nous ont valu quelques heures de discussions intenses. Je remercie aussi les diplômants du DESNE et les doctorants qui ont croisé ma route dans les couloirs étroits mais chaleureux de « Forel », en particulier Pascale Michallet-Ferrier et Daniel Obrist. Enfin, je remercie Madame Françoise Wyss, Madame « Forel », sans qui nous serions bien perdus dans les méandres des démarches administratives.

Enfin, je voudrai exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont eu la gentillesse de me conseiller tout au long de mon travail, et m'ont fait partager leurs connaissance en particulier lors des comités de pilotage de thèse : le Docteur Annette Bérard (INRA d'Avignon), le Docteur Kevin Wilkinson (CABE, Université de Genève) et le Docteur Pascale Nirel (Service cantonal d'écotoxicologie de Genève).

RESUME

Les pollutions diffuses d'origine agricole dues aux produits phytosanitaires sont souvent mises en cause dans la pollution des eaux de surface et des eaux souterraines. En viticulture, le cuivre est encore largement utilisé comme fongicide, associé à des pesticides organiques. Le climat méditerranéen favorise un ruissellement et une érosion des sols viticoles, les rendant très propices aux transferts des polluants vers les eaux de surface. Des eaux de ruissellement de parcelles viticoles ont été prélevées et analysées pour l'étude de la spéciation, la biodisponibilité et la toxicité du cuivre. La méthodologie adoptée a eu pour but de caractériser l'exposition au cuivre par rapport aux autres produits phytosanitaires issus du traitement des vignes. L'effet toxique *in vitro* du cuivre en conditions contrôlées et dans les eaux de ruissellement a été évalué sur des organismes aquatiques (bactérie *Vibrio fischeri*, algue *Pseudokirchneriella subcapitata*) et a permis de valider les effets observés par rapport aux concentrations en ion libre calculé. Les producteurs primaires étant une cible privilégiée dans le cadre de la contamination par le cuivre, l'effet sur *Pseudokirchneriella subcapitata* a été évalué à différents niveaux (croissance, intégrité membranaire, activité photosynthétique, activité estérasique) afin de mieux comprendre les mécanismes de toxicité mis en jeu, et a montré que la croissance est l'indicateur le plus sensible vis à vis de la toxicité du cuivre. Les effets observés ont été interprétés en fonction de la spéciation chimique du cuivre dans les eaux : caractérisation physico-chimique et fractionnement par taille (matières en suspension, colloïdes), modélisation de la spéciation (MINEQL+), évaluation du potentiel de mobilisation du cuivre de la fraction particulaire vers la fraction dissoute. Enfin, l'effet toxique des complexes métalliques lipophiles, qui constitue une exception au modèle de biodisponibilité de l'ion libre, a été étudié en conditions contrôlées. Cette double approche (caractérisations physico-chimiques et influence de la spéciation des polluants sur la toxicité *in vitro*) a permis de déterminer les paramètres influents dans le transfert du cuivre et la toxicité dans les eaux de ruissellement : le type de sol des parcelles, les caractéristiques de la pluie et les types d'apports de produits phytosanitaires (cuivre, arsenic, Diuron).

Mots clés

produit phytosanitaire, viticulture, ruissellement, climat méditerranéen, pollution diffuse, cuivre, spéciation, biodisponibilité, toxicité, complexe métallique lipophile, bioessai

ABSTRACT

Diffuse pollution due to the application of pesticides is often blamed for groundwater and surface water pollution. In vine growing, copper is still largely used as a fungicide, associated with organic pesticides. The Mediterranean climate leads to runoff and erosion of agricultural fields, favourising the transfer of the pollutants towards surface water. Runoff waters of vineyards were taken and analysed for the study of speciation, bioavailability and toxicity of copper. The purpose of the methodology was to characterise the exposure to copper compared to the other pesticides used in vines treatment. Toxic effects of copper under controlled conditions and in the samples was evaluated on aquatic organisms (bacteria *Vibrio fischeri*, algae *Pseudokirchneriella subcapitata*) and allowed us to validate the observed effect with free-ion concentrations. The primary producers being a privileged target within the framework of the contamination by copper, effects on *Pseudokirchneriella subcapitata* were evaluated at various levels (growth, membrane integrity, photosynthetic activity, esterasic activity) in order to improve the comprehension of the toxicity mechanisms. Test results indicate that growth inhibition is the most sensitive endpoint. The observed effects are interpreted according to the chemical speciation of copper in water : physicochemical characterisation and size fractionation (suspended matter, colloids), modelling of chemical speciation (MINEQL+), evaluation of the potential of mobilisation of the copper from particles. The toxic effect of lipophilic metal complexes, which constitutes an exception to the free ion activity model for bioavailability, was also studied under *in vitro* conditions. This combined approach (physicochemical characterisation and influence of the speciation of the pollutants on *in vitro* toxicity) allowed us to identify the parameters that determine transport and toxicity of copper in runoff waters : soil type, rain characteristics and the pesticide application (copper, arsenic, Diuron).

Keywords

pesticide, vine growing, runoff, Mediterranean climate, diffuse pollution, copper, speciation, bioavailability, toxicity, lipophilic metal complex, biotest

TABLE DES MATIERES

Remerciements ..... *V*

Résumé ..... *VII*

Abstract ..... *VIII*

Table des matières ..... *IX*

Liste des tableaux ..... *XIII*
Liste des figures ..... *XV*
Liste des équations ..... *XVII*
Liste des abréviations ..... *XIX*

Introduction Générale ..... *XXI*

Objectifs généraux ..... *XXIII*

CHAPITRE 1 *Rappels bibliographiques* *1*

1.1 *Les métaux traces dans l'environnement* *2*
1.1.1 Généralités 2
1.1.2 Cas du cuivre 4
1.2 *Le cuivre dans les eaux de ruissellement viticoles* *5*
1.2.1 Généralités sur les pesticides 6
1.2.2 Pollution diffuse des eaux de surface 7
1.2.3 Généralités sur le cuivre en tant que produit phytosanitaire de la vigne 7
1.3 *Toxicité des métaux traces pour les organismes aquatiques* *8*
1.4 *Biodisponibilité des métaux dans les écosystèmes aquatiques* *10*
1.4.1 Le modèle de l'activité de l'ion libre 11
1.4.2 Les complexes lipophiles des métaux 13
1.5 *Spéciation des métaux en milieu aquatique* *16*
1.5.1 Complexation 18
1.5.2 Précipitation 18
1.5.3 Adsorption 19
1.6 *Méthodes de spéciation des métaux dans les milieux aquatiques* *20*
1.6.1 Spéciation des formes dissoutes 20
1.6.2 Spéciation des formes particulaires 27
1.7 *Mesure de la toxicité des métaux traces pour les organismes aquatiques* *30*
1.7.1 Biotests sur des micro-organismes 31

CHAPITRE 2 Matériel et Méthodes 37

2.1 Site d'étude : le bassin versant expérimental de Roujan ... 37
2.1.1 Bilan des connaissances sur le bassin versant ... 37
2.1.2 Prélèvements ... 44
2.1.3 Détermination des caractéristiques des crues ... 47
2.2 Pratiques de laboratoire ... 48
2.3 Caractérisation physico-chimique ... 48
2.3.1 Matières en Suspension (MES) ... 48
2.3.2 Colloïdes ... 49
2.3.3 Paramètres généraux : pH, conductivité, alcalinité ... 49
2.3.4 Carbone Organique Dissous (COD) ... 49
2.3.5 Cations ... 50
2.3.6 Anions ... 50
2.3.7 Métaux traces ... 50
2.3.8 Extractions aqueuses et organiques des MES ... 54
2.4 Biotests ... 56
2.4.1 Bactérie ... 56
2.4.2 Algue ... 57
2.5 Analyses statistiques ... 61
2.5.1 Validation des données ... 61
2.5.2 Expression de la toxicité ... 62
2.5.3 Corrélations et Analyses multivariées ... 63

CHAPITRE 3 Effet des métaux sur des organismes aquatiques en conditions contrôlées 65

Prise en compte de la spéciation chimique pour interpréter les résultats des biotests ... 65
3.1 Effet du cuivre sur l'algue Pseudokirchneriella subcapitata ... 66
3.1.1 Quantification de la biomasse algale : validation d'une alternative au comptage cellulaire ... 66
3.1.2 Comparaison de la toxicité du cuivre évaluée par les différents indicateurs d'effet ... 70
3.1.3 Implications pour l'utilisation du biotest ... 72
3.2 Influence du milieu d'ajustement osmotique pour le biotest bactérien ... 74
3.2.1 Toxicité du cuivre ... 74
3.2.2 Toxicité du zinc ... 77
3.2.3 Toxicité du cadmium ... 77
3.2.4 Toxicité du plomb ... 77
3.2.5 Conclusions ... 78
3.3 Biodisponibilité des complexes lipophiles des métaux ... 79
3.3.1 Résultats ... 80
3.3.2 Discussion ... 88
3.3.3 Conclusion ... 91
3.4 Conclusions générales du chapitre ... 92

CHAPITRE 4 Étude des eaux de ruissellement de parcelles viticoles 95

4.1 Caractérisation du ruissellement sur la parcelle sur sol carbonaté ... 96
4.2 MES et cuivre associé ... 100
4.2.1 Répartition granulométrique des MES ... 100
4.2.2 Éléments majeurs constitutifs des MES ... 103
4.2.3 Métaux traces dans les MES ... 104
4.2.4 Spéciation du cuivre dans les MES ... 104
4.2.5 Toxicité des extraits des MES et implications pour l'exposition des écosystèmes aquatiques récepteurs ... 107

4.3 Éléments dissous 107
4.3.1 Matrice des ions majeurs 108
4.3.2 Utilisation de produits phytosanitaires pendant la période d'étude 110
4.3.3 Concentrations moyennes en métaux traces et pesticides 111
4.3.4 Dynamique des contaminants au cours d'une crue 115
4.3.5 Spéciation du cuivre dissous 116
4.3.6 Toxicité dans la fraction dissoute 119
4.4 Conclusions générales du chapitre 126

CHAPITRE 5 Conclusions et perspectives 129

5.1 Utilisation de bioessais pour identifier la toxicité des métaux en milieux multicontaminés ... 129
5.2 Détection des complexes lipophiles dans l'environnement 130
5.3 Identification des mécanismes de biodisponibilité 131
5.4 Cuivre et produits phytosanitaires en viticulture 131

Communications issues de la thèse 133

Bibliographie 135

Annexes 153

Annexe 1 : Diagrammes de spéciation de l'oxine et du DDC avec les métaux en fonction du pH dans l'eau pure et les milieux utilisés pour les biotests 155
Annexe 2 : Prélèvements d'eaux de ruissellement effectués sur l'ensemble de la période d'étude 158
Annexe 3 : Caractéristiques de la pluie, du ruissellement et paramètres globaux de la fraction dissoute du ruissellement à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté 159
Annexe 4 : Eléments majeurs dans la fraction dissoute du ruissellement à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté 160
Annexe 5 : Contaminants dans la fraction dissoute du ruissellement à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté 161
Annexe 6 : Caractéristiques générales de la fraction particulaire du ruissellement à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté 162
Annexe 7 : Contaminants dans la fraction particulaire du ruissellement à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté 163
Annexe 8 : Description des produits phytosanitaires et nombre d'applications en 1999 et 2000 sur la parcelle à sol carbonaté (enquête auprès de l'agriculteur – P. Andrieux, INRA Montpellier) 164
Annexe 9 : Caractéristiques des eaux de ruissellement de la parcelle à sol acide 165
Annexe 10 : Analyse en composantes principales à partir des analyses physico-chimiques des eaux de ruissellement des deux parcelles étudiées 166
Annexe 11 : Annalyses détaillées des eaux de ruissellement d'avril à juin 2000 prélevés à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté 167

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des métaux et distribution dans l'environnement (Duursma and Carroll, 1996 ; Guéguen, 2001 ; INERIS, 2001). 4

Tableau 2 : Sensibilité des organismes d'eau douce et marins au cuivre, en laboratoire, par exposition aiguë ou chronique (Hall *et al.*, 1998). 10

Tableau 3 : Aperçu des possibilités des méthodes non électrochimiques pour la mesure des espèces labiles des métaux dans les eaux naturelles. Traduit de l'anglais d'après Apte and Batley (1995). 23

Tableau 4 : Aperçu des schémas de spéciation des métaux dans la phase dissoute basés sur l'utilisation en combinaison de plusieurs techniques. 26

Tableau 5 : Aperçu des schémas d'extractions séquentielles des métaux dans la phase particulaire. (Tessier *et al.*, 1979 ; Salomons and Förstner, 1980 ; Welte *et al.*, 1983 ; Morrison and Revitt, 1987 ; Lara-Cazenave *et al.*, 1994 ; Warren and Zimmerman, 1994). 29

Tableau 6 : Activités enzymatiques ou biosynthèses utilisés comme indicateurs d'effets toxiques aigus. D'après Bitton and Morel (1997). 34

Tableau 7 : Poids des variables d'exposition et d'effet dans l'évaluation des risques pour les eaux de surface et les eaux souterraines du bassin versant de Roujan avec la méthode SIRIS (Jouany, 1995 ; Louchart *et al.*, 1997). 43

Tableau 8 : Quantités de pesticides appliquées en 1995 sur le bassin versant d'après enquête (Louchart *et al.*, 1997). 43

Tableau 9 : Protocole d'attaque des MES au four micro-ondes. 51

Tableau 10 : Logarithme des constantes de complexation utilisées pour le calcul de la spéciation chimique avec oxine et diethyldithiocarbamate. 52

Tableau 11 : Protocole d'extraction séquentielle des métaux traces dans les MES (Tessier *et al.*, 1979). 55

Tableau 12 : Composition du milieu de culture algal : le milieu AAP (USEPA, 1989 ; USEPA, 1994). 58

Tableau 13 : Bruit de fond et valeurs de la culture algale dans les biotests en microplaque avec *Pseudokirchneriella subcapiata* effectués avec mesure de l'activité estérasique et d'intégrité membranaire. 70

Tableau 14 : Toxicité du cuivre (CE_{50}) pour l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* entre 1 et 72 h, évaluée par biotests en microplaques. Comparaison des effets sur la croissance, la fluorescence de la chlorophylle, l'activité estérasique et l'intégrité membranaire. 71

Tableau 15 : Toxicité du cuivre pour *Pseudokirchneriella subcapitata* dans le milieu AAP avec et sans EDTA. Relation avec les concentrations en ion libre. 73

Tableau 16 : Toxicité des métaux pour la bactérie marine *Vibrio fischeri* (I = 0.3mol/L ; pH = 5.5) sans ligand et avec 1 µmol/L d'oxine ou de DDC. 86

Tableau 17 : Toxicité des métaux pour l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* dans le milieu AAP_m (I = 0.001 mol/L ; pH = 7.5) avec et sans ligand lipophile (1 µmol/L d'oxine ou de DDC). 87

Tableau 18 : Rapport de toxicité des métaux avec l'oxine et le DDC pour la bactérie *Vibrio fischeri* (rapport des α) et l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* (rapport des CE_{50} 72h). 89

Tableau 19 : Calendrier cultural type de la vigne sur le bassin versant de Roujan (Louchart *et al.*, 1997). 110

Tableau 20 : Toxicité des eaux de ruissellement pour l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*. 121

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Classification des métaux traces (Tessier and Turner, 1995 ; Stumm and Morgan, 1996).....2
Figure 2 : Concentrations en cuivre dans les eaux continentales. 5
Figure 3 : Représentation schématique du rôle des agents complexants dans l'assimilation des métaux (M) par les organismes aquatiques (Buffle, 1988).....12
Figure 4 : Modèle du mécanisme d'incorporation de du complexe cuivre-oxine à travers le plasmalemme d'une cellule phytoplanctonique (Phinney and Bruland, 1994).....13
Figure 5 : Réactions entre les différentes formes des métaux (M) en milieu aqueux (Buffle, 1988).....17
Figure 6 : Spectre des tailles des particules en milieu aquatique et des tailles des pores des différents systèmes de filtration (Stumm and Morgan, 1996).....21
Figure 7 : Relation Concentration-Réponse type obtenue lors d'un bioessai.....31
Figure 8 : Pluie et évapotranspiration potentielle (ETP Penman) quotidiennes moyennes relevées sur le bassin versant de Roujan en 1999.....38
Figure 9 : Situation du bassin versant expérimental de Roujan dans la vallée de l'Hérault *(d'après le catalogue des domaines hydrogéologiques Languedoc Roussillon – Midi Pyrénées. Agence de bassins Rhône-Méditerranée-Corse, 1983)* et représentation spatiale (parcellaire, réseau routier et de fossés) avec situation des parcelles étudiées (INRA Montpellier). 39
Figure 10 : Système de prélèvement à l'exutoire de la parcelle instrumentée sur sol carbonaté (AW6). Photo INRA-Sciences du Sol, Montpellier.....45
Figure 11 : Système de partition et de stockage du ruissellement pour le prélèvement des échantillons moyens (Photo : Coulouma, 1998). 46
Figure 12 : Système de prélèvement ponctuel des eaux de ruissellement à la surface de l'inter-rang d'une parcelle viticole (parcelle sur sol acide). Photo A. Devez et R. Gilbin.....47
Figure 13 : Schéma de culture des algues en milieu solide et liquide. Adapté de Pardos (1996) selon la procédure USEPA (1989).....57
Figure 14 : Signification de la présentation des données en *« boxplots »*. 62
Figure 15 : Spectre d'absorption dans le domaine visible de *Pseudokirchneriella subcapitata*. 67
Figure 16 : Bruit de fond et valeurs de la culture algale dans les biotests en microplaque avec *Pseudokirchneriella subcapiata* effectués avec mesure de l'absorbance (a) et de la fluorescence (b). 69
Figure 17 : Toxicité du cuivre pour *Pseudokirchneriella subcapitata* reportée dans la littérature en exposition aiguë et chronique pour des tests en microplaques.(Haley *et al.*, 1986 ; Versteeg, 1990 ; Tubbing *et al.*, 1994 ; Van der Heever and Grobbelaar, 1996 ; Blaise *et al.*, 1998 ; Franklin *et al.*, 2001). 72
Figure 18 : Toxicité des métaux (CE_{50} avec intervalle de confiance, n = 6, P = 0.05) pour la bactérie *Vibrio fischeri* dans trois milieux d'ajustement osmotique. 75
Figure 19 : Structure des ligands utilisés pour former les complexes lipophiles des métaux. 80
Figure 20 : Diagrammes de spéciation, à pH = 4 à 14, des mélanges Cu + oxine (a), Cu + DDC (b), Zn + oxine (c), et Zn + DDC (d). Calculs effectués dans le milieu AAP_m (I = 0.001 mol/L), avec [Me] = 1 µmol/L et [L] = 2.2 µmol/L. 81
Figure 21 : Diagrammes de spéciation avec [Me] = 0.1 à 10 µmol/L. Calculs dans le milieu du biotest algal, AAP_m (pH = 7.5, I = 0.001 mol/L), avec [L] = 2.2 µmol/L.....83
Figure 22 : Influence de la présence d'oxine et de DDC sur l'effet du cuivre sur la bactérie *Vibrio fischeri,* entre 2 et 45 min. Inhibition de la bioluminescence à [Cu]t = 2.86 µmol/L. 85
Figure 23 : Influence de la présence d'oxine et de DDC sur l'effet du cuivre sur la bactérie *Vibrio fischeri,* entre 2 et 45 min. Régression inverse du premier ordre des concentrations totales en cuivre en fonction du TE_{50}. 85
Figure 24 : Organigramme de l'analyse du ruissellement des parcelles viticoles. 94

Figure 25 : Relation entre la pluie et le ruissellement à l'exutoire de la parcelle sur sol carbonaté.....97
Figure 26 : Répartition en « boxplot » des événement pluvieux de la période d'étude selon le volume de pluie. 97
Figure 27 : Pluie de janvier 1999 à juillet 2000, et concentrations moyenne en MES dans les eaux de ruissellement à l'exutoire de la parcelle sur sol carbonaté. Corrélation avec l'intensité maximale de la pluie pour chaque événement pluvieux. 97
Figure 28 : Corrélation entre l'intensité de la pluie, le ruissellement et la teneur en MES des eaux de ruissellement à l'exutoire de la parcelle sur sol carbonaté. Exemple de la crue du 16 avril 2000. 99
Figure 29 : Répartition granulométrique des MES dans les eaux de ruissellement à l'exutoire de la parcelle carbonatée. Comparaison avec d'autres analyses de MES et de sols sur le bassin versant. 101
Figure 30 : Caractéristiques des MES à l'exutoire de la parcelle carbonatée et des MES prélevées sur la parcelle acide. 102
Figure 31 : Spéciation des formes du Cu (crue 1/5/99) suivant le schéma d'extractions séquentielles de Tessier (Tessier *et al.*, 1979). 105
Figure 32 : Diagrammes de Piper des eaux de ruissellement de la parcelle à sol carbonaté (en grisé) et de la parcelle à sol acide (en noir) pour les années 1999(○) et 2000(△).....108
Figure 33 : Concentrations en ions majeurs dans les échantillons moyens des eaux de ruissellement sur sol carbonaté (1999) et sur deux types de sols (avril à juin 2000). 109
Figure 34 : Concentrations moyennes en cuivre, zinc et arsenic total dissous (fraction <1µm) dans les eaux de ruissellement de la parcelle sur sol carbonaté.....112
Figure 35 : Concentrations moyennes en cuivre, zinc et arsenic total dissous (fraction <1µm) dans les eaux de ruissellement de la parcelle sur sol acide.....113
Figure 36 : Concentrations moyennes en Simazine et Diuron total dissous (fraction <1µm) dans les eaux de ruissellement de la parcelle sur sol carbonaté.....114
Figure 37 : Dynamique du cuivre et de l'arsenic total dissous (fraction <1µm) dans les eaux de ruissellement de la parcelle à sol carbonaté. Crue du 16 avril 2000. 114
Figure 38 : Calcul de la spéciation chimique du cuivre dans les eaux prélevées sur les parcelles viticoles (sol carbonaté et sol acide), comparé à la spéciation chimique du cuivre dans les milieux utilisés pour les biotests. 117
Figure 39 : Concentrations en cuivre dans la fraction total dissoute (<1 µm) et ultracentrifugée (<20 nm) pour les crues d'été et automne 1999.....118
Figure 40 : Relation entre la toxicité (toxicité intrinsèque et toxicité du cuivre ajouté dans les échantillons non toxiques – CE_{50} pour *Pseudokirchneriella subcapitata*, test d'inhibition de la croissance en 72h) et la concentration en cuivre total dissous des eaux de ruissellement de la parcelle carbonatée.....120
Figure 41 : Toxicité du cuivre ajouté dans 6 crues non toxiques en 1999. Influence de la présence (<1 µm) ou de l'absence (<20 nm) de colloïdes. 123
Figure 42 : Influence de la présence des produits phytosanitaires dissous et des caractéristiques de la pluie sur les résultats de toxicité sur l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata.* 125

LISTE DES EQUATIONS

Équation 1 : Calcul de la constante de stabilité d'un complexe MeLn. 52
Équation 2 : Calcul de la constante d'acidité de l'espèce H_nL. 53
Équation 3 : Calcul du pourcentage d'inhibition de la bioluminescence (I_c) de la bactérie marine *Vibrio fischeri.* 56
Équation 4 : Calcul du pourcentage d'inhibition de l'activité de l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata.* 61
Équation 5 : Relation entre la concentration d'exposition en métal total dissous et le TE_{50} pour la bactérie marine *Vibrio fischeri.* 86
Équation 6 : Détermination des paramètres explicatifs des concentrations en cuivre dissous dans les eaux de ruissellement. 111
Équation 7 : Relation entre la concentration en cuivre et la CE_{50} du cuivre(en µg/L) ajouté dans les eaux de ruissellement non toxiques de la parcelle sur sol carbonaté.....122

LISTE DES ABREVIATIONS

AAP ..... *« algal assay procedure »*. Le milieu AAP correspond au milieu de culture pour *Pseudokirchneriella subcapitata.* L'abréviation AAP_m correspond au même milieu modifié (sans présence d'EDTA ni de fer) et AAP_{m+Fe} au milieu modifié avec fer (toujours sans EDTA). *Voir Chapitre Matériel et Méthodes.*

AFNOR..... association française de normalisation

APHA..... *« american public health association »* : association américaine de santé publique

ASTM ..... *« american society for testing and material »* : société américaine de standardisation des méthodes

ASV ..... *« anodic striping voltametry »* : voltamétrie à redissolution anodique

ATP..... adénosine triphosphate

BLM..... *« biotic ligand model »* : modèle du ligand biotique

CABE..... chimie analytique et biophysiochimie de l'environnement

CE_X ..... concentration effective (ou efficace) produisant une inhibition de X % de l'activité des organismes suivie, après un temps d'exposition donné et dans des conditions définies.

CEC..... capacité d'échange cationique

CLM..... complexes lipophiles des métaux

COD..... carbone organique dissous. Les mesures effectuées correspondent au NPOC mesuré par l'analyseur TOC

DDC..... diethyldithiocarbamate

DESNE..... diplôme en sciences naturelles de l'environnement

DGT ..... *« diffusion gradient in thin films » :* gradient de diffusion en films fins

DIN ..... *« deutsches institut für normung »* : institut allemand de normalisation

DME..... *« dropping mercury electrode »* : électrode à goutte de mercure tombante

DMSO..... diméthyle-sulfoxyde

DPASV ..... *« differential pulse ASV »* : ASV à tension différentielle surimposée

DTPA..... acide diéthylène triamine pentacétique

EDTA..... acide éthylène diamine tétracétique

ENH ..... électrode normale à hydrogène

ETP ..... évapotranspiration potentielle

et al. ..... « *et alli* » : et les autres

FDA ..... fluorescéine diacétate

FIAM ..... « *free-ion activity model* » : modèle d'activité de l'ion libre

FMN, FMNH ..... flavine mononucléotide (forme oxydée, forme réduite)

FNSRS ..... fonds national suisse de recherche scientifique

GSIM ..... *« gill surface interaction model »* : modèle d'interaction à la surface des branchies

HG-ICP-MS ..... ICP-MS avec génération d'hydrure

HMDE..... *« hanging mercury drop electrode » :* électrode à goutte de mercure pendante

I ..... force ionique

ICP-MS ..... *« inductively coupled plasma – mass spectrometry »* : plasma à haute fréquence couplé à un spectromètre de masse

INERIS..... institut national de l'environnement industriel et des risques (France)

INRA..... institut national de recherche agronomique (France)

IP..... iodure de propidium

ISE ..... *« ion selective electrode »* : électrode ionique sélective

IUPAC ..... *« international union of pure and applied chemistry »* : union internationale de chimie fondamentale et appliquée

K_{ow}..... coefficient de partage octanol/eau

LOEC ..... *« lowest observed effect concentration »* : concentration la plus faible pour laquelle un effet est observé

MES ..... matières en suspension

MON ..... matière organique naturelle (en anglais : NOM, *natural organic matter*)

NAD, NADH ..... nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée, forme réduite)

nd ..... non défini ou non déterminé : pas de donnée disponible

NOEC..... *« no observed effect concentration »* : concentration la plus forte sans effet observé

NPOC..... *« non-purgeable organic carbon » :* carbone organique non purgeable

OCDE..... organisation pour la coopération et le développement économique

p.a. ..... pour analyse (pureté des molécules utilisées)

PE..... polyéthylène

PP ..... polypropylène

PVC..... polychlorure de vinyle

SI..... système international d'unités (BIPM, 1998)

SIRIS..... système d'intégration des risques par interaction de scores

SMDE ..... *« static mercury drop electrode »* : électrode à goutte de mercure statique

SPE..... *« solid phase extraction »* : extraction en phase solide

TE_X..... temps effectif (ou efficace) produisant une inhibition de X % de l'activité des organismes suivie, avec une concentration donnée et dans des conditions définies.

TMFE..... *« thin mercury film electrode »* : électrode à film mince de mercure

TOC ..... *« total organic carbon »* : carbone organique total

UE ..... union européenne

URF..... unité relative de fluorescence

USEPA..... *« united states environmental portection agency » :* agence de protection de l'environnement aux USA

UV..... rayonnement ultraviolet

WER..... *« water effect ratio »* : rapport d'effet de l'eau

Les abréviations d'unités suivent le Système International d'Unités (BIPM, 1998), sauf exception signalée dans le texte.

INTRODUCTION GENERALE

L'évaluation et la gestion du risque dû aux faibles doses des contaminants chimiques sur les écosystèmes est une approche qui nécessite l'intégration de différentes connaissances dans le domaine de l'environnement. Les substances issues de toute activité humaine (industrielle, agricole…) sont susceptibles de contaminer à court ou moyen terme l'environnement, et sont responsables de différentes altérations du milieu. L'eau en particulier est un vecteur majeur des contaminants anthropiques et par conséquent les écosystèmes aquatiques sont particulièrement vulnérables. Le transport (lacs, rivières…) et les transformations (biodégradation, hydrolyse, photolyse…) de ces polluants ainsi que l'évaluation de leurs effets sur les composants des écosystèmes aquatiques doivent être intégrés dans une démarche d'évaluation des risques.

Caractériser les risques occasionnés par un polluant sur un écosystème revient à étudier d'une part l'exposition à laquelle il est soumis (niveaux de concentrations) et d'autre part, le danger de la substance (effets toxiques sur les composantes de l'écosystème ; Sutter, 1993).

La contamination de l'environnement par les métaux traces est depuis longtemps d'actualité. Contrairement aux polluants organiques susceptibles de se dégrader, les pollutions métalliques sont persistantes. C'est pourquoi l'étude de leur mobilité et de leur transfert est de première importance. En ce qui concerne l'effet potentiel des métaux sur les organismes aquatiques, de nombreuses études ont montré qu'ils sont toxiques à l'état de trace, mais aussi que la seule connaissance des concentrations totales en métaux dans l'environnement ne permet pas d'évaluer leur effet potentiel sur les organismes. En effet, la biodisponibilité des métaux est étroitement liée aux formes chimiques auxquelles les organismes sont exposés, et la spéciation chimique doit être prise en compte. L'étude de la spéciation chimique des métaux traces dans les eaux (Buffle, 1988) et leur répartition dans les fractions particulaires, colloïdales et dissoutes (Duursma and Carroll, 1996) apparaissent indispensables pour mieux comprendre les facteurs contrôlant leur transfert dans les écosystèmes et leur biodisponibilité pour les organismes aquatiques (Tessier and Turner, 1995).

Des tests biologiques doivent être nécessairement intégrés dans l'étude de la biodisponibilité potentielle des polluants. En effet la complexité des réponses d'un organisme suite à l'exposition multiple à des polluants est telle que, même si on connaît les formes chimiques mises en œuvre, l'effet ne peut être entièrement compris par l'approche chimique seule. Ainsi, dans une première approche, des tests biologiques *in vitro* judicieusement choisis peuvent

permettre l'étude de la toxicité dans les eaux (Fochtman *et al.*, 2000). Les tests *in vitro*, à ce stade, donnent une information intégrée sur l'effet potentiel des polluants présents. La mise en relation de la spéciation physico-chimique et de la biodisponibilité pour des organismes vivants, sur laquelle peu d'études de terrain existent à l'heure actuelle, semble indispensable.

L'intérêt de cette double approche, à la fois chimique (spéciation chimique) et biologique pour évaluer les effets potentiels (biodisponibilité), réside dans le fait qu'elle fournit des données plus précises dans le but de déterminer l'exposition, et permet de diminuer les incertitudes dans le processus de gestion du risque. D'autre part, pour les métaux comme pour tous les contaminants, l'association des connaissances sur leurs caractéristiques physico-chimiques (persistance, solubilité, partage entre les différents compartiments illustré par les K_{ow}, les Kd…), les conditions hydrologiques et les caractéristiques du milieu récepteur (pH, potentiel d'oxydoréduction, ions majeurs), sont primordiales pour évaluer les transferts, les niveaux de contamination du milieu et les effets potentiels dans les écosystèmes aquatiques. Dans ce sens, une évaluation précise de la situation et le choix d'outils adéquats ne peut être entrepris que dans un contexte spatial et temporel défini, par rapport à une contamination identifiée.

Le présent travail a été développé dans le contexte de la contamination des écosystèmes aquatiques par les pollutions diffuses d'origine agricole en prenant pour exemple le cuivre, produit phytosanitaire de la vigne.

En viticulture, la lutte contre les maladies cryptogamiques est largement fondée sur l'emploi de fongicides à base de sels de cuivre, en particulier la bouillie bordelaise (sulfate de cuivre et chaux). Les apports répétés de cuivre qui ont été effectués sur les 400 000 ha du vignoble languedocien, souvent en continu (monoculture de la vigne) depuis plus d'un siècle, ont contribué à une augmentation conséquente des teneurs en cuivre des sols viticoles, qui atteignent fréquemment plusieurs centaines de milligrammes de cuivre par kg de sol (Brun, 1998). Compte tenu de l'importance des phénomènes érosifs et des volumes d'eaux de ruissellement dans le vignoble languedocien (Andrieux *et al.*, 1998), se pose de manière aiguë la question des risques de transfert du cuivre vers les eaux superficielles et, par suite, de contamination des écosystèmes aquatiques. Dans ce contexte, il apparaît nécessaire d'évaluer la contamination des eaux de surface par le cuivre issu des traitements fongicides de la vigne et d'estimer les risques de transfert dans les chaînes trophiques d'écosystèmes aquatiques. Le bassin versant de Roujan, représentatif des sols du vignoble languedocien, a été sélectionné dans ce but.

OBJECTIFS GENERAUX

L'objectif général de ce travail est de proposer une approche de la mesure de la biodisponibilité des métaux à l'aide de bioessais, en relation avec la spéciation chimique. Nous nous proposons de l'appliquer à l'étude de la biodisponibilité du cuivre dans des eaux de ruissellement de parcelles viticoles, dans le contexte d'une exposition à un ensemble de produits phytosanitaires issus du traitement de la vigne.

Un rappel des connaissances générales sur la toxicité, la biodisponibilité et la spéciation des métaux traces dans les écosystèmes aquatiques sera d'abord présenté (Chapitre 1). Puis une revue des méthodes existantes de spéciation chimique des métaux traces dans les milieux aquatiques et des méthodes de mesure de la toxicité pour les organismes aquatiques a mené au choix des méthodes présentées au Chapitre 2 (bioessais, méthodes de caractérisations physico-chimiques et de spéciation), pour les études en laboratoire et l'étude du matériel prélevé sur le site de Roujan. Plus précisément, le travail a porté sur :

(1) la mesure de l'effet des métaux à l'aide de bioessais, en relation avec la spéciation chimique.

Les principaux résultats de cette étude méthodologique seront présentés dans le Chapitre 3 et concernent la réponse des bioessais dans le cadre du modèle admis de biodisponibilité des métaux (modèle de l'ion libre, FIAM). En particulier, l'influence des milieux utilisés pour effectuer les tests sera étudiée, ainsi que la comparaison de différents indicateurs d'effet chez l'algue. Enfin, le cas particulier de la toxicité des complexes lipophiles des métaux sera étudié.

(2) l'étude de la biodisponibilité du cuivre dans des eaux de ruissellement de parcelles viticoles.

Les résultats de l'étude de terrain effectuée seront présentés dans le Chapitre 4. Les informations apportées par la spéciation chimique (séparation des particules et colloïdes ; mesure du métal labile par DPASV ; calcul de l'ion libre par MINEQL+) seront confrontés aux résultats de toxicité. Cette approche aura pour but de mettre en évidence les paramètres influençant la contamination des eaux de ruissellement en cuivre parmi les autres métaux et pesticides (caractéristiques de la pluie, traitements phytosanitaires, type de sol…), et d'évaluer ses effets potentiels sur les organismes aquatiques en déterminant les facteurs contrôlant sa biodisponibilité (caractéristiques générales des eaux, ligands dissous, matières en suspension, colloïdes).

CHAPITRE 1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

TOXICITE, BIODISPONIBILITE ET SPECIATION DES METAUX TRACES DANS LES ECOSYSTEMES AQUATIQUES

Ce chapitre présente les différents processus mis en jeu dans la toxicité, la biodisponibilité et la spéciation chimique des métaux dans les écosystèmes aquatiques, en prenant pour exemple principal les effets du cuivre sur les micro-organismes (bactéries et algues unicellulaires).

De part l'objet principal de l'étude (le cuivre dans un contexte d'utilisation en viticulture), il est tout d'abord nécessaire de présenter la problématique générale des métaux traces dans l'environnement et leur spécificité dans les cycles biogéochimiques des éléments. Dans ce contexte, bien que le cuivre soit le principal intérêt, il est utile de comparer les connaissances avec les autres métaux traces comme le zinc, le cadmium ou le plomb, qui ont des comportements chimiques et des effets biologiques différents.

Les modèles les plus avancés de biodisponibilité des métaux traces concernent les micro-organismes, pour lesquels seules les échanges au niveau de la paroi ou de la membrane cellulaire sont à considérer. Au contraire, l'étude de la biodisponibilité pour les organismes aquatiques plus complexes comme les poissons nécessite de prendre en compte plusieurs mécanismes (respiration, ingestion…) et de différencier les processus propres à chaque organe. Les effets biologiques sur les micro-organismes ont donc largement été étudiés et ont fait l'objet d'un développement méthodologique important, ce qui rend possible l'étude de la toxicité des métaux traces en fonction de leur spéciation. De plus, les micro-organismes comme les algues unicellulaires ou les bactéries sont à la base des écosystèmes aquatiques et ont une grande importance écologique.

Dans le contexte de l'évaluation du risque environnemental et de la caractérisation de l'exposition, les concepts de biodisponibilité et de spéciation chimique sont de première importance pour comprendre la toxicité des métaux traces. Après une présentation générale de la problématique des métaux traces dans l'environnement et du cuivre en viticulture, une synthèse des différents mécanismes importants dans la définition de la toxicité et de la biodisponibilité (modèle de l'activité de l'ion libre et les exceptions à ce modèle comme les

complexes lipophiles des métaux) sera proposée, suivie de la présentation des paramètres influant sur la spéciation des métaux en milieu aquatique (complexation, précipitation, adsorption) et des méthodes de spéciation chimique des métaux applicables dans les milieux aquatiques (spéciation des formes dissoutes et des formes particulaires). Enfin, une approche de la mesure de la toxicité des métaux traces pour les organismes aquatiques sera présentée, avec l'utilisation des biotests mettant en jeu des micro-organismes.

1.1 Les métaux traces dans l'environnement

1.1.1 Généralités

Les éléments traces métalliques, ou métaux traces, sont les éléments dont la concentration dans la croûte terrestre est inférieure à 1 g/kg. Cette définition est aujourd'hui utilisée à la place du terme « métaux lourds » (métaux qui possèdent des masses volumiques supérieures ou égales à 4.5 g.cm^{-3}), celle-ci étant une appellation courante qui n'a ni fondement scientifique, ni application juridique (Miquel, 2001). On leur associe souvent les métalloïdes comme l'arsenic ou le sélénium. La caractérisation des risques liés aux métaux traces nécessite de prendre en compte certains paramètres qui leur sont spécifiques.

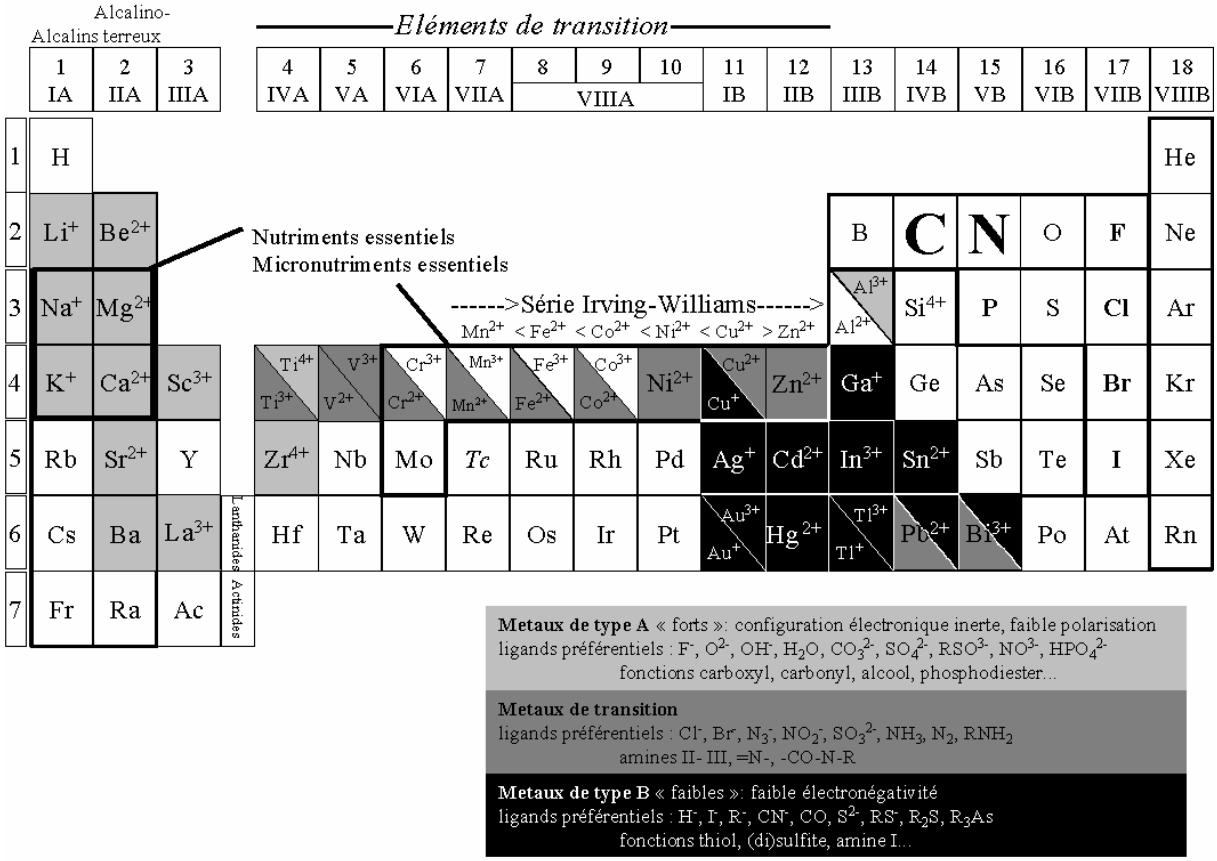


Figure 1 : Classification des métaux traces (Tessier and Turner, 1995 ; Stumm and Morgan, 1996).

Tout d'abord, ce sont des constituants naturels de la croûte terrestre et les concentrations basales - spécifiques à un site donné - en constituent le fond biogéochimique. Certains éléments sont par ailleurs des micronutriments essentiels pour les organismes, mais toxiques à plus forte dose.

Le cycle biogéochimique des métaux traces est altéré par les activités anthropiques ; l'augmentation des concentrations peut entraîner des effets possibles sur les écosystèmes et l'homme. Du fait de leur stabilité et de leur persistance dans l'environnement, ils sont propices au transport et à l'accumulation dans certains compartiments de l'environnement. Concernant les organismes, la bioaccumulation désigne la capacité des organismes aquatiques à concentrer et à accumuler les substances chimiques à partir du milieu (bioconcentration) et de la nourriture (biomagnification), à des concentrations bien supérieures à celles où elles sont présentes dans le milieu (Butcher *et al.*, 1992 ; Flores-Rodriguez, 1992 ; Ramade, 1992).

Les métaux traces dans l'environnement ont pour origine de nombreuses activités humaines :

- sources ponctuelles (rejet massif dans un espace géographique restreint) : mines, fonderies, industries diverses…
- sources diffuses (rejet disséminé dans le milieu) : eaux de pluie, rejets des réseaux d'assainissement urbain, ruissellements des forêts et des zones agricoles, écoulements d'irrigation, dégradation de la végétation, déchets des animaux sauvages.

Leur mobilité et leur transfert dans les différents compartiments de l'environnement est fonction des propriétés chimiques intrinsèques de chaque métal (Tableau 1). En particulier, il est important de considérer leur volatilité (ex. : formes organiques du mercure), leur solubilité dans l'eau (elle varie d'un métal à l'autre mais aussi selon les différentes formes d'un métal donné) et surtout le coefficient de partage du métal entre l'eau et les particules, ce qui est déterminant à la fois dans le devenir, le transport et les interactions avec les autres compartiments des écosystèmes.

La liaison des métaux avec les ligands organiques est aussi un paramètre important à considérer, en particulier avec la matière organique naturelle dissoute, colloïdale et particulaire. Les substances humiques et l'ensemble des molécules organiques produites par les activités biologiques forment un ensemble de ligands potentiels pour les métaux dont la nature est très hétérogène et encore aujourd'hui mal caractérisée. L'affinité d'un métal pour un ligand et les échanges avec d'autres métaux sur ce ligand sont fonction de la chimie de coordination du métal considéré (Stumm and Morgan, 1996). Les métaux sont classés en deux grands groupes (A ou *forts*, et B ou *faibles*) selon leur affinité pour des ligands avec des fonctions carboxyliques, thiol… (Figure 1). Pour les métaux de transition, la stabilité des complexes dépend du nombre d'électrons, ce qui est décrit par la série de Irving-Williams. Elle permet de montrer que le cuivre a la plus forte affinité pour les ligands organiques.

Élément	Masse molaire *(g/mol)*	Pression de vapeur à 20 °C *(Pa)*	Solubilité à 20 °C *(g/L)*	Coefficient de partage eau/particules	
				log K_p (L/kg)	*Type de milieu*
Aluminium	*26.98*	-	*Al : Insoluble*		
			$AlCl_3$: 69.9		
Chrome	*52.00*	-	*CrO_3 : 625*	*CrVI : 2.30*	*MES Rivière*
			Na_2CrO_4 : 530	*CrIII : 4.50*	*MES Rivière*
			$Na_2Cr_2O_7$: 2 355	*Cr : 5.30*	*MES Rivière*
			$K_2Cr_2O_7$: 115		
Manganèse	*54.94*	-	*0 à 3 800 selon le sel*	*3.20-7.09*	*MES Mer*
			considéré	*3.90*	*MES Rivière*
Fer	*55.85*	-	*0 à 1 600 selon le sel*		
			considéré		
Nickel	*58.70*	-	*Sels très solubles*	*3.72*	*MES Rivière*
Cuivre	*63.54*	-		*3.00-6.04*	*MES Mer*
				4.03-5.10	*MES Rivière*
Zinc	*65.38*	-	*$ZnSO_4$: 220*	*4.86*	*MES Rivière*
				3.18-6.77	*MES Mer*
				3.03-5.10	*MES Rivière*
Arsenic	*74.92*	*Très faible*	*As insoluble*	*AsIII : 0.00-0.91*	*Sol*
		(~0)	*As_2O_3 : 1.8×10^4*	*AsV : 0.28-3.18*	*Sol*
			As_2O_5 : 1.5×10^6		
Cadmium	*112.41*	-	*Cd : insoluble*	*4.93*	*MES Rivière*
			CdO : 5	*3.70-5.80*	*MES Rivière*
			CdCl2 : 1.4×10^6	*2.32 (0.70-2.88)*	*Sol*
Mercure	*200.59*	*$HgCl_2$: 0.009*	*69*	*5.23*	*MES Rivière*
		CH_3HgCl : 1.8	*6*	*2.23*	*Sol*
				5.5	*Sed Mer*
				5.05	*Sed Riv*
Plomb	*207.20*	-	*$PbCO_3$: 1.1*	*5.63*	*MES Rivière*
			PbO : 17	*4.27-7.00*	*MES Mer*
				5.00-6.50	*MES Rivière*

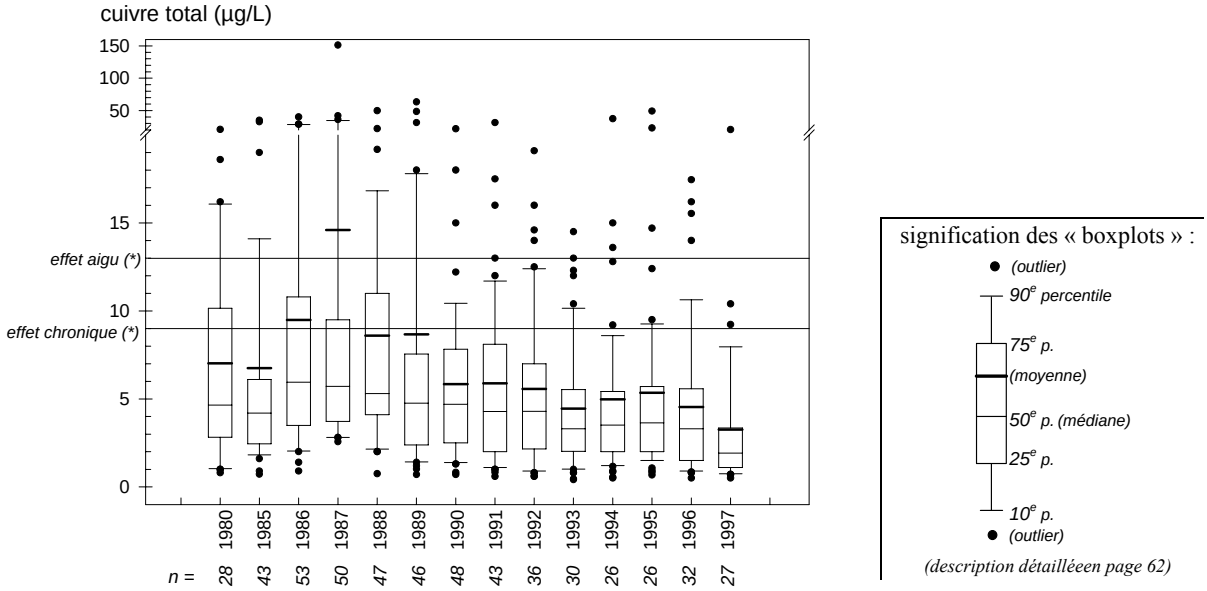
Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des métaux et distribution dans l'environnement (Duursma and Carroll, 1996 ; Guéguen, 2001 ; INERIS, 2001).

1.1.2 Cas du cuivre

Les niveaux de base de cuivre sont de 3 à 5 µg/L en moyenne (0.2 à 30 µg/L) dans les eaux continentales (Flemming and Trevors, 1989). Les concentrations sont basses, particulièrement à cause du rôle de piège des sédiments, dans lesquels le niveau de base se situe entre 0.8 et 50 µg/g. Pour les sols, le niveau de base se situe autour de 30 µg/g (2 à 250 µg/g selon le fond géochimique). Les concentrations moyennes en cuivre dans les eaux continentales sont largement en dessous du seuil de 1 mg/L conseillé par l'OMS pour l'alimentation humaine en eau potable, comme l'illustrent les données compilées par l'OCDE (Figure 2).

Cependant, si les contaminations en cuivre n'occasionnent pas de risque important pour l'homme, le cas est différent concernant les risques environnementaux. On peut relever de fortes concentrations en cuivre dans les eaux et sédiments dans des zones influencées par des

activités anthropiques spécifiques, par exemple des activités minières ou industrielles[1]. Les utilisateurs sont majoritairement les industries électriques puis le bâtiment, avec une utilisation dans les biocides à base de cuivre globalement en recul. Cependant, les concentrations atteignent régulièrement les seuils recommandés par l'USEPA pour la protection des écosystèmes aquatiques (9 µg/L en exposition chronique et 13 µg/L en exposition aiguë). Même si la tendance a été à la baisse depuis 1986, le cuivre est classé dans la liste des polluants prioritaires.



(*) critères pour la qualité des eaux de l'USEPA
Cuivre total analysé dans n rivières(moyennes annuelles) en Europe et Amérique du Nord, d'après le compendium 1999 des Données sur l'environnement (OCDE, 1999).

Figure 2 : Concentrations en cuivre dans les eaux continentales.

1.2 Le cuivre dans les eaux de ruissellement viticoles

Le cuivre est depuis longtemps connu pour son effet fongicide sur les végétaux, utilisé particulièrement pour la lutte contre le mildiou. La bouillie bordelaise (mélange de sulfate de cuivre et de chaux) a été, et est encore largement utilisée dans ce but. Probablement 200 000 t/an de cuivre sont utilisées ainsi autour du monde (ICA, 1995), auxquelles s'ajoutent de faibles quantités d'autres composés cuivrés comme l'oxyde et oxychlorure de cuivre, les mélanges arsenic-cuivre ou *vert de Paris* et de nombreuses formulations combinant le cuivre avec des fongicides organiques : environ 2 000 produits phytosanitaires contenant du cuivre sont répertoriés. Le cuivre est parfois utilisé pour d'autres usages : en complément des engrais

[1] La production mondiale de cuivre était d'environ 8.3×10^6 t / an dans les années 1970 et de 13.6×10^6 t / an dans les années 1980 (Flemming and Trevors, 1989).

sur les sols tourbeux ou arénacés pauvres et déficients en cuivre, ce qui augment de ce fait le rendement des collectes. Pour des raisons semblables, le cuivre est donné en complément alimentaire pour l'élevage des moutons et autres animaux de pâturage. Pour finir, citons des applications marginales de sulfate de cuivre dans les plans d'eau - réservoirs pour contrôler le développement algal (Haughey *et al.*, 2000), et la maladie tropicale de la bilharziose, qui est également contrôlée en traitant les cours d'eaux et les lacs infectés avec une solution de sulfate de cuivre.

1.2.1 Généralités sur les pesticides

Le terme pesticide dérive du mot anglais *« Pest »* qui désigne tout animal ou plante (virus, bactéries, champignons, herbes, vers, mollusques, insectes, rongeurs, oiseaux et mammifères) susceptibles d'être nuisible à l'homme et/ou à son environnement. On qualifie de pesticide toutes les substances chimiques naturelles ou de synthèse utilisées en agriculture pour contrôler les différentes sortes de nuisibles, à l'exception des produits utilisés en médecine vétérinaire et en médecine humaine. Selon l'IFEN (1998), le terme pesticide, tel qu'il est utilisé par le grand public, englobe de très nombreux produits chimiques et biologiques. Ils sont définis par leur but :

- soit de protéger les productions végétales ou de détruire les indésirables dans les zones de production agricole. Ce sont les « produits phytosanitaires » des professionnels, ou les « produits phytopharmaceutiques » et « produits antiparasitaires à usage agricole » des juristes. Il existe actuellement 703 substances actives différentes homologuées entrant dans la composition d'une dizaine de milliers de spécialités commerciales ;
- soit de détruire ou repousser des organismes nuisibles pour l'homme, ses productions ou ses autres activités. Ce sont des pesticides non agricoles ou biocides, soumis à une réglementation distincte.

On regroupe les pesticides selon leur famille chimique, dont les plus connus sont : triazines (dont l'Atrazine et la Simazine), carbamates, urées substituées, organophosphorés, organochlorés (dont le Lindane), etc. Certains, comme les dérivés du cuivre, du soufre, la nicotine, les pyréthrines, les huiles végétales, des goudrons de bois, le chlorate de sodium sont utilisés depuis fort longtemps (certains depuis le XVIIIème siècle) pour des soins aux végétaux ou pour désherber. La façon la plus commode de classer les produits phytosanitaires est de les considérer selon la nature du ravageur visé. On distingue les trois grandes familles suivantes :

- insecticides *stricto sensu* et espèces voisines : acaricides (acariens) et aphicides (pucerons). Sont aussi inclues les substances qui perturbent leur développement normal en empêchant l'éclosion des œufs (ovicides) et des larves (larvicides) ou la maturation sexuelle des adultes ;
- herbicides (désherbants totaux, sélectifs, débroussaillants, défanants et antigerminatifs) ;
- fongicides et fongistatiques.

Malgré un suivi encore hétérogène et insuffisant, de récentes études montrent que la présence en quantités excessive de pesticides dans les eaux est une réalité (IFEN, 1998). La pollution des eaux de surface et souterraines par les pesticides a aujourd'hui un impact non négligeable sur la ressource en eau : la présence de pesticides, seuls ou avec d'autres causes, est à l'origine de près du quart du total des causes de non-conformité de l'eau potable. D'autre part, la pollution diffuse d'origine agricole peut devenir l'impact majeur des hydrosystèmes dans certaines zones, en particulier dans les régions de culture intensive.

1.2.2 Pollution diffuse des eaux de surface

Définies pour la première fois lors de la 10ème *Cornell Agriculture Waste Management Conference* (Loehr *et al.*, 1978), les pollutions diffuses comprennent : les eaux de pluie (météoriques ou précipitations humides), les rejets des réseaux d'assainissement urbain, les ruissellements des forêts et des zones de pâturage, les écoulements d'irrigation, la dégradation de la végétation, les déchets des animaux sauvages.

Plusieurs études ont montré qu'une des voies les plus importantes de transfert des pesticides vers les milieux aquatiques est le ruissellement provenant des surfaces agricoles, et qu'un ensemble de paramètres en détermine l'importance : le climat, le type de culture, l'état du sol, les pratiques agricoles… (Baker *et al.*, 1978 ; Wauchope, 1978 ; Wu *et al.*, 1983 ; Leonard, 1990 ; Huber *et al.*, 1998 ; Besnard, 1999). Les zones méditerranéennes sont propices à ces phénomènes (Ramade, 1993), en particulier dans les cultures viticoles où le ruissellement de surface sur les parcelles est prédominant (Voltz *et al.*, 1997 ; Leonard and Andrieux, 1998 ; Ribolzi *et al.*, 2000) et propice à un transfert des pesticides vers les eaux de surface (Lennartz *et al.*, 1997).

1.2.3 Généralités sur le cuivre en tant que produit phytosanitaire de la vigne

L'agent responsable du mildiou de la vigne est *Plasmopara viticola*. Le mildiou de la vigne est une maladie présente partout dans le monde où les conditions climatiques sont favorables. Importé d'Amérique en France vers 1878 par le biais de greffons américains, le mildiou est une maladie cryptogamique des plus préjudiciables à la viticulture. Le mildiou est une maladie permanente avec des recrudescences saisonnières, qui conduit à un développement anormal puis à la mort du pied de vigne. D'autre part, le mildiou oblige le vigneron à effectuer de nombreux traitements coûteux. Son importance économique reste donc considérable.

La stratégie de lutte contre le mildiou est préventive. Le seul traitement consiste en une pulvérisation répétée de « bouillie bordelaise », solution constituée d'eau, de sulfate de cuivre (agent destructeur des sporocystes) et de chaux. Le premier traitement est positionné avant les premières contaminations initiatrices de l'épidémie. Les cadences de renouvellement intègrent plusieurs critères : risques de pluie annoncés, évolution des symptômes sur le terrain, stade de plus ou moins grande sensibilité de la vigne, type de fongicide utilisé (AVC, 2001).

Pendant de très nombreuses années, la « Bouillie bordelaise », à base de cuivre, fut employée pour les soins apportés à la vigne. Avec l'essor des produits phytosanitaires de synthèse dans la deuxième moitié du XXème siècle, le cuivre a été utilisé en combinaison avec d'autres fongicides organiques. Mais récemment, avec l'essor de la viticulture biologique, la restriction des produits utilisables (aucun fongicide de synthèse) se traduit par l'utilisation unique de cuivre comme protection phytosanitaire contre le mildiou (bouillie bordelaise, oxychlorure de cuivre, carbonate de cuivre).

Le cuivre est aujourd'hui encore très utilisé pour traiter les végétaux contre les maladies cryptogamiques, avec en particulier le traitement de la vigne contre le mildiou. D'une part, des applications répétées de cuivre au cours des années a conduit à contaminer parfois très fortement les sols viticoles. D'autre part, le cuivre est aujourd'hui utilisé avec un ensemble de produits phytosanitaires organiques susceptibles d'interagir avec celui-ci.
Dans ce contexte, il apparaît nécessaire d'évaluer la contamination des eaux de surface par le cuivre issu des traitements fongicides de la vigne et d'estimer la toxicité, la biodisponibilité et la spéciation du cuivre dans les écosystèmes aquatiques.

1.3 Toxicité des métaux traces pour les organismes aquatiques

Les métaux ont des effets divers sur les organismes aquatiques en fonction du métal et de l'organisme considéré. Nous prendrons ici l'exemple du cuivre, métal parmi lesquels le nombre d'études est le plus important.

La toxicité du cuivre pour les organismes est globalement basée sur ses interactions avec les protéines, enzymes, acides nucléiques et métabolites, de la paroi cellulaire, de la membrane et dans le cytoplasme (Flemming and Trevors, 1989). Le métal toxique ou biodisponible est transporté de la solution vers le cytoplasme, à travers la membrane. Ceci dépend de l'affinité relative du métal pour les ligands de la solution et le récepteur membranaire, ou de la répartition solution - membrane pour un complexe lipophile.

Pour les bactéries, le cuivre est connu pour agir à la surface des cellules. Par exemple, l'inhibition de la respiration chez les coliformes a été attribuée à l'inhibition des enzymes respiratoires de la membrane cellulaire (Domek *et al.*, 1984). Des dommages de la paroi cellulaire et la lyse cellulaire en fonction de la concentration et du temps d'exposition ont été observées au microscope (Zevenhuizen *et al.*, 1979).

Pour les végétaux, algues et des plantes supérieures, le cuivre est nécessaire à leur croissance. Cependant, à des concentrations excessives, le cuivre agit sur la réaction primaire de la photosynthèse, principalement associé au photosystème II, et affecte l'assimilation du carbone inorganique par la plante (Shioi *et al.*, 1978). Le cuivre inhibe la photosynthèse, mais aussi la division cellulaire. C'est ainsi que des indicateurs d'inhibition ont été développés pour mesurer l'inhibition de la croissance (dénombrements cellulaires des algues unicellulaires par des méthodes de comptage direct ou des méthodes indirectes spectrophotométriques) ou quantifier la chlorophylle (mesure spectrophotométrique ou spectrofluorimétrique avec ou

sans extraction préalable). L'inhibition de la photosynthèse est liée à des processus biochimiques qui peuvent aussi être utilisés comme indicateurs de la toxicité : formation d'ATP, fixation du CO_2 (incorporation de ^{14}C), production d'oxygène… Les métaux comme le cuivre, le cadmium ou le zinc sont des inhibiteurs de l'incorporation de manganèse dans le phytoplancton marin (Sunda and Huntsman, 1996), probablement par compétition sur les sites membranaires ou internes impliqués dans l'homéostasie du manganèse. Le métal toxique est aussi transporté dans la cellule via le mécanisme d'incorporation du manganèse, surtout à faible concentration en manganèse.

Les cellules peuvent développer des mécanismes de défense en synthétisant des ligands (phytochélatines) et en excrétant le métal. La sécrétion de ligands forts externes (qui complexent le cuivre libre) est connue par exemple pour les cyanobactéries marines en présence de cuivre (Moffett and Brand, 1996). Ces ligands sont les sulfures, les sidérophores, catechol, metallothionéines[2], phytochélatines… Cependant, dans les milieux pollués, la synthèse de ces ligands protecteurs apparaît comme faible par rapport au temps de mélange rapide des eaux, en particulier lorsqu'il y a un apport (anthropique) continu en métaux (Moffett, 1997). La saturation de ce type de ligands dans un milieu naturel pourrait être un indicateur du « dépassement » du système de défense des organismes, et donc d'un effet toxique (quand la concentration en cuivre libre dépasse 10^{-11} mol/L).

Pour les animaux (par exemple les poissons), au moins deux voies de pénétration du cuivre sont à considérer : les voies respiratoires et le système digestif. L'incorporation dans les cellules par l'une ou l'autre des voies va suivre les mêmes règles que pour un organisme unicellulaire : adsorption à la surface puis transport et diffusion à travers la membrane.

Cependant, les conditions à la surface des cellules branchiques (contact direct avec l'eau environnante) ou épithéliales (milieu gastrique) sont fondamentalement différentes et les changements de spéciation du cuivre à l'intérieur de l'appareil digestif (désorption des particules due au changement de pH…) doivent être prises en compte. De plus, les mécanismes de défense sont plus performants et complexes que pour les végétaux : Les systèmes d'excrétion (intestin, foie, reins et rate) permettent aux animaux de mieux résister aux métaux. Cependant, ils ne sont pas équipés de système de protection pour les complexes lipophiles et les organométalliques (méthyl-mercure, organo-étains…), qui peuvent se bioaccumuler dans les tissus adipeux et se bioconcentrer le long de la chaîne alimentaire.

Du fait de ces différences d'actions métaboliques en fonction de l'organisme cible considéré, la toxicité du cuivre est très variable. La CE_{50} peut par exemple varier de 1µg/L à plus de 10 mg/L selon l'organisme (Hall *et al.*, 1998). Pour déterminer des concentrations maximales admissibles dans l'environnement, une démarche possible est de déterminer la limite pour laquelle 10 % des espèces de chaque groupe trophique est atteint (protection de 90 % des espèces), à partir des données disponibles sur des tests en laboratoire. C'est ce qui a par exemple été effectué par Hall *et al.* (Hall *et al.*, 1998), qui déterminent la valeur du 10ème

[2] Les métallothionéines sont des protéines riches en groupements sulfures qui sont produites par beaucoup d'animaux (mollusques, poissons, vertébrés…). Elles ont une forte affinité pour les métaux de part leurs ponts disulfures, et leur rôle est de lier, détoxiquer et stocker les métaux dans le foie, les reins et la rate. On considère alors que la toxicité des métaux se manifeste seulement lorsque la quantité de métal incorporé dépasse la capacité de production de métallothionéines de l'organisme.

percentile (concentration en cuivre pour laquelle 10% des études recensées ont montré un effet) pour chaque niveau trophique, en milieu d'eau douce et salée, pour des effets aigus et chroniques (Tableau 2).

milieu	toxicité	groupe trophique	nombre d'études	10ème p. (*) µg/L
eau douce	aiguë	*tous*	*73*	*8.3*
		zooplancton	*4*	*7.0*
		benthos	*31*	*6.9*
		poisson	*36*	*10.8*
	chronique	*tous*	*21*	*3.8*
		zooplancton	*3*	*0.8*
		benthos	*7*	*3.8*
		poisson	*10*	*3.9*
eau de mer	aiguë	*tous*	*57*	*6.3*
		phytoplancton	*3*	*2.1*
		zooplancton	*7*	*9.3*
		benthos	*30*	*4.1*
		poisson	*15*	*16.1*
	chronique	*tous*	*4*	*6.4*

(*) dixième percentile sur l'ensemble des études recensées

Tableau 2 : Sensibilité des organismes d'eau douce et marins au cuivre, en laboratoire, par exposition aiguë ou chronique (Hall *et al.*, 1998).

On peut ainsi déterminer un 10ème percentile égal à 8.3 µg/L (6.9 à 10.8 µg/L) pour les tests aigus en eau douce, et de 3.8 µg/L en exposition chronique. Ces valeurs sont similaires aux recommandations nationales aux USA (9 à 13 µg/L) ou au Canada (2 à 4 µg/L) pour la qualité des eaux et la protection de la vie aquatique (USEPA, 1998 ; CCMRE, 2001).

Cependant, il est connu que les concentrations totales en métaux dissous (< 1 µm ou 0.45 µm) ne permettent pas de prévoir la réponse biologique des organismes, puisque les différentes espèces chimiques des métaux ont des réactivités différentes à la surface des sites de surface des cellules et impliquent différents mécanismes de transport à travers la membrane cellulaire. La biodisponibilité des métaux est un concept clé pour la compréhension de la réponse biologique (ex. : assimilation, bioaccumulation, toxicité) conséquente à l'exposition à des métaux traces dans les milieux aquatiques.

1.4 Biodisponibilité des métaux dans les écosystèmes aquatiques

On définit la biodisponibilité comme le degré avec lequel un contaminant, dans une source potentielle, est assimilé par un organisme (O'Donnel *et al.*, 1985 ; Newman and Jagoe, 1994). Elle met en jeu trois étapes principales (Campbell, 1995) : l'advection ou la diffusion depuis la solution vers la surface de la membrane ; l'adsorption ou la complexation sur les sites de

transport ; le transport à travers la membrane pour une assimilation dans l'organisme. La connaissance de la biodisponibilité d'un élément toxique dans un milieu donné est donc primordiale pour estimer l'exposition des organismes à ce toxique et son effet (toxicité, bioaccumulation, bioconcentration). Dans le cas des métaux, il est connu depuis longtemps que les concentrations totales du milieu ne permettent pas d'évaluer l'exposition réelle ni les effets possibles sur les organismes.

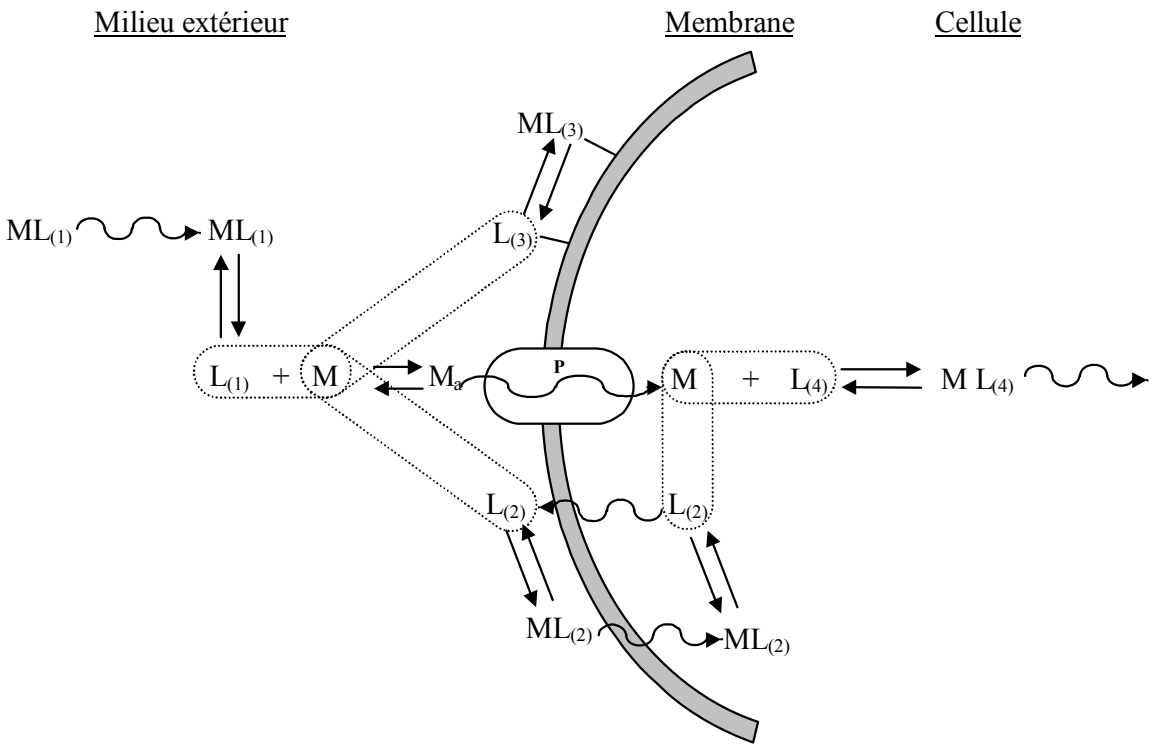
La biodisponibilité étant avant tout définie pour un organisme donné, il est à noter que cette étude se place par rapport à des organismes simples qui sont à la base des chaînes trophiques aquatiques (bactéries, algues unicellulaires et microcrustacés d'eau douce). Notre choix de travailler à ce niveau de l'écosystème est principalement motivé par la forte sensibilité de ces organismes au cuivre. Par ailleurs, les interactions de ces organismes avec le cuivre sont mieux maîtrisées que pour des maillons plus élevés de la chaîne trophique (ex. : poisson), dont l'interface avec leur milieu est plus complexe.

1.4.1 Le modèle de l'activité de l'ion libre

Le modèle d'activité de l'ion libre (FIAM) a été développé pour expliquer les réponses biologiques par les activités en ion libres des métaux traces (Morel, 1983 ; Campbell, 1995). Il considère que seules les espèces réactives à la surface des cellules (ions métalliques hydratés et complexes cinétiquement labiles) sont prises en compte pour évaluer la biodisponibilité, alors que les espèces chimiques qui ne peuvent pas réagir avec la membrane cellulaire (complexes stables avec des ligands inorganiques et organiques, métaux complexés ou adsorbés sur des surfaces) ne sont pas considérées comme biologiquement actives. Dans le cas de la présence de ligands, le métal doit d'abord se dissocier avant de pouvoir traverser la membrane biologique (Figure 3).

La concentration et la stabilité des différents ligands présents détermineront l'activité du métal considéré. L'assimilation du métal par l'organisme s'effectue par échange du métal avec un ligand « transporteur » hydrophobe (permettant à l'ion hydrophile de traverser la membrane hydrophobe) ou via les canaux protéiques de transport actif selon la taille de l'ion et son affinité pour ces structures protéiques.

L'assimilation du métal par l'organisme peut être modélisée à condition de connaître les caractéristiques (constantes de complexation et cinétiques) des sites actifs de ce « ligand vivant » (Azenha *et al.*, 1995 ; Lage *et al.*, 1996 ; Vasconcelos *et al.*, 1996). Par ailleurs, la surface d'échange des organismes a une grande importance dans l'incorporation du métal. Ceci a été observé pour le phytoplancton (Croot *et al.*, 1999b) et les daphnies (Barata *et al.*, 1999). Cependant la nature de la surface des organismes peut avoir une influence ; ce n'est pas une simple membrane mais une structure plus complexe comme par exemple les S-layer bactériennes (Sleytr and Beveridge, 1999 ; Sleytr *et al.*, 1999) ou les pores des spores fongiques (Shoja *et al.*, 1998).



$L_{(1)}$ = ligand du milieu externe; $L_{(2)}$ = ligand "transporteur"; $L_{(3)}$ = site complexant de la membrane; $L_{(4)}$ = agent complexant interne; P = canal transporteur protéinique membranaire; M_a ion métallique M adsorbé sur un site permettant son transport éventuel à travers le canal protéinique ; ⟿ = transport par diffusion

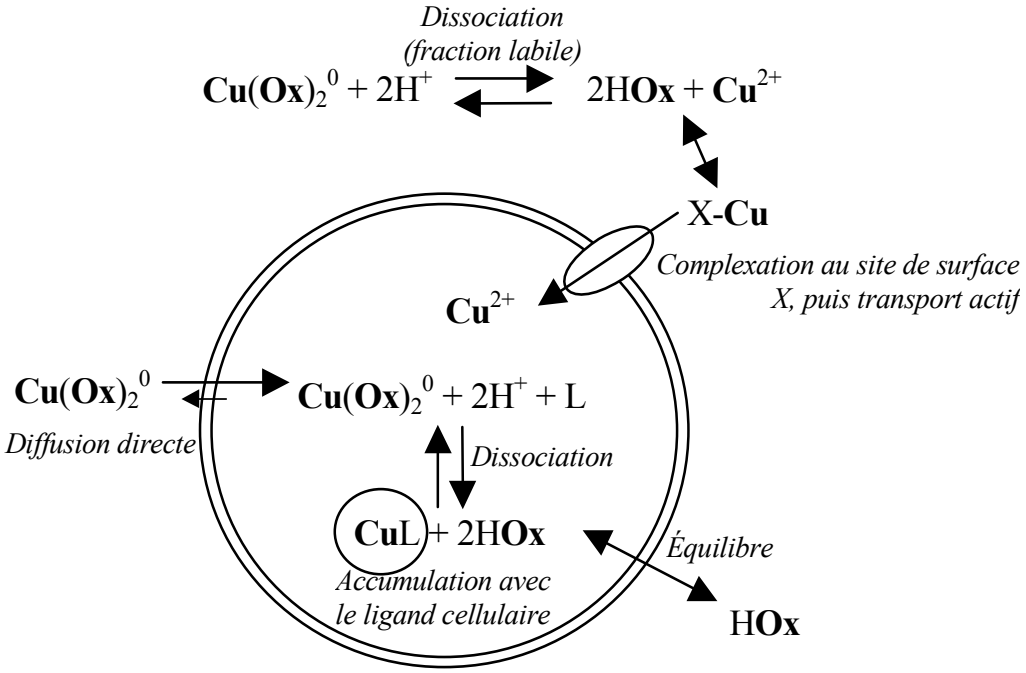
Figure 3 : Représentation schématique du rôle des agents complexants dans l'assimilation des métaux (M) par les organismes aquatiques (Buffle, 1988).

Une modification du FIAM a permis d'inclure la compétition des métaux traces avec les autres cations pour la complexation aux sites de surface des cellules (ex. : Ca^{++}, Mg^{++}, Na^{+}, H^{+}). Les sites de surface des cellules sont alors considérés comme des ligands avec des constantes de complexation données. Cette approche a été d'abord développée pour le poisson avec le « Modèle d'Interaction à la Surface des Branchies » (*Gill Surface Interaction Model* : GSIM), généralisé sous le nom de « Modèle du Ligand Biotique » (*Biotic Ligand Model* : BLM) par Di Toro *et al.* (1999).

Le concept général de biodisponibilité des métaux traces est donc basé sur l'assimilation de l'ion libre, avec une prise en compte de la compétition avec les autres métaux pour les ligands (dans la solution et ligand biotique à la surface de la membrane), et en considérant que les complexes cinétiquement stables par rapport aux ligands à la surface des cellules ne sont pas biodisponibles. Cette approche est une amélioration importante dans l'évaluation du risque environnemental des métaux, et est actuellement proposée pour l'établissement des critères de qualité de l'eau pour les métaux traces, par exemple aux USA (Di Toro *et al.*, 2001) pour améliorer l'actuel système de *« Water Effects Ratio »* (Allen and Hansen, 1996).

1.4.2 Les complexes lipophiles des métaux

Plusieurs études ont montré que des exceptions à l'assimilation de l'ion libre sont possibles avec des complexes métalliques cinétiquement stables. L'effet biologique de tels complexes a été attribué à leur caractère lipophile (hydrophobe) qui leur donnerait la possibilité de diffuser de manière passive à travers la membrane biologique (Campbell, 1995). Le mécanisme d'assimilation de ces formes se rapproche de la chimie de partage. Les complexes les plus hydrophobes sont évidemment ceux qui ne portent pas de charge, par exemple ceux formés avec l'oxine, les dithiocarbamates, dithiophosphates, xanthates…(Borgman and Ralph, 1983 ; Van Ginneken and Blust, 2000). Ils peuvent être toxiques pour différents niveaux d'organisation des écosystèmes, de la bactérie au phytoplancton, zooplancton et poissons (Poldoski, 1979 ; Block and Pärt, 1986 ; Bonnemain and Dive, 1990 ; Block *et al.*, 1991 ; Tjalve and Gottofrey, 1991 ; Block and Glynn, 1992 ; Florence *et al.*, 1992 ; Phinney and Bruland, 1997a ; Croot *et al.*, 1999a). Ces complexes lipophiles des métaux (CLM) ont été identifiés comme des exceptions au FIAM (Campbell, 1995). L'expression de la toxicité de tels complexes n'est pas encore complètement comprise. Phinney et Bruland (1994) proposent par exemple un modèle de pénétration du cuivre en présence d'oxine (Figure 4).



Ox *représente la molécule d'Oxine*
La paroi cellulaire autour de la membrane est omise dans le schéma par souci de simplification.

Figure 4 : Modèle du mécanisme d'incorporation de du complexe cuivre-oxine à travers le plasmalemme d'une cellule phytoplanctonique (Phinney and Bruland, 1994).

1.4.2.a Théorie de la biodisponibilité des complexes lipophiles

Le flux d'un composé lipophile à travers la membrane plasmique s'effectue en deux étapes : *a)* la répartition des molécules de la solution sur la membrane lipidique et *b)* la diffusion dans la bi-couche lipidique selon un gradient de concentration (Phinney and Bruland, 1994). Le coefficient de perméabilité membranaire est souvent estimé par le K_{ow} du composé. Cependant, la corrélation n'est pas toujours observée (Phinney and Bruland, 1994). Une explication pourrait être que la quantité de métal dans la cellule dépend de l'affinité de ce métal pour les ligands intracellulaires (ex. : groupes thiol des protéines et des phytochélatines) plus que de leur capacité à diffuser à travers la membrane. Des différences de perméabilité entre des ligands lipophiles de K_{ow} comparables sont aussi mentionnées, par exemple les différences entre oxine et diethyldithiocarbamate (DDC), ce qui confirmerait l'importance des ligands intracellulaires et de leur force comparée aux ligands exogènes. Ceci expliquerait les résultats de Phinney and Bruland (1994) qui voient la concentration cellulaire en métaux d'une diatomée se stabiliser après 0.5 h (équilibre entre ligands atteint) en présence d'oxine et DDC au lieu d'avoir une accumulation continue (ces auteurs reportent que des comportements similaires ont été observés pour le méthyl-mercure).

En estimant que les cellules phytoplanctoniques sont sphériques, Croot *et al.* (1999a) ont montré que le taux d'incorporation initial des complexes lipophiles est bien corrélé au taux maximum théorique, contrairement à l'incorporation de l'ion libre (plus lent). Mais la présence de ligands intracellulaires est déterminant dans la redistribution des métaux dans la cellule (capacité d'incorporation totale), plus que le contenu en lipides. Ces auteurs soulignent aussi l'importance de la structure des cellules (structure de l'enveloppe externe - paroi, contenu en lipides, nombre de sites de transfert spécifiques des métaux libres) et de leur intégrité (taille de la cellule, intégrité de la membrane et de la paroi), qui peuvent être toutes deux modifiées par le stress dû aux toxiques.

Les ligands internes tels que la glutathione, les phytochélatines ou les polyphosphates (Croot *et al.*, 1999b) peuvent être rapidement saturés, à court terme, par une entrée rapide de métaux lipophiles. Cependant, lors d'expériences à l'équilibre (Sunda and Huntsman, 1995), le phytoplancton pourrait avoir le temps de synthétiser de nouveaux ligands internes lors de mécanismes de détoxication.

1.4.2.b Exemples de molécules formant des complexes lipophiles

L'insertion des CLM dans les modèles actuels de biodisponibilité nécessite des approfondissements supplémentaires. En particulier, il est nécessaire de disposer de données sur les réponses biologiques en présence de CLM pour calibrer les modèles. Dans ce contexte, la présence de CLM dans les milieux aquatiques n'a pas encore été démontrée avec certitude. Des exemples clairs existent avec des ligands organiques synthétiques (ex. : dithiocarbamates, oxine) mais le rôle de la matière organique reste ambigu.

♦ Diethyldithiocarbamates

Les dithiocarbamates (Zinèbe, Manèbe, Ferbam) forment des complexes de charge nulle et lipophiles de métaux (zinc, manganèse, fer respectivement) utilisés comme fongicides. Leur action fongicide est liée à la partie organique, ainsi qu'à la complexation de métaux essentiels dans le cytoplasme (cuivre, zinc, fer) perturbant le métabolisme (Phinney and Bruland, 1997a). Certaines études ont montré que ces molécules sont impliquées dans la bioconcentration et la toxicité du cuivre et du cadmium pour les micro-organismes (Vasseur *et al.*, 1988 ; Bonnemain and Dive, 1990 ; Sekkat *et al.*, 1992). Ils sont capables d'échanger le métal initial avec les métaux toxiques (cuivre, plomb) en solution, agissant alors comme transporteurs lipophiles vers les organismes (Phinney and Bruland, 1994 ; Phinney and Bruland, 1997b ; Phinney and Bruland, 1997a). Le métal traverse les membranes biologiques passivement, puis se dissocie dans le cytoplasme. Le transport de métal est accru quantitativement et cinétiquement. Cependant, ces études restent théoriques (*in vitro*) et l'identification de tels complexes sur le terrain (ex. : zones sous influence agricole) reste à établir.

♦ *Oxines*

Ils sont aussi utilisés comme pesticides (Croot *et al.*, 1999a). Ce type de complexes lipophiles est connu pour augmenter fortement la toxicité des métaux :

- dans les eaux usées (Carlson-Ekvall and Morrison, 1995b), pour la bactérie *Vibrio fischeri* (Microtox®) ;
- pour les diatomées marines *Nitzchia closterium* (Florence and Stauber, 1986 ; Stauber and Florence, 1987 ; Florence *et al.*, 1992) et *Thalassiosira weissflogii* (Phinney and Bruland, 1997b ; Phinney and Bruland, 1997a).

Ces différentes études, ainsi que celle de Croot *et al.* (1999a) sur le phytoplancton ont montré que les complexe métalliques avec l'oxine pénètrent très rapidement dans les cellules, probablement par diffusion. Il a été montré que la pénétration dans l'organisme de ces complexes dépend de leurs contraintes stériques. C'est le cas par exemple des complexes du cuivre avec les 2-methyl-8-quinolinols (Shoja *et al.*, 1998), qui ont une géométrie plane, ne sont pas polaires (charges égales aux opposés de l'axe de la molécule) et n'ont pas d'effet fongicide. Mais les molécules présentant une distorsion, polaires, sont toxiques (de même, les complexes mixtes 8-quinolinol / salicylate sont polaires et toxiques). Ceci est une illustration de la complexité de la pénétration des molécules au niveau des surfaces biologiques : le transport actif ainsi que la diffusion passive dépendent de mécanismes spécifiques, selon les propriétés des molécules.

♦ *Molécules organiques naturelles*

Certaines molécules organiques naturelles sont aussi capables de former des complexes avec les métaux de nature hydrophobe. C'est le cas par exemple des complexes du cuivre avec les lipides naturels provenant d'algues (Florence, 1982a ; Florence *et al.*, 1983). Cependant, si la biodisponibilité éventuelle des complexes des métaux avec les exsudats algals a parfois été notée (Van der Berg *et al.*, 1979), elle serait plus à rapprocher du mécanisme de « transport

accidentel » observé avec les complexes métalliques formés avec le citrate ou les acides aminés (Guy and Kean, 1980 ; Errecalde *et al.*, 1998).

Dans les milieux naturels, la présence de complexes lipophiles peut être diminuée par la compétition avec des ligands hydrophiles, en particulier certaines substances humiques (Giesy *et al.*, 1977 ; Florence *et al.*, 1992 ; Tubbing *et al.*, 1994).

Il apparaît que l'état physico-chimique du cuivre a une grande importance et déterminera sa biodisponibilité, tant en ce qui concerne l'ion libre que la présence éventuelle de complexes lipophiles. La connaissance de la spéciation physico-chimique du cuivre et du milieu qui entoure ces espèces chimiques est de toute première importance.
La toxicité du cuivre dépend des facteurs du milieu qui altèrent la forme chimique et la mobilité (spéciation en fonction du pH, potentiel d'oxydoréduction, température, aération, intensité lumineuse, autres ions dissous - salinité et métaux -, matière organique, particules), et altèrent la réponse physiologique et la sensibilité des organismes (stade de croissance algal, état nutritionnel, précédent stress, production de molécules de défense, adaptations physiologique et génétique, densité de la population).

1.5 Spéciation des métaux en milieu aquatique

L'IUPAC a récemment établi les définitions suivantes dans le but de clarifier l'utilisation du terme « spéciation » (Templeton *et al.*, 2000). Nous avons traduit les termes en français et les définitions correspondantes pour éviter toute ambiguïté :

- *espèce chimique* (Chemical species) : Forme spécifique d'un élément défini quant à la composition nucléaire, l'état électronique ou d'oxydation, et/ou la structure complexe ou moléculaire ;
- *analyse de spéciation* (Speciation analysis) : Activités analytiques d'identifier et/ou de mesurer les quantités d'une ou plusieurs différentes espèces chimiques dans un échantillon ;
- *spéciation d'un élément, spéciation* (Speciation of an element ; speciation) : Distribution d'un élément parmi des espèces chimiques définies dans un système.

Les eaux naturelles contiennent un mélange de cations (Ca^{++}, Mg^{++}, Na^{+}, K^{+}), de ligands inorganiques (OH^{-}, Cl^{-}, SO_4^{--}, HCO_3^{-}, PO_4^{---}) et organiques (urée, acides aminés, composés humiques et fulviques) en solution. Les éléments dissous sont en contact avec les particules du sol, des sédiments ou matières en suspension, qui agissent comme des surfaces d'échange complexes (mélanges de minéraux, argiles et matière organique) avec une grande surface d'échange (Figure 5). Le comportement d'un métal dans un écosystème aquatique dépend donc des conditions physico-chimiques du milieu ainsi que de ses caractéristiques physico-chimiques (Town and Filella, 2000).

Un métal peut être sous différentes formes (Turner, 1984 ; Buffle, 1988 ; Tessier and Turner, 1995 ; Stumm and Morgan, 1996) :

- ion libre hydraté ;
- complexé par des ligands inorganiques ; paires d'ions inorganiques ;
- complexé par des ligands organiques ; complexes ;
- complexé à des molécules organiques de haut poids moléculaire (lipides, substances humiques, polysaccharides) ;
- adsorbé sur des colloïdes inorganiques (FeOOH, $Fe(OH)_3$, Oxydes de manganèse, Ag_2S, argiles …) et organiques ;
- précipité ;
- adsorbé sur des particules organiques, restes d'organismes vivants…

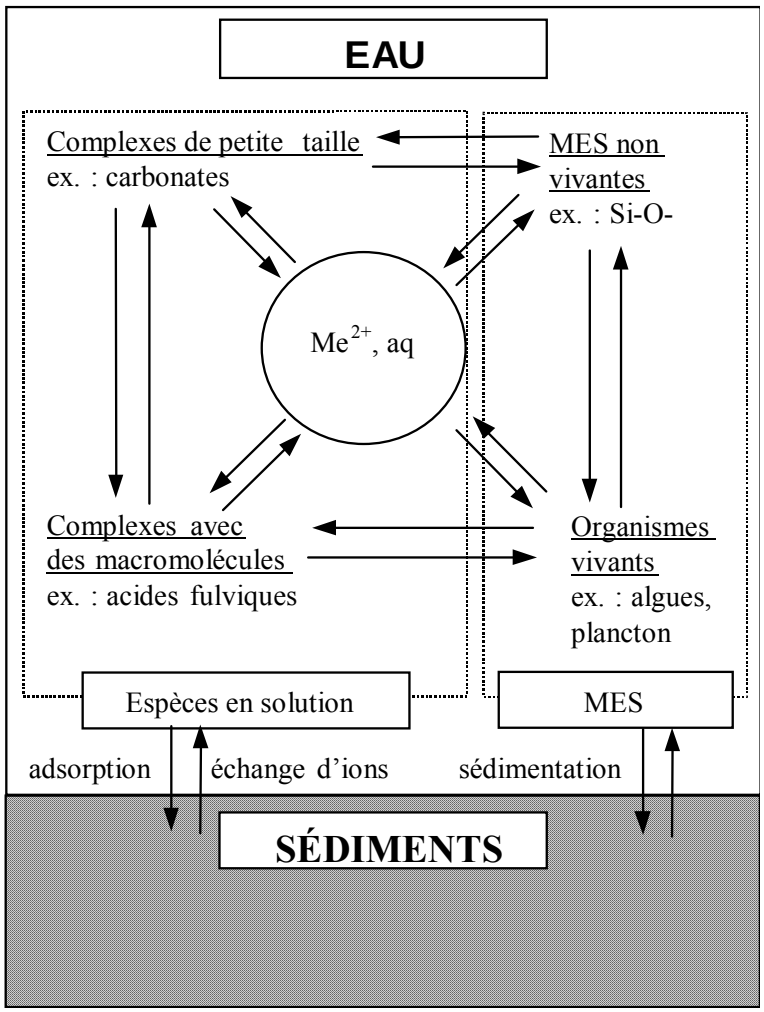


Figure 5 : Réactions entre les différentes formes des métaux (M) en milieu aqueux (Buffle, 1988).

La spéciation des métaux dans les milieux aquatiques est régie par trois types d'interactions : complexation, précipitation et adsorption (Flemming and Trevors, 1989).

1.5.1 Complexation

Les principaux complexants, surtout en eaux douces, sont les ions hydroxyl (OH^-) et carbonate (CO_3^{--}). Les complexes inorganiques prédominants incluent les produits d'hydrolyse du cuivre ($CuOH^+$, $Cu(OH)_2$, $Cu_2(OH)_2^{++}$) et les complexes avec l'ion basique carbonate ($CuCO_3$, $Cu(CO3)_2^{--}$). Dans d'autres cas, HS^-, PO_4^{---}, Cl^- et NH_3 peuvent aussi agir comme des complexants.

La matière organique dans les eaux naturelles est un ligand majeur pour les métaux, et en particulier pour le cuivre (Van der Berg *et al.*, 1986). Ce sont les substances humiques (Kim, 1999 ; Kim *et al.*, 1999 ; Ma *et al.*, 1999), mais aussi les exsudats des organismes vivants (Van der Berg *et al.*, 1979 ; McKnight, 1981 ; Moffett, 1997) et d'autres molécules organiques naturelles (Van der Berg *et al.*, 1986). Dans les eaux à haute productivité biologique, il existe une multitude de ligands organiques de source autochtone ou allochtone, souvent sous forme colloïdale. Ceci inclut les excrétions azotées des organismes supérieurs, acides aminés, polyphénols, métabolites microbiens de faible poids moléculaire, exopolysaccharides microbiens, exsudats d'algues, dérivés humiques et fulviques de la dégradation des végétaux, ainsi que les molécules du cytoplasme (Vasconcelos *et al.*, 1997 ; Vasconcelos and Gomes, 1997).

La stabilité de ces complexes dépend de la nature de l'ion métallique et de l'énergie de liaison des groupes fonctionnels du ligand. L'ion Cu^{++} forme des complexes forts avec les groupes donneurs d'électrons (oxygène, azote et soufre). En connaissant les valeurs des constantes de complexation des différents complexes, il est possible numériquement de prévoir la concentration de cuivre complexé par rapport au cuivre total en solution, à un pH donné. Mais la connaissance imparfaite des caractéristiques des ligands organiques est souvent une limitation importante à ce type de modélisation.

1.5.2 Précipitation

La précipitation de minéraux de cuivre a été suggérée comme une voie majeure de la réduction du cuivre soluble dans les eaux naturelles. Il s'agit principalement des hydroxydes :

- $Cu(OH)_2$: hydroxyde de cuivre
- CuO : ténorite (forme ultime du $Cu(OH)_2$)
- $Cu_2(OH)_2CO_3$: malachite
- $Cu_3(OH)_2(CO_3)_2$: azurite

Les phosphates peuvent aussi former des précipités s'ils sont présents en quantités élevées (ex. : eaux polluées), ainsi que les sulfures en milieu anaérobie. Les précipitations sont régies par les constantes de solubilité. Des diagrammes de solubilité peuvent ainsi être établis, (Stumm and Morgan, 1996). Ceci permet de prévoir, pour une concentration totale en cuivre

donnée, la solubilité du cuivre en fonction du pH et de déterminer les espèces dominantes à l'équilibre.

1.5.3 Adsorption

L'adsorption sur les particules (MES, minéraux de type silicates, cellules vivantes ou non) est un processus significatif dans la baisse du cuivre dissous des eaux superficielles, avec l'incorporation finale aux sédiments. L'adsorption du cuivre sur les particules met en jeu des liaisons plus ou moins fortes, depuis les forces électrostatiques de London - Van der Waals, l'échange d'ions, jusqu'aux liaisons covalentes, ainsi que la coprécipitation avec les oxydes de fer et manganèse et l'incorporation aux feuillets d'argile : Les hydroxydes de fer et manganèse ont des affinités différentes pour les métaux. Pour le cuivre, l'affinité du manganèse est supérieure à celle du fer. Les minéraux argileux contribuent aussi significativement à l'adsorption du cuivre.

Les minéraux argileux (kaolinite, illite, montmorillonite) ont des capacités différentes d'adsorption du cuivre en fonction de leur capacité d'échange cationique (CEC). Ce sont des adsorbants polyfonctionnels, retenant les métaux par échange d'ions, échange isotopique et adsorption chimique.

Dans les sols, jusqu'à plus de 98 % du cuivre total peuvent y être liés. La CEC de la matière organique est plus élevée que celle des argiles. De plus, l'ion Cu^{++} entre en compétition avec la plupart des cations divalents pour les sites d'adsorption de la matière organique, en particulier les substances humiques. On attribue à la matière organique du sol et des sédiments la régulation de la mobilité et de la biodisponibilité du cuivre.

Les cellules vivantes ou mortes (*seston*) contribuent largement à la séquestration du cuivre dans les eaux naturelles. La liaison de l'ion Cu^{++} sur les parois bactériennes est plus forte qu'avec Mn^{++}, Na^{+} et K^{+}. Les parois cellulaires ont une densité de charges anioniques, due à leur biochimie : les métaux y sont associés aux peptidoglycanes, surfaces protéiques et d'autres sites de surface de plus ou moins forte affinité.

Les facteurs influençant l'adsorption/désorption sont le pH, les concentrations totales en adsorbant et en métal, les types et les concentrations en ligands et en cations en compétition dans la solution. En général, la concentration en cuivre dans les argiles et les matières organiques est fonction directe du pH, avec un maximum d'adsorption à un pH autour de 7. La désorption du cuivre accumulé dans les sédiments a fait l'objet de nombreuses recherches car il pose le problème du risque à long terme pour les écosystèmes aquatiques, même après que la source polluante a été éliminée. Ainsi, des ligands qui forment des complexes stables avec le cuivre (CN^{-}), ainsi que de fortes concentrations en cations divalents (Ca^{++} et Mg^{++}, par exemple) peuvent causer une désorption significative du cuivre des sédiments. Le carbone organique dissous des eaux peut aussi augmenter, par compétition, le cuivre dissous.

Afin d'évaluer la spéciation du cuivre dans l'environnement, il est souvent difficile de caractériser complètement les interactions entre les différentes molécules. Les méthodes disponibles permettent de mesurer ou de séparer seulement certaines espèces ou fractions, définies en fonction de leur biodisponibilité attendue et de leur comportement.

1.6 Méthodes de spéciation des métaux dans les milieux aquatiques

La caractérisation des échantillons est en premier lieu basée sur une séparation par taille car les méthodes applicables sur les éléments dissous ou particulaires ne sont pas les mêmes, et car la présence des polluants dans la phase particulaire ou dissoute conditionne leur transport et leur biodisponibilité pour les différentes composantes des écosystèmes. Ce chapitre présente, après une définition claire des termes de spéciation, les méthodes utilisées pour la spéciation des formes dissoutes et particulaires des métaux.

Les différentes espèces chimiques sont caractérisées par leur labilité, c'est à dire leur capacité à se dissocier pour libérer les ions libres. Elle est définie par la constante de complexation avec le ligand considéré (influence des équilibres avec les autres molécules présentes) et de la cinétique de la dissociation.

Les analyses de spéciation sont pour la plupart basées sur une première séparation par taille. On sépare généralement la fraction dissoute des particules par filtration à 0.4-0.45 µm. C'est une définition arbitraire, en particulier en ce qui concerne les colloïdes, présents sur une large étendue de poids moléculaires (environ 1 nm à 1 µm, voir figure 6). De plus, la filtration ne permet pas de différencier les particules « vraies » des flocs instables formés, et ne prend pas en compte les phénomènes de désagrégation - agrégation des particules.

1.6.1 Spéciation des formes dissoutes

Deux grands types de méthodes de spéciation des formes dissoutes des métaux traces se distinguent : les méthodes séparatives proprement dites (séparation par taille, selon la charge, selon la lipophilie) et les séparations de la fraction labile par échange d'ions, résines complexantes, compétition de ligands, Séparation des complexes lipophiles dissous ; les méthodes électrochimiques non séparatives (méthodes potentiométriques et voltampérométriques). Ces méthodes sont parfois utilisées en combinaison dans des schémas de spéciation.

Le but est généralement de déterminer la fraction biodisponible, c'est-à-dire principalement l'ion libre ou labile. Les méthodes séparatives s'attachent à quantifier cette fraction en la séparant, soit parce qu'elle est de petite taille (ions dissous), qu'elle est chargée positivement (cations métalliques) ou que les complexes labiles sont capables de se dissocier pour échanger le métal. D'autre part, les méthodes électrochimiques permettent de mesurer spécifiquement l'ion libre et/ou les complexes labiles.

1.6.1.a Méthodes séparatives

Ces méthodes mettent en œuvre des techniques permettant de définir des fractions de métal distinctes selon leurs propriétés physico-chimiques.

♦ *Séparation par taille*

C'est une séparation physique soit par ultrafiltration, par dialyse, par filtration sur gel ou par centrifugation. La séparation dissous/particulaire (souvent définie arbitrairement à 0.45 µm) laisse en solution des molécules de taille très différentes, allant des ions dissous jusqu'aux macromolécules colloïdales.

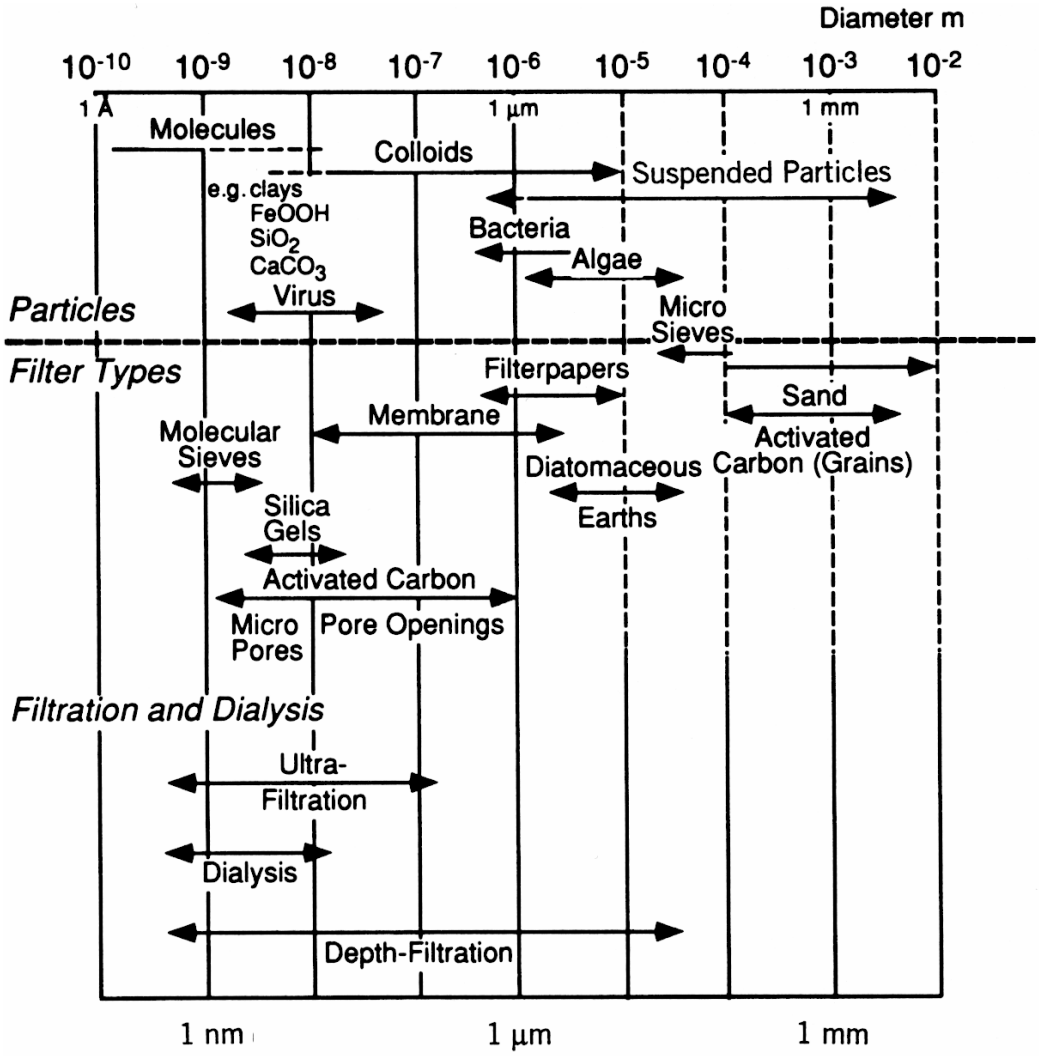


Figure 6 : Spectre des tailles des particules en milieu aquatique et des tailles des pores des différents systèmes de filtration (Stumm and Morgan, 1996).

Une séparation plus fine des molécules par taille peut permettre de mieux caractériser la phase dissoute. Plusieurs techniques sont utilisées :

- dialyse : sépare la fraction de métal échangeable à travers une membrane poreuse (seuil de coupure défini) des formes liées non échangeables. Cette technique est souvent couplée avec des résines échangeuses d'ions ou complexantes (voir plus bas) ;
- ultrafiltration : technique plus rapide que la dialyse, mais pouvant poser des problèmes de modification des équilibres de complexation ;

- filtration sur gel : seule technique permettant d'obtenir une séparation des tailles en un gradient continu (pas de seuils de coupure successifs), et applicable directement à des eaux naturelles. En sortie, il est possible de doser le métal total et le métal libre. Cette technique est cependant limitée par les problèmes d'adsorption sur la matrice (substances humiques…) et de dilutions lors de l'élution ;
- centrifugation / ultracentrifugation : contrairement aux autres techniques, la centrifugation sépare les molécules selon leur densité. Une corrélation taille/densité est ensuite possible.

♦ *Séparation selon la charge (électrophorèse)*

La connaissance de la charge des molécules contenant du cuivre est un outil d'évaluation de l'aptitude des différentes espèces à se fixer sur les membranes biologiques et à les traverser : classiquement, on considère que les membranes sont chargées négativement : elles ont tendance à repousser les molécules anioniques, alors que les cations seraient plus enclins à s'y fixer.

♦ *Échange d'ions et résines complexantes*

Les résines échangeuses d'ions ou complexantes (ex. : Chelex100, BioRex70 de BioRad et Chelamine de Fluka) sont des polymères contenant des groupes fonctionnels capables de se lier fortement avec les métaux, mimant l'action des polymères naturels. Elles sont utilisées afin d'entraîner la dissociation des complexes métalliques naturels, donnant ainsi une idée de la labilité de ces complexes. Les résines de type imminodiacétate (ex. : résine Chelex100) sont utilisées depuis longtemps pour la spéciation des métaux (Riley and Taylor, 1968). Utilisable en *« batch »* ou en colonne, elles offrent une bonne estimation de l'interaction des membranes biologiques avec les espèces chimiques complexées (Flores-Rodriguez, 1992 ; Iqbal, 1992 ; Flores-Rodriguez *et al.*, 1994 ; Tubbing *et al.*, 1994), excepté pour certains ligands comme les sulfures (Morrison, 1987). Certains auteurs ont développé la méthode pour des analyses cinétiques sur une résine (Procopio *et al.*, 1997), ou utilisé un ensemble de résines plus ou moins complexantes pour déterminer empiriquement l'affinité des ligands pour les métaux (Vasconcelos and Gomes, 1997).

Cependant, les résines complexantes ont généralement une affinité supérieure aux complexants naturels et des capacités de fixation des métaux plus élevées. ces méthodes ne

donnent qu'une information partielle et dépendante de la méthodologie adoptée, avec en particulier un risque de surestimer la fraction biodisponible.

♦ *Séparation des complexes lipophiles dissous*

Les méthodes utilisables s'apparentent aux extractions classiquement utilisées pour la séparation des molécules organiques hydrophobes. Cependant, ces séparations ne sont possibles que dans le cas où les complexes sont stables et ne se dissocient pas lors de l'extraction. Les techniques disponibles sont les suivantes : extractions liquide/liquide par solvant organique ; extractions sur cartouche SPE *SepPak C18*.

Toutes les méthodes séparatives pour l'analyse de spéciation des métaux dans les eaux apportent une information indirecte. La concentration en ion libre n'est pas directement mesurable, mais ces techniques permettent de déterminer les paramètres de complexation des espèces labiles, notamment par des procédures de titration. Comme le soulignent Apte and Batley (1995), les résultats obtenus ont une définition opérationnelle et nous manquons encore de validations croisées par d'autres méthodes pour valider les résultats obtenus par de telles méthodes, surtout pour les autres métaux que le cuivre et l'aluminium. En guise de conclusion et de synthèse sur l'ensemble des méthodes non électrochimiques de spéciation des métaux dans la phase dissoute, les applications possibles des différentes techniques sont résumées dans le tableau 3.

Technique	**Métaux étudiés**	**Possibilité de déterminer les concentrations en**			**Relation avec la biodisponibilité**
		ion libre		métal labile	
		mesuré	*calculé*		
Échange sur résines cationiques	Al, Cr(III), autres	Non	Non	Oui	Non
Échange sur résines anioniques	Cr (IV), autres	Non	Non	Oui	Non
Chelex 100 (batch ou colonne)	Cu, Pb, Cd, Zn, Ni, Al	Non	Non	Oui	algues, poissons
Échange sur résine cationique $Al(OH)_3$	Cu, Zn	Non	Non	Oui	algues
Échange d'ions	Cu, Ni	Oui	Non	Non	algues
Équilibre avec MnO_2	Cu, Zn	Non	Oui	Non	Non
Compétition de ligand					
– extraction par solvants	Cu	Non	Oui	Non	Non
– adsorption en phase solide	Cu	Non	Oui	Non	Non
– spectrométrie	Al, Cu, Fe	Non	Non	Oui	poissons, algues
Ultrafiltration/Ultracentrifugation	Divers	Non	Non	?	Non
Dialyse	Divers	Non	Non	?	---
Biotests bactériens	Cu	Non	Oui	Oui ?	---

Tableau 3 : Aperçu des possibilités des méthodes non électrochimiques pour la mesure des espèces labiles des métaux dans les eaux naturelles. Traduit de l'anglais d'après Apte and Batley (1995).

1.6.1.b Méthodes électrochimiques non séparatives

Parmi les méthodes électrochimiques, on distingue celles qui sont basées sur des mesures de potentiel de membrane (ISE) de celles basées sur l'interprétation des courbes intensité de courant - différence de potentiel obtenue pour une concentration donnée (voltampérométrie). Par contre, les mesures potentiométriques s'effectuent à courant quasi - nul et la polarisation est absente.

♦ *Méthodes potentiométriques (ISE)*

L'électrode spécifique permet la mesure directe de l'activité de l'ion libre Me^{++} et la détermination de la capacité de complexation. Les ions métalliques ne sont impliqués dans aucune réaction d'oxydoréduction. On mesure la différence de potentiel qui existe de part et d'autre d'une membrane perméable à l'ion étudié, liée à la différence d'activité des deux solutions. Cette différence de potentiel est mesurée par rapport à une électrode de référence de potentiel fixe quelle que soit la solution dans laquelle elle plonge. De plus, c'est la seule méthode analytique qui permet de mesurer la spéciation des métaux sans affecter l'équilibre de la solution (Florence, 1982b). Son principal désavantage réside dans ses limites de détection assez éloignées des faibles concentrations rencontrées dans le milieu naturel. D'autre part, divers processus de contamination comme par exemple une adsorption et /ou une solubilisation sur la membrane elle-même diminue la validité de la mesure.
L'applicabilité de cette méthode est restreinte par le manque de sélectivité de l'électrode. De plus, l'interférence avec d'autres ions peut être une importante source d'erreurs aboutissant en général à une surestimation de la concentration de l'ion étudié. Ceci a été noté dans le cas de l'utilisation d'une électrode spécifique du cuivre non utilisable dans un milieu riche en chlorures du fait de l'interférence des ions chlorure qui stabilisent les ions Cu(I) déposés à la surface de l'électrode (Mota and Correira dos Santos, 1995).

♦ *Méthodes voltampérométriques*

Elles font partie des méthodes directes qui permettent d'accéder à de faibles concentrations de l'élément étudié et d'évaluer la fraction biodisponible (Laxen and Harrison, 1981). Elles répondent de plus aux exigences d'analyse des métaux ultra traces. Elles permettent de déterminer, avec tout de même certaines restrictions, la concentration en ions libres en présence de différents ligands et les concentrations en métaux traces si le composé est directement ou indirectement électroactif. Elles permettent de différencier les valences pouvant être prises par un élément et de déterminer les différents paramètres physico-chimiques du milieu (coefficient de diffusion, constante de complexation, cinétique). La polarographie est aujourd'hui une méthode physico-chimique très largement utilisée en spéciation.

La voltampérométrie est une méthode d'analyse qui s'appuie sur la mesure du courant qui dépend de la concentration de l'espèce à analyser et de la tension appliquée dans des conditions qui permettent la réduction ou l'oxydation de l'espèce à la micro - électrode choisie. La polarographie met en jeu une électrode à goutte de mercure. Le graphique courant en fonction du potentiel appliqué à l'électrode, obtenu expérimentalement, est appelé voltampérogramme ou polarogramme. L'appareil utilisé permettant d'effectuer ces mesures

est une cellule constituée de trois électrodes plongées dans une solution à analyser et le plus souvent d'un électrolyte inerte appelé électrolyte - support. La première électrode est l'électrode de travail (à goutte de mercure). La seconde constitue l'électrode de référence, non polarisable, dont le potentiel est constant - dans l'idéal, c'est une électrode normale à hydrogène, mais on utilise dans la pratique l'électrode de référence au calomel (Hg / Hg_2Cl_2 / KCl saturé) ou l'électrode de référence au chlorure d'argent (Ag / AgCl / KCl saturé). Enfin, une électrode auxiliaire (ou contre - électrode) généralement en platine permet de minimiser les effets de la chute ohmique.

Lorsque le potentiel de l'électrode de travail atteint une valeur telle que l'espèce présente dans la solution étudiée, est réduite ou oxydée, l'intensité croît brusquement. La micro - électrolyse ainsi réalisée pendant le dosage est de courte durée et ne modifie pas de manière appréciable les concentrations des analytes dans le volume de la solution. Quand on représente graphiquement le courant résultant en fonction du voltage appliqué, on obtient une courbe intensité - potentiel dont l'amplitude, par rapport à l'axe du courant, est directement proportionnelle à la concentration de l'espèce en solution et pour laquelle le point d'inflexion correspond à un voltage (potentiel de demi - vague) qui est caractéristique du composé dans un milieu donné. Cette technique permet donc une analyse à la fois qualitative et quantitative des éléments dosés.

La DPASV (voltamétrie à redissolution anodique à tension différentielle surimposée) est souvent utilisée dans les eaux naturelles du fait de sa bonne sensibilité. Elle s'effectue en deux étapes principales. Tout d'abord, une étape de réduction permet de concentrer les métaux dans la goutte de mercure (formation d'amalgames M-Hg) par une pré - électrolyse à potentiel fixe suffisamment faible pour réduire électrochimiquement les ions métalliques en solution (libres ou complexés). Ensuite, une étape de redissolution est effectuée par balayage du potentiel de l'électrode indicatrice vers les valeurs supérieures pour provoquer la réoxydation du métal amalgamé et faire apparaître par voltampérométrie anodique un signal de courant correspondant à l'élément métallique pré - concentré. Des concentrations très faibles peuvent être déterminées par cette méthode (10^{-9}-10^{-10} mol/L), en particulier en allongeant le temps de pré - électrolyse.

1.6.1.c Schémas de spéciation

Les différentes méthodes peuvent être utilisées seules ou en association selon les auteurs (Tableau 4). La fraction de métal labile est en général déterminé par polarographie. Les fractions moins labiles sont ensuite évaluées par échange sur résine complexante en *« batch »* ou en colonne, définies opérationnellement par le temps de contact. Enfin, le métal inerte est évalué par différence avec le métal total (minéralisation). De plus, deux auteurs définissent des fractions selon des propriétés autres que la labilité des formes : Astruc *et al*. (1981) définissent les fractions *non anionique* et *non cationique* en utilisant des résines de type IRA400 et IRN77 ; Florence *et al*. (1983) utilisent une extraction par des solvants organiques (n-hexane/n-butanol 9/1) pour caractériser les fractions solubles dans les lipides. Si le classement par labilité relative permet d'évaluer la biodisponibilité, ces approches permettent de mettre en évidence certaines propriétés des espèces complexes utiles pour d'autres

mécanismes de biodisponibilité que l'ion libre : le caractère anionique ou cationique ainsi que la liposolubilité des complexes peut avoir une influence sur l'adsorption et l'incorporation du cuivre dans les cellules.

Les méthodes polarographiques permettent de déterminer la spéciation des métaux dans les eaux avec une précision suffisante (Buffle, 1988), avec une estimation de la fraction labile souvent en accord avec la biodisponibilité pour les organismes. Elles sont beaucoup utilisées dans ce sens en milieu marin. Dans les eaux douces, la limite majeure de ces méthodes est la nécessité de modifier les échantillons naturels par l'ajout de solutions tampons et d'électrolyte. D'autre part, les phénomènes d'adsorption des complexes à la surface des électrodes, en particulier des complexes avec les substances humiques, sont une autre difficulté de l'utilisation de ces techniques. Comme les méthodes séparatives, les méthodes polarographiques nécessitent une validation croisée avec des observations sur la biodisponibilité pour les organismes.

Auteur	Technique/Extractant				Fraction
Florence et Batley (1977)	Polarographie				libre
	Résine complexante	Retenu			labile
		Non retenu	Irradiation UV	Libéré	non labile organique
				Non libéré	non labile inorganique
Figura et McDuffie (1979)	Polarographie				libre
	Résine complexante		Retenu en colonne		relativement libre
			Retenu en batch		légèrement labile
	Minéralisation totale				inerte
Lecomte (1981)	Polarographie				libre
	Polarographie avec acide nitrique 1%				facilement libérable
	Résine IRA 400 en colonne				non anionique
	Résine IRN 77 en colonne				non cationique
Florence (1983)	Polarographie				libre
	Chelex100 en colonne	Retenu			labile
		Non retenu			non labile
	Extraction n-hexane/n-butanol 9 : 1				liposoluble
Morrison (1987)	Polarographie				électroactive
	Chelex100 en batch				labile
	Minéralisation totale				inerte
Christensen et Lun (1989)	Chelex100	Retenu en colonne			labile
		Retenu en batch 20h			relativement labile
		Retenu en batch 48h			légèrement labile
		Non retenu			inerte
Tubbing (1994)	Polarographie				polaro-labile
	Chelex100 en colonne				chelex-labile
	Acide nitrique / irradiation UV				organique
Procopio (1997)	Amberlite XAD8	Retenu	< 0.024s		labile
			0.024 à 3 s		quasi-labile
		Pas totalement retenu en 3 s			lentement labile
		Non retenu			inerte

Tableau 4 : Aperçu des schémas de spéciation des métaux dans la phase dissoute basés sur l'utilisation en combinaison de plusieurs techniques.

1.6.2 Spéciation des formes particulaires

Les particules en suspension sont assimilées à du sédiment. Les mêmes méthodes d'extraction et de spéciation sont utilisées.

1.6.2.a Nature des liaisons cuivre - particules

Les particules ont une influence toute particulière sur la spéciation des métaux dans les eaux. Leur grande surface d'échange peut comporter divers complexants et adsorbants.

Les formes identifiées dépendent des conditions du milieu, en particulier de la nature des particules. Sur les supports susceptibles de fixer les métaux, les processus physico-chimiques mis en œuvre sont les mêmes qu'en solution :

- débris minéraux (principalement silicates) dans lesquels les métaux sont complexés sous forme inerte ;
- métaux précipités avec les carbonates, sulfures et hydroxydes ;
- adsorption sur les minéraux argileux : adsorption physique (attraction électrique) ou chimique (échange de proton dans les SiOH, AlOH et $Al_2(OH)$) ;
- adsorption (physique ou chimique (sur COOH et OH)) sur les bitumes, lipides, substances humiques et résidus organiques (Warren and Zimmerman, 1994) ;
- adsorption (physique ou chimique) ou coprécipitation avec les hydroxydes de fer et de manganèse ;
- adsorption physique, pseudomorphisme et coprécipitation avec les carbonates de calcium.

On observe en général une forte disponibilité des métaux dans les sédiments *in situ*, ce qui tend à montrer que la concentration dans l'eau interstitielle est plus contrôlée par l'adsorption/désorption que par la solubilisation ou la coprécipitation. Stumm and Morgan (1996) notent que les processus de sorption sont les principaux facteurs d'interaction entre les métaux et la phase particulaire, principalement sous l'influence du pH. Ils ont pu identifier une compétition des oxydes de fer et manganèse et les métaux sur les sites d'adsorption. L'adsorption du cuivre sur les oxydes augmente avec l'ajout de matière organique. Enfin, la concentration en métal libre dissous suit les isothermes de Freundlich : la partie adsorbée est fonction de la concentration de métal libre dissous.

La modélisation du comportement des espèces particulaires est encore plus complexe que celle des espèces dissoutes. Le comportement des formes particulaires est aussi hétérogène que leur structure, c'est à dire que les réactions au niveau microscopique sont souvent imprévisibles à partir d'une observation globale.

Par exemple, Tessier *et al.* (1979) analysent des sédiments dont le cuivre est majoritairement lié aux carbonates et oxydes. D'autres auteurs ont au contraire identifié le cuivre sédimentaire comme étant plutôt lié aux acides humiques et fulviques. Enfin, les métaux peuvent localement être sous forme réduite et complexés avec des ligands organosulfurés (Elbaz-Poulichet, 1988).

C'est pourquoi la spéciation des métaux dans la phase particulaire est encore essentiellement définie de manière opérationnelle. Il existe principalement deux approches. La première

consiste à effectuer des extractions simples dans le but de mimer une remobilisation des métaux dans la colonne d'eau ou lors d'un processus déterminé pertinent par rapport au milieu étudié (changement de pH, de potentiel d'oxydoréduction…). La deuxième approche consiste à effectuer plusieurs extractions, de manière séquentielle ou parallèle, de manière à identifier des fractions homogènes correspondant chacune à une espèce chimique (ou un ensemble d'espèces chimique proches) et/ou à un comportement homogène par rapport aux processus et paramètres environnementaux.

1.6.2.b Schémas de spéciation

Chronologiquement, la méthodologie adoptée pour étudier les métaux liés aux particules, que ce soient des sols, sédiments ou matières en suspension, a d'abord eu pour but l'extraction des formes mobiles (échangeables) afin d'évaluer la biodisponibilité potentielle. Des méthodes comme l'extraction en solution aqueuse, saline ou complexante (ex. : solution d'EDTA) sont utilisées depuis longtemps. Les schémas d'extractions séquentielles ont été petit à petit complétés par différents auteurs et utilisent différents extractants plus ou moins spécifiques de fractions données (Tableau 5). Les extractions acides, réductrices ou oxydantes miment globalement les changements de conditions environnementales qui peuvent se produire dans un sédiment : apparition de conditions oxiques ou anoxiques, acidification due à l'activité bactérienne…

L'approche par extractions séquentielles pose un certain nombre de problèmes qui en limitent les possibilités d'utilisation et surtout d'interprétation concernant les processus environnementaux (Elbaz-Poulichet, 1988). C'est pourquoi l'utilisation généralisée de schémas de spéciation comme celui de Tessier *et al.* (1979) a été fortement remis en cause (Nirel and Morel, 1990). Les limites des extractions séquentielles sont liées à :

- des problèmes conceptuels :
  - capacité à simuler les processus naturels définissant la biodisponibilité ;
  - la réponse d'un élément dépend plus de ses propriétés chimiques que de son association minéralogique réelle.
- des problèmes opérationnels :
  - échantillonnage et conservation des échantillons ;
  - sélectivité des extractants souvent imparfaite. Les fractions sont définies opérationnellement et pas (ou peu) en fonction de leurs propriétés, et des problèmes de réadsorption peuvent se produire.

En effet, il n'est pas possible de valider de telles méthodes sur des échantillons dont la nature des espèces métalliques est connue, et de définir des entités chimiquement définies : les fractions ne peuvent être qu'opérationnellement définies et n'ont pas de réelle signification chimique. Les échanges de phase durant l'extraction, les effets de matrice et la réadsorption sont des sources d'erreur qu'il est difficile d'éliminer. De plus, la composition minéralogique influence différemment l'extraction et la réadsorption. Et il est vrai par ailleurs que les conditions physico-chimiques utilisées durant l'extraction (réactifs forts et cinétiques rapides) sont difficilement extrapolables aux conditions naturelles (réactifs faibles et cinétiques lentes).

Auteur	Technique/Extractant	Fraction
Engler (1974)	*centrifugation*	*eau interstitielle*
	acétate d'ammonium	*échangeable*
	hydroxylamine + acide chlorhydrique	*facilement réductible*
	peroxyde d'hydrogène + acide nitrique + acétate d'ammonium	*oxydable*
	citrate de sodium + sulfate de sodium	*modérément réductible*
	acide fluorhydrique + acide nitrique	*résiduelle*
Gupta et Chen (1975)	*centrifugation sous azote*	*eau interstitielle*
	acétate d'ammonium	*échangeable*
	hydroxylamine + acides chlorhydrique + acétique	*réductible*
	ou dithionite + citrate	
	peroxyde d'hydrogène + acide nitrique (+ acétate d'ammonium)	*oxydable*
	différence avec métal total	*résiduelle*
Tessier (1979)	*chlorure de magnésium ou acétate d'ammonium*	*échangeable*
	acétate de sodium + acide acétique, pH=5	*acido-soluble*
	dithionite de sodium + Citrate	*réductible*
	ou hydroxylamine + acide chlorhydrique + acide acétique	
	acide nitrique + peroxyde d'hydrogène + acétate d'ammonium	*oxydable*
modifié par :	*acide fluorhydrique + acide perchlorique*	*résiduelle*
Perin (1997)	*hydroxyde d'ammonium*	*échangeable*
	acétate de sodium + acide acétique pH=5	*acido-soluble*
	hydroxylamine + acide chlorhydrique + acide acétique	*réductible*
	acide nitrique + peroxyde d'hydrogène	*oxydable*
	acides fluorhydrique + perchlorique + nitrique + chlorhydrique	*résiduelle*
Warren (1994)	*Hydroxylamine + acide chlorhydrique + acide acétique*	*réductible*
	acide nitrique + peroxyde d'hydrogène + acétate d'ammonium	*oxydable*
	acide fluorhydrique + acide perchlorique	*résiduelle*
Förstner (1980)	*lavage eau distillée*	*eau interstitielle*
	chlorure de baryum + triethanolamine pH = 8.1	*échangeable*
	échange cationique acide	*acido-soluble*
	hydroxylamine + acide chlorhydrique + acide acétique	*réductible*
	peroxyde d'hydrogène + acétate d'ammonium	*oxydable*
	acide fluorhydrique + acide perchlorique	*résiduelle*
Salomons and Förstner (1980)	*centrifugation sous flux d'azote*	*eau interstitielle*
	acétate d'ammonium	*échangeable*
	échangeur cationique acide	*acido-soluble*
	hydroxylamine + acide chlorhydrique	*facilement réductible*
	oxalate d'ammonium + acide oxalique	*réductible*
	DTPA + acétate de sodium	*organique faiblement liée*
	peroxyde d'hydrogène + acétate de sodium	*organique insoluble*
	différence avec métal total (acides fluorhydrique + perchlorique)	*résiduelle (lithogénique)*
Meguellati (1982)	*chlorure de baryum*	*échangeable*
	peroxyde d'hydrogène + acide nitrique + acétate d'ammonium	*oxydable*
	acétate de sodium + acide acétique, pH=5	*acido-soluble*
	hydroxylamine + acide chlorhydrique	*réductible*
	acide fluorhydrique + acide perchlorique	*résiduelle*
Welte (1983)	*acétate d'ammonium*	*échangeable*
	acide acétique	*acido-soluble*
	hydroxylamine + acide chlorhydrique + acide nitrique	*facilement réductible*
	peroxyde d'hydrogène + acide nitrique (+ acétate d'ammonium)	*oxydable*
	hydroxylamine + acides chlorhydrique + acétique	*modérément réductible*
	ou dithionite + citrate	
	acide chlorhydrique + acide nitrique	*résiduelle (lithogénique)*
Morrison (1987)	*chlorure de magnésium*	*échangeable*
	hydroxylamine + acide chlorhydrique + acide acétique	*acido-soluble et réductible*
	acide nitrique + acide perchlorique	*organique*
Lara-Cazenave (1994)	*chlorure de magnésium*	*échangeable*
	hydroxylamine + acide chlorhydrique + acide acétique	*acido-soluble et réductible*
	peroxyde d'hydrogène + acide fluorhydrique + acide nitrique	*oxydable et résiduelle*

Tableau 5 : Aperçu des schémas d'extractions séquentielles des métaux dans la phase particulaire. (Tessier *et al.*, 1979 ; Salomons and Förstner, 1980 ; Welte *et al.*, 1983 ; Morrison and Revitt, 1987 ; Lara-Cazenave *et al.*, 1994 ; Warren and Zimmerman, 1994).

Les schémas de spéciation, s'ils doivent être interprétés avec prudence, fournissent cependant une information utile, qu'il est aujourd'hui difficile d'obtenir autrement. Les nouvelles méthodes de spéciation chimiques, en particulier spectroscopiques et micro - analytiques, sont séduisantes dans des conditions de laboratoire, mais ne permettent pas encore d'obtenir une information globale sur le comportement des métaux sur les particules naturelles.
Des extractions plus simples (extractions aqueuses) peuvent être utiles dans la détermination de la fraction échangeable des métaux, et pour une comparaison avec la biodisponibilité.

1.7 Mesure de la toxicité des métaux traces pour les organismes aquatiques

Les tests écotoxicologiques en laboratoire (encore appelés *bioessais* ou *biotests*) ont fait l'objet d'un développement et d'une standardisation conséquentes afin de fournir des outils adaptés à l'évaluation des dangers des substances dans la démarche d'évaluation des risques. L'objet de tels essais est la mise en évidence d'effets toxiques sur des populations représentatives des écosystèmes et appartenant à des niveaux trophiques différents. Dans le cas des écosystèmes aquatiques, on évalue généralement les effets sur des bactéries, des producteurs primaires (algues), des consommateurs primaires (microcrustacés) et consommateurs secondaires (poissons).

Dans l'idéal, l'évaluation des dangers des substances s'effectue dans des conditions aussi proches que possibles des écosystèmes naturels (écosystème reconstitué en mésocosme ou études *in situ*). Cependant, compte tenu des coûts qu'engendrent la mise en œuvre de tels tests, leur utilisation pour évaluer les dangers des quelque 100 000 substances chimiques existantes et des 1 000 nouveaux produits mis en circulation chaque année est limitée. Depuis les premières études à ce sujet dans les années 1970, une démarche plus pragmatique a conduit au développement d'un ensemble de biotests et à leur standardisation par les instances internationales (ISO, OCDE, UE…) ou nationales (ASTM, AFNOR, DIN…). Une évolution logique a conduit à une miniaturisation des procédures, alors appelés microbiotests (Wells *et al.*, 1997). Dans ce sens, les micro-organismes (protozoaires, algues, bactéries, champignons, levures) réunissent de nombreux avantages qui ont favorisé leur utilisation.

Quel que soit l'organisme, le principe général de ces tests repose sur l'établissement d'une corrélation entre la dose d'exposition et l'effet toxique, représentée sous la forme d'une courbe dose - réponse (Figure 7). Dans la pratique, différentes concentrations de polluant sont testées, et l'effet (mort des organismes, inhibition d'activités métaboliques…) exprimé par rapport à la réponse du contrôle (milieu standard sans effet). La toxicité est généralement exprimée -de manière synthétique- en concentration effective (CE_X), concentration pour laquelle X% d'effet est observée. On calcule classiquement la CE_{50}, concentration effective où l'on observe 50 % d'effet. Cependant, si la CE_{50} est utile pour l'interprétation de tests en

laboratoires, elle peut être perçue comme un critère de protection non suffisant dans un but de protection des écosystèmes et l'établissement des PNEC (la barrière de 50% d'effet est considérée comme un effet non acceptable). On lui préfère alors la concentration maximale pour laquelle aucun effet n'est observé (NOEC, *« No Observed Effect Concentration »*) ou la concentration minimale pour laquelle un effet est observé (LOEC, *« Lowest Observed Effect Concentration »*).

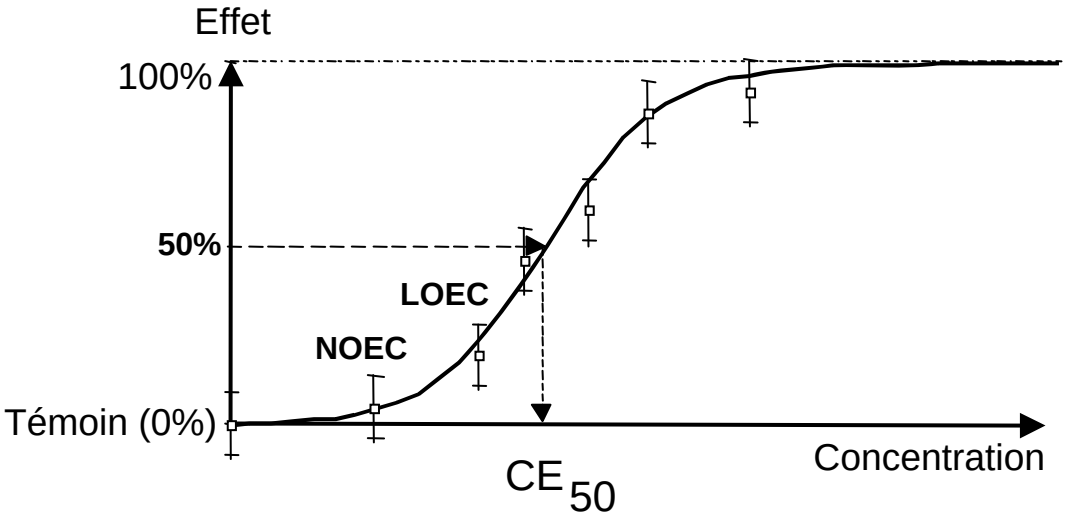


Figure 7 : Relation Concentration-Réponse type obtenue lors d'un bioessai.

L'établissement des courbes dose - réponse a nécessité le développement de différents modèles de régression plus ou moins adaptés à un bioessai donné (polynomial, Log-logistique, Probit, Weibull…). D'autre part, le calcul des NOEC et LOEC est généralement effectué par des tests de type ANOVA (Dunnett, Williams, Jonkheere-Terpstra...). Cependant, l'établissement des NOEC et LOEC est problématique (Chapman and Caldwell, 1996) car il est dépendant des conditions opératoires (choix des concentrations testées et nombre de réplicats). Ceci a conduit certains auteurs à calculer des CE_X faibles (ex. : CE_5, CE_{10} ou CE_{15}), ce qui permet en outre de donner un intervalle de confiance sur la valeur estimée. L'influence du traitement statistique des données écotoxicologiques sur le résultat obtenu (CE_X, NOEC, LOEC) a récemment été étudié (Isnard *et al.*, 2001), et a montré que le modèle choisi a une grande influence sur la valeur de la CE_5 ou CE_{10}. Au contraire, le calcul de la CE_{50} est plus précis et robuste, et donc préférable au moins dans des études de comparaison de toxicité.

1.7.1 Biotests sur des micro-organismes

Comme le définissent Cairns and Pratt (1989), les biotests ont pour but de fournir un substitut pour l'étude des effets sur l'ensemble des organismes des écosystèmes naturels. Ils sont

particulièrement utiles dans la démarche d'évaluation des risques des substances, à condition que l'on puisse répondre aux cinq principes suivants (Tebo, 1985) :

- que signifie la réponse obtenue par le biotest en termes de dangers pour l'environnement ?
- la réponse obtenue en laboratoire peut-elle être extrapolée au système étudié ?
- le biotest utilisé est-il suffisamment sensible pour éviter de fausses réponses négatives ?
- la précision du biotest est-elle suffisante ?
- le biotest est-il suffisamment simple et standardisé pour être reproductible ?

Cependant, le choix de biotests est toujours le résultat d'un compromis visant à répondre à des critères parfois incompatibles. Les micro-organismes sont souvent utilisés car ils permettent de répondre au mieux aux contraintes suivantes :

- représentativité de la fonction biologique : les micro-organismes sont des membres significatifs des écosystèmes (rôle dans les cycles de nutriments et d'énergie) ;
- pragmatisme : le maintien en culture des micro-organismes est aisé, rapide et peut être effectué dans des conditions contrôlées en nombre important ;
- possibilité de substitution : les micro-organismes peuvent servir de modèles pour représenter les effets sur des organismes plus complexes dans les écosystèmes ;
- spécificité de la réponse : les réactions des micro-organismes aux substances toxiques permettent de mieux comprendre le type d'action métabolique ;
- niveau trophique : les micro-organismes sont situés à la base des écosystèmes, espèces « sentinelles » indicatrices d'effets potentiels.

L'utilisation des micro-organismes est possible pour des études avec une seule espèce et une molécule, mais aussi dans des biotests plus complexes mettant en œuvre des communautés et de multiples contaminants, ce qui en augmente la représentativité. Cependant, la complexification du test signifie aussi l'augmentation des problèmes analytiques et de mise en œuvre. Les biotests utilisant des micro-organismes restent néanmoins des outils privilégiés pour l'étude de systèmes complexes comme l'effet de contaminations multiples ou l'interaction avec d'autres paramètres physico-chimiques.

Afin de prendre en compte l'effet des molécules chimiques sur différentes espèces, et pour pallier les problèmes de mise en œuvre de biotests sur des communautés, de nombreuses études ont proposé d'utiliser des « batteries » de biotests, comme dans des études récentes (Canna-Michaelidou *et al.*, 2000 ; Castillo *et al.*, 2000 ; Fochtman *et al.*, 2000 ; Marsalek and Rojickova-Padrtova, 2000 ; Pardos *et al.*, 2000b ; Pardos *et al.*, 2000a). L'approche consiste généralement à utiliser plusieurs biotests simples, économiques et rapides sur différents micro-organismes, ce qui élargit le spectre des réponses obtenues et améliore la représentativité vis-à-vis des effets réels dans les écosystèmes.

Avec les développements récents de marqueurs biochimiques divers, les biotests sur les micro-organismes ne se limitent plus à une numération cellulaire ou au suivi de la viabilité,

mais peuvent donner des informations précises d'effet sur les activités enzymatiques, respiratoires, photosynthétiques, l'intégrité des cellules…

1.7.1.a Mesure de la toxicité sur les micro-organismes

Certaines précautions doivent être prises pour effectuer un biotest dans des conditions acceptables. L'état des cultures utilisées doit être vérifié : conditions axéniques, état nutritionnel, conditions de croissance, âge de la culture… En particulier, la sensibilité des organismes doit être vérifiée par un biotest avec une substance toxique connue. En effet, lors du maintien des cultures au laboratoire, il existe un risque de dérive de la sensibilité due à une contamination par d'autres organismes ou, au vu des taux de croissance rapides des micro-organismes, à une mutation génétique par rapport à la souche initiale. La disponibilité d'une souche axénique parfaitement caractérisée est alors nécessaire pour l'éventuelle reconstitution d'un inoculum de sensibilité constante.

♦ *Effets globaux*

L'effet toxique peut être évalué par l'inhibition du taux de croissance ou par la réduction de la biomasse finale. Le taux de croissance est une expression de la variation de la biomasse par unité de temps. On peut lui préférer le temps de génération. Un paramètre plus simple est une simple évaluation finale de la biomasse après un temps d'incubation donné par turbidimétrie, gravimétrie, spectrophotométrie, potentiométrie, comptage électronique de particules (ex. : Coulter Counter), comptage de colonies… (Mayfield, 2001). D'autres effets globaux sur les organismes peuvent être utilisés, comme les mesures respirométriques, micro-calorimétriques ou encore la mobilité.

♦ *Activités enzymatiques*

Les enzymes, parce qu'elles jouent un rôle crucial dans le métabolisme de tous les organismes, peuvent être utilisées comme indicateurs d'effets toxiques. Ces biotests, bien que spécifiques aux enzymes et aux organismes utilisés, identifient des effets plus généraux représentatifs des fonctions métaboliques dans les écosystèmes. Obst *et al*. (Obst *et al.*, 1997) ont fait la synthèse des différentes méthodes utilisant l'inhibition enzymatique pour examiner les effets toxiques dans les écosystèmes aquatiques. Elles se répartissent en méthodes *in vitro* (utilisation d'enzymes dissoutes comme catalyseurs pour déterminer des substances réactives) et *in vivo* (détermination des activités enzymatiques dans les organismes).

- *tests d'activité enzymatiques in vitro*

Le principe consiste à mesurer l'inhibition de l'activité d'une enzyme spécifique sur son substrat en solution par la substance ou l'échantillon à tester. Cette inhibition indique un effet potentiel pour les organismes qui utilisent cette enzyme. C'est le cas du test d'inhibition de l'acetylcholine-estérase, particulièrement sensible aux pesticides organophosphorés de type carbamates ; du test d'inhibition de l'acetaldéhyde-déshydrogénase sensible aux fongicides de

type ethenbidithiocarbamates ; du test d'inhibition de l'uréase sensible aux métaux. Ces tests peuvent donc être utiles pour identifier l'effet spécifique de certains contaminants.

Bien que les réactions soient très spécifiques, des interactions non spécifiques peuvent se produire et les limites de détection sont parfois peu réalistes vis-à-vis des niveaux de contamination courants des eaux naturelles.

- *tests d'activité enzymatiques in vivo*

Les activités enzymatiques *in vivo* sont liées aux processus de dégradation des contaminants par les micro-organismes, pour leur propre métabolisme et la production d'énergie, par des exo - enzymes excrétées dans le milieu ou des enzymes intracellulaires après transport du substrat dans les cellules. Les activités enzymatiques *in vivo* sont donc des indicateurs de la capacité de dégradation des contaminants par les micro-organismes. Ces méthodes sont basées sur l'ajout, dans le milieu du biotest, de substrats contenant un chromophore ou fluorophore. Après incubation dans des conditions contrôlées, les métabolites sont mesurés par spectrophotométrie.

Un large spectre d'activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme des micro-organismes est utilisable. Le tableau 6 reprend les principales enzymes utilisées pour les biotests. Ce sont des méthodes généralement sensibles, qui peuvent être utilisés comme indicateurs précoces d'effets sur les micro-organismes. D'autre part, des enzymes comme les déshydrogénases ou les ATPases sont présentes de tous les micro-organismes, alors que d'autres sont plus spécifiques de certains groupes de micro-organismes (ex. : nitrate-réductase). L'extrapolation possible des résultats pour les écosystèmes étudiés en sera donc différente.

Enzyme	Effet mesuré	Commentaires
Déshydrogénases	Mesure des métabolites de la réduction ou de l'oxydoréduction	Largement testé dans les eaux, eaux usées, sols, sédiments
ATPase	Mesure de la concentration en phosphates en utilisant l'ATP comme substrat	Utilisation en tests *in vitro* et *in vivo*
Estérases	Dégradation d'un substrat non fluorescent en métabolite fluorescent	Sensibilité de l'acétylcholine-estérase aux pesticides organophosphorés
Phosphatases	Mesure de la partie organique du substrat (ex. : phénol) ou du phosphate produit	Faible sensibilité aux métaux
Uréase	Mesure de l'ammonium produit à partir de l'urée	Principalement utilisé dans les sols, et plus récemment dans les eaux
Luciférase	Mesure de la production de lumière à partir d'ATP comme substrat	Utilisé dans le bioessai ATP-TOX
Tryptophanase, β-galactosidase et α-glucosidase	Mesure de l'hydrolyse du substrat de l'enzyme	Effets sur l'activité enzymatique et la biosynthèse

Tableau 6 : Activités enzymatiques ou biosynthèses utilisés comme indicateurs d'effets toxiques aigus. D'après Bitton and Morel (1997).

1.7.1.b Cas particulier du test d'inhibition de la bioluminescence (Microtox®)

Les bactéries, de part leurs capacités d'adaptation aux différents stress et la structure de leur membrane, sont relativement peu sensibles aux polluants et ne sont pas *a priori* des organismes sentinelles de choix concernant les écosystèmes aquatiques. Cependant, ces organismes ont une grande importance dans les écosystèmes, tant au niveau quantitatif (biomasse) que fonctionnel (rôle dans les cycles biogéochimiques). Il est donc indispensable de disposer de tests écotoxicologiques permettant d'évaluer les effets sur les bactéries.

L'utilisation de la bactérie *Vibrio fischeri* a connu un essor important dans les batteries de tests écotoxicologiques en tant qu'organisme représentant le groupe des bactéries. C'est une bactérie marine dont la luminescence naturelle peut être facilement mesurée pour évaluer son activité métabolique. La luminescence est liée à un ensemble de réactions métaboliques mettant en jeu une enzyme, la luciférase, dont l'activation est étroitement liée au processus métabolique de la glycolyse et de la respiration cellulaire par les couples de coenzymes (NAD-NADH et FMN-FMNH). Les molécules ayant une action sur les activités métaboliques sont toutes susceptibles d'entraîner une baisse de la luminescence des bactéries.

Les tests écotoxicologiques basés sur l'inhibition de la luminescence de la bactérie *Vibrio fischeri* ont été standardisés (norme ISO 11348). Le test est principalement commercialisé sous le nom de test Microtox® (Microbics-Corporation, 1992), mais d'autres distributeurs proposent aujourd'hui des tests prêts à l'emploi basés sur des protocoles similaires, et donnent des résultats comparables (Jennings *et al.*, 2001). Enfin, dans un souci de miniaturiser le test, une méthode en microplaque a été proposée par Blaise *et al.* (1994) avec des résultats comparables aux procédures classiques.

Le test a aussi été utilisé pour déterminer la toxicité des phases solides après extractions de sols (ex. : Maxam *et al.*, 2000) et de MES (ex. : Pardos *et al.*, 2000a). Mais le test s'est montré moins sensible que d'autres bioessais (Lau and Chu, 1999). De plus, le choix de la méthode d'extraction a une influence sur le résultat (Dombroski *et al.*, 1996 ; Harkey and Young, 2000) et la toxicité peut être faussée par la présence de soufre élémentaire dans les extraits (Pardos *et al.*, 1999).

La principale critique de ce test est qu'il apparaît peu réaliste vis-à-vis d'une exposition réelle, en particulier pour les milieux d'eau douce, le test devant être effectué à une force ionique élevée. D'autre part, le temps très court d'exposition est aussi une limitation à l'extrapolation des données. Cependant, des tests chroniques sur la même bactérie n'ont pas été montré plus sensibles aux métaux (Froehner *et al.*, 2000 ; Gellert, 2000), certainement à cause de la nécessité de l'utilisation d'un milieu de culture plus complexe et de la mise en place d'autres mécanismes métaboliques. Une bonne corrélation est même observée avec les données de

toxicité sur d'autres espèces comme le poisson ou la daphnie (Kaiser, 1998), mais les ordres de grandeur de sensibilité sont parfois très différents, en particulier pour les contaminants inorganiques que sont les métaux (Munkittrick *et al.*, 1991). Les sensibilités sont plus proches pour les polluants organiques et lipophiles.

Lest bioessais apparaissent comme des outils complémentaires aux analyses de spéciation chimique des métaux (Stauber and Davies, 2000). D'une part les tests biologiques sont indispensables pour évaluer les niveaux d'effet de l'ion libre et étudier les mécanismes de toxicité sur les différents types d'organismes. D'autre part, ils donnent une réponse globale par rapport aux différentes espèces chimiques présentes dans l'échantillon et à leurs interactions (effets additifs, synergie, antagonisme). Cependant, une comparaison de la spéciation chimique avec les réponses observées par les bioessais exige une maîtrise - au moins partielle - des conditions dans lesquelles les tests sont effectués. Les milieux dans lesquels sont effectués les tests doivent donc être caractérisés au mieux, ainsi que les mécanismes mis en jeu dans l'effet observé. C'est pourquoi le choix de micro-organismes est un bon compromis (Wells *et al.*, 1997 ; Persoone *et al.*, 2000) : les bioessais utilisant ce type d'organismes sont effectués dans des milieux relativement simples, et leur comportement est bien documenté.

CHAPITRE 2
MATERIEL ET METHODES

Ce chapitre rassemble les informations sur les méthodes utilisées : la séparation des particules (>1 µm) et des colloïdes (>20 nm) ; les caractérisations physico-chimiques (pH, conductivité, ions majeurs, métaux traces, Simazine et Diuron) ; le calcul de la spéciation chimique du cuivre en solution par calcul avec MINEQL+ et par DPASV, la spéciation du cuivre particulaire par extractions séquentielles ; les biotests effectués avec l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* et la bactérie *Vibrio fischeri*. Enfin, les méthodes statistiques utilisées sont présentées, avec en particulier la méthode utilisée pour le calcul des CE_{50}.

Nous présenterons tout d'abord le site d'étude, le bassin versant de Roujan, qui se montre particulièrement pertinent par rapport aux objectifs fixés. Après un bilan des connaissances actuelles sur le site – acquises par le laboratoire Sol et Environnement de l'INRA de Montpellier – nous présenterons les procédures d'échantillonnage sur les deux parcelles étudiées.

2.1 Site d'étude : le bassin versant expérimental de Roujan

2.1.1 Bilan des connaissances sur le bassin versant

2.1.1.a Caractéristiques générales

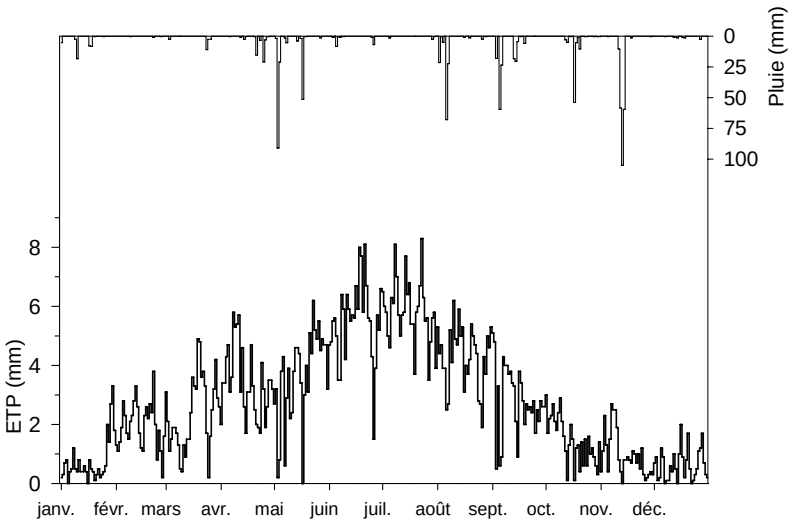
Les données sur les caractéristiques du bassin versant de Roujan présentées ci-dessous sont principalement issues du rapport d'Andrieux *et al.* (1993).

Le bassin versant élémentaire de Roujan est représentatif du contexte languedocien concernant les mutations agricoles en cours, la diversité agronomique et les itinéraires culturaux pratiqués. Il présente en outre une variété de situations topographiques et géomorphologiques, avec un exutoire bien défini, ce qui en fait un site privilégié pour les études hydrologiques.

Ce bassin versant est situé dans le bassin versant de la Peyne, un affluent de l'Hérault. Le bassin versant de l'Hérault couvre environ 120 km^2 de superficie (Figure 9). Il peut être divisé en deux ensembles géographiques distincts : la haute vallée (relief accidenté, végétation de type maquis et chêne-vert) et la basse vallée (relief plus adouci et paysage viticole typique de la moyenne vallée de l'Hérault).

Les spécificités de ce bassin versant, par rapport à d'autres bassins versants étudiés en France concernent principalement sa forte anthropisation, son appartenance à la zone climatique méditerranéenne (forte variabilité inter- et intra-annuelle du régime pluviométrique avec des crises prononcées) et une forte dominance de la culture de la vigne (couverture végétale discontinue à enracinement très hétérogène). La vigne occupe plus de 70 % de la surface agricole utile avec une production principale de vin rouge de consommation courante. On assiste progressivement à un abandon des terrassettes, une amélioration des cépages ainsi qu'une diversification culturale.

Les caractéristiques des crues observées sont en premier lieu dépendantes du climat, de type « méditerranéen subhumide » à saison sèche prolongée (Figure 8). La pluviométrie moyenne est de 650 mm (70 à 80 jours de pluie par an) caractérisée surtout par des orages diluviens et des crues parfois dévastatrices. La température est de 10 à 20 °C (minima en janvier, de 3 à 11 °C et maxima en juillet, de 18 à 30 °C). Les vents dominants sont la tramontane (orientation nord-ouest, 33.7 % des relevés), le mistral (nord-est, 16.4 %), le grec (sud-est, 11.6 %) et le marin (sud, 10.6 %). L'évapotranspiration potentielle est de 1 094.4 mm/an avec un maximum en juillet et un minimum en janvier.



d'après la table journalière pour l'année 1999.
Source : Serveur Meteo Diamant (Agroclim).

Figure 8 : Pluie et évapotranspiration potentielle (ETP Penman) quotidiennes moyennes relevées sur le bassin versant de Roujan en 1999.

Le bassin versant de Roujan a une surface de 91 ha. Son altitude est comprise entre 75 et 125 m (43°30'nord, 3°19'est). Le système hydrographique est composé d'un collecteur central d'écoulement (1 à 2 m de profondeur, 1.5 à 2 m largeur) auquel est rattaché un réseau de fossés secondaires. Ce réseau aboutit par l'intermédiaire du ruisseau Bourdic à la Peyne (rive droite). Les débits enregistrés à l'exutoire du bassin versant sont compris entre 0 et 1500 L/s. Les évènements de ruissellement (années 1992 à 1995) sont caractérisés par un ruissellement compris entre 0 et 40% de la pluie pour chaque événement pluvieux. Le temps de réponse moyen du bassin versant est de 30 à 60 min, les crues durent de quelques minutes à 12 h à l'exception de quelques épisodes plus longs.

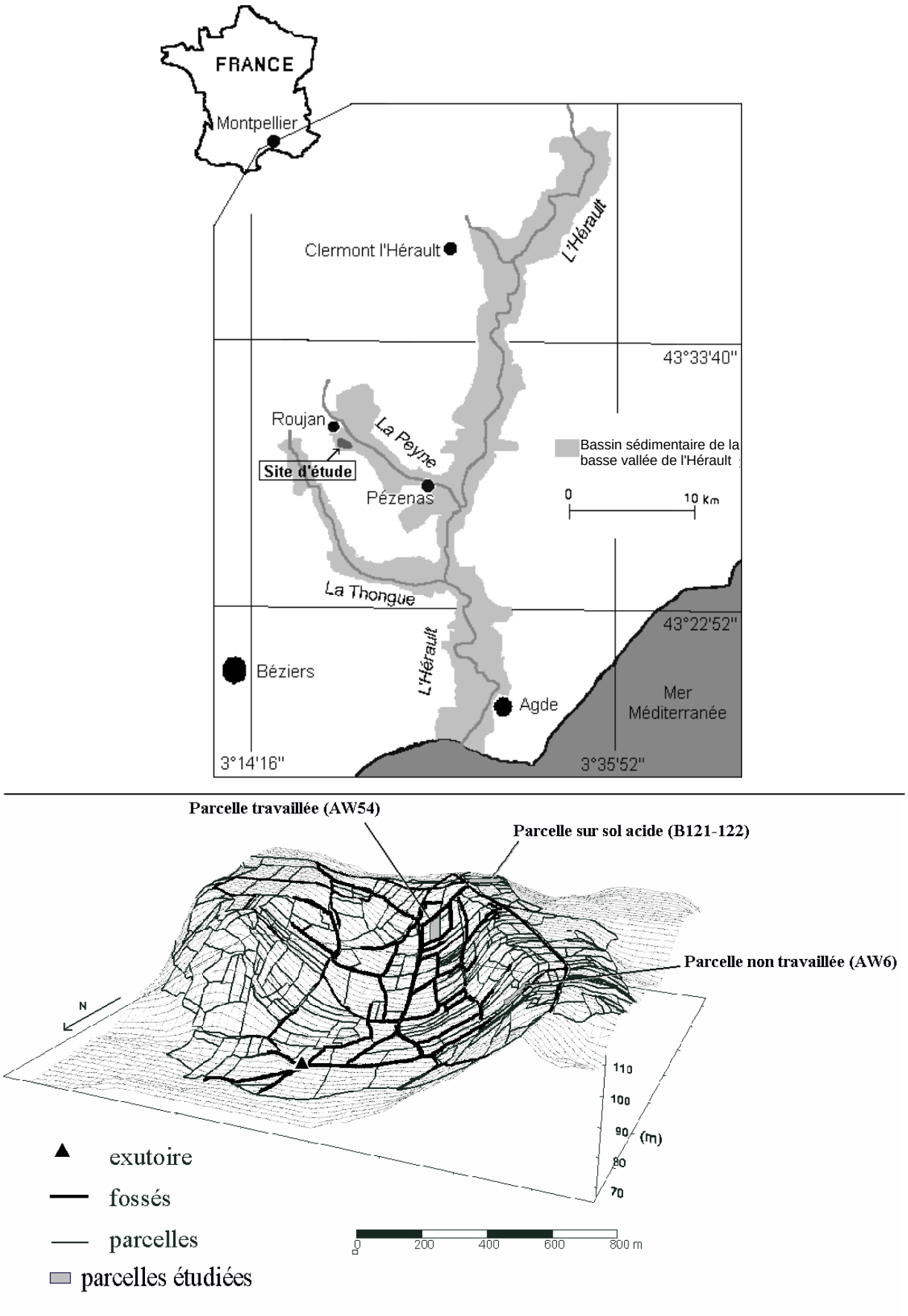


Figure 9 : Situation du bassin versant expérimental de Roujan dans la vallée de l'Hérault *(d'après le catalogue des domaines hydrogéologiques Languedoc Roussillon – Midi Pyrénées. Agence de bassins Rhône-Méditerranée-Corse, 1983)* et représentation spatiale (parcellaire, réseau routier et de fossés) avec situation des parcelles étudiées (INRA Montpellier).

Concernant le sous-sol, le bassin versant est proche des anciennes lignes de rivage de la mer miocène, et les faciès de bordure y sont par conséquent bien représentés. Il se caractérise par une dissymétrie de répartition des corps sédimentaires (dépôts exclusivement continentaux du pliocène et villafranchien). Le faciès du versant ouest est très divers alors que l'est est constitué d'une structure massive calcaire (Puech Moule).

Quatre zones géomorphologiques peuvent être distinguées su le bassin versant de Roujan, sur lesquels différents types de sols se sont formés :

- le plateau est constitué de formations pliocènes (sud-est) ou villafranchiennes en plaques. Des formations calcaires sont localisées en bordure. Il culmine à 125 m (27 % de la surface totale) et forme un vaste impluvium. Les sols sont caillouteux, de texture assez fine et de couleur brun-rouge en surface et rougeâtre en profondeur. Ils sont répartis en deux sous-ensembles : à l'ouest des sols acides sur dépôts villafranchiens, avec cailloutis quartzeux enrobés dans des matériaux argilo-sableux rubéfiés [*fersialisols* (classification française) ou *nitisol* (WRB-FAO)] ; à l'est, des sols rouges caillouteux mais recarbonatés [*rendosols* (classification française) ou *calcaric leptosol* (WRB-FAO)] ; des terrasses sont aménagées sur la zone de pente accentuée (10 à 20 %) qui occupe 33 % du bassin versant, sur des affleurements calcaires et un substrat sablo-gréseux (molasse). Les sols y sont majoritairement calcaires [*calcosols* (classification française) ou *calcisol* (WRB-FAO)] à texture limono-sableuse, ce qui explique leur faible stabilité structurale de surface. ;
- le glacis colluvial, sur les versants en pente douce de 5 % (26 % de la surface totale). Les sols sont limoneux et faiblement calcaires, avec des profils peu différenciés [*coluviosols calcaires* (classification française) ou *calcaric cambisol* WRB-FAO)] ;
- la dépression très évasée avec une pente faible de 1-2 % (12 % de la surface totale) est formée de dépôts alluvio-colluviaux sur substratum miocène, drainée par un fossé aboutissant au Bourdic. Les sols sont calcaires à texture plus fine, nettement hydromorphes [*colluviosols réductiques calcaires* (classification française) ou *gleyic cambisol* (WRB-FAO)] du fait de la présence de la nappe permanente.

D'autre part, deux réservoirs hydrogéologiques se distinguent :

- le plateau : ce sont des nappes temporaires 3 à 6 m de profondeur qui s'installent lors des fortes pluies d'automne. En période de crue, la nappe affleure. La vidange s'opère par des écoulements latéraux en bordure de plateau (suintements en tête de talweg principal) ou par des sourcins (ou mouillères) en milieu de versant.
- Le système glacis-dépression contient une nappe permanente sur une couche imperméable à 6 ou 8 m de profondeur. Elle oscille entre la surface et 1m de profondeur suivant les précipitations, et subit l'influence du déversement de la nappe de plateau. Le rabattement est assuré par le réseau de fossés.

Les sols sont principalement de type carbonaté et « basique ». Seules quelques zones sur le plateau sont acides. Ces caractéristiques auront sans doute une influence sur la spéciation du cuivre dans les sols et MES.

Les données climatiques (pluies intenses faisant suite à des périodes de forte sécheresse), topographiques (pentes accentuées sur les terrasses), culturales (dominance de la viticulture) et hydrographiques (importance du réseau de fossés) présagent de l'importance de l'érosion et les transferts de polluants par ruissellement.

2.1.1.b Caractéristiques des crues

Grâce au traçage chimique et isotopique naturel sur plusieurs crues de 1993 à 1995 (Ribolzi, 1996), il a été possible de ressortir les principaux facteurs influents : quelle que soit la période (humide ou sèche), le ruissellement de surface intervient dans l'écoulement rapide de crue. En période humide, les nappes souterraines interviennent, mais avec une contribution inférieure au ruissellement. Les écoulements hypodermiques ne sont pas significatifs.

Par exemple, l'analyse de la crue du 14 et 15 avril 1993 a confirmé l'importance de la contribution de l'eau « nouvelle » (eau météorique) dans l'écoulement rapide de crue (environ 80% à la pointe de crue). L'essentiel s'achemine vers l'exutoire par voie superficielle, et correspond au refus d'infiltration à la surface des sols. Le traçage a aussi permis de montrer que l'essentiel du ruissellement de surface est originaire des versants. L'eau « préexistante » de la nappe de la dépression est une composante minoritaire du mélange à l'exutoire. Confirmées sur d'autres crues (2 à 3 novembre 1994, 4 à 5 novembre 1994 et 18 septembre 1995), ces observations concluent principalement que le ruissellement de surface constitue le processus majeur de la genèse de la crue.

On peut expliquer le fonctionnement hydrologique du bassin versant par quatre étapes principales (Voltz *et al.*, 1997) :

(1) à la surface des parcelles : ruissellement hortonien (*infiltration excess overland flow*) majoritaire sur les sols croûtés.
(2) collecte du ruissellement de surface par les fossés. Il se mêle aux autres ruissellements et à la pluie directe.
(3) recharge de la nappe de plateau par infiltration à travers le sol ou réinfiltration de l'eau circulant dans les fossés.
(4) La nappe de plateau soutient le débit jusqu'à sa vidange complète. L'écoulement à l'exutoire du bassin versant hors période de crue (débit de base) correspond à la vidange de la nappe de la dépression par les fossés.

Le ruissellement de surface constitue donc, en terme de flux, l'apport principal à la Peyne en période de crue, par l'intermédiaire du réseau de fossés. L'intensité des précipitations, sous un climat méditerranéen, favorise d'autant plus le ruissellement et l'entraînement de polluants dissous et particulaires. Cela illustre l'intérêt du site pour l'étude du transfert des polluants par ruissellement, et à leur impact sur les écosystèmes aquatiques récepteurs. Cependant, comme les autres facteurs déterminant les flux de matière dans le bassin versant, la parcelle est

l'échelle d'étude privilégiée. Le ruissellement est en effet principalement conditionné par l'état de surface du sol (rugosité, présence d'un couvert végétal et présence d'une croûte) qui est spécifique à chaque parcelle (Leonard and Andrieux, 1998).

2.1.1.c Utilisation des produits phytosanitaires sur le bassin versant

Une enquête réalisée dans le cadre du projet AIP INRA Ecospace / Allegro-Attila (Louchart *et al.*, 1997), a permis de réaliser :

- un inventaire et la typologie des itinéraires culturaux sur le bassin versant de Roujan : construction d'une base de donnée à partir d'enquêtes auprès des viticulteurs – synthèse des principales pratiques culturales et de désherbage ;
- une évaluation des risques de pollution diffuse par les produits phytosanitaires utilisés, au niveau de la parcelle.

Le bilan en 1996 sur l'occupation du sol a permis de montrer que la vigne occupe 67.5 % de la superficie avec 3 cépages dominants : Carignan noir (21.3 %), Aramon (20.5 %) et Syrah (16.3 %). Les surfaces sur le bassin versant sont réparties ainsi :

- 36.58 ha (62 parcelles) en vignes palissées (62.3 % des vignes)
- 22.18 ha (67 parcelles) en vignes en gobelet (37.7 % des vignes)
- 21.46 ha (84 parcelles) en friches et garrigues
- autres occupations : céréales (3.7 ha, 5 parcelles), Jachère (2.12 ha, 4 parcelles), Arrachage (1.69 ha, 5 parcelles), Maraîchage (1.63 ha, 5 parcelles), Luzerne (1.38 ha, 3 parcelles), Lagune (1.33 ha, 2 parcelles).

Deux principales pratiques culturales ont été identifiées en fonction du type de désherbage : désherbage chimique total sur l'ensemble de la parcelle (application d'herbicides par aspersion) et désherbage mixte (désherbage chimique sur le rang et mécanique sur l'inter-rang par labour sur 8-15 cm).

L'étude menée en 1995 note que, parmi les pesticides appliqués (hormis le cuivre et le soufre), les herbicides présentent le risque majeur de pollution diffuse des eaux (voir choix des variables d'exposition et d'effet au tableau 7 et quantités de pesticides appliqués au tableau 8). Les principaux facteurs déterminant la mobilisation des pesticides sont le stock de polluant disponible dans les sols, plantes, résidus de culture (émetteur) ; le transfert aux eaux de surface et souterraine (récepteur), par ruissellement de surface ou drainage, en solution ou sur les MES (vecteur).

Cette approche a permis de faire ressortir que les molécules à risque d'exposition maximum sont les suivantes pour les eaux de surface : Aminotriazole, Diuron, Simazine, Terbuthylazine et Glyphosate. Ce sont tous des herbicides (les plus utilisés sur le bassin versant). En effet, ces molécules sont directement appliquées sur le sol et facilement entraînées par les eaux de ruissellement (Lennartz *et al.*, 1997). Aminotriazole, Diuron et Simazine présentent aussi un risque pour les eaux souterraines. Ce risque reste cependant limité sur Roujan car le réseau d'eau souterraine est peu étendu et inexploité. Deux fongicides (Cymoxanil et Métaloxyl) présentent aussi un risque élevé, à la fois pour les eaux souterraines et de surface.

	Eau souterraine	Eau de surface
Variables d'exposition		
Coefficient de partage Corg/eau (L/g)	++++	+
Demi-vie dans le sol (jours)	+++	++
Hydrosolubilité (mg/L)	+	+++
Superficie traitée (ha)	++	++++
Dose de traitement (kg/ha)	+++	++++
Vitesse d'hydrolyse à pH = 7 (jours)	+++	++
Variables d'effet		
Dose Journalière Acceptable homme (mg/kg)	++++	+
CE_{50} pour algue, daphnie ou poisson (mg/L)	+	++++

++++ : variable les plus importantes, à+ : variables les moins importantes

Tableau 7 : Poids des variables d'exposition et d'effet dans l'évaluation des risques pour les eaux de surface et les eaux souterraines du bassin versant de Roujan avec la méthode SIRIS (Jouany, 1995 ; Louchart *et al.*, 1997).

	Tm (kg/ha)	Total (kg)
ACARICIDES		**0.195**
Propargite	0.003	0.18
Fenpropathrine	0.0003	0.015
HERBICIDES		**177.0**
Diuron	1.34	62.3
Glyphosate	1.16	54.0
Simazine	0.93	43.5
Terbuthylazine	0.11	5.1
Aminotriazole	0.105	4.9
Thiocyanate d'ammonium	0.09	4.4
Norflurazon	0.05	2.3
Paraquat	0.005	0.22
Diquat	0.002	0.11
INSECTICIDES		**33.0**
Thiodicarbe	0.27	16.0
Chlorpyrifos-méthyl	0.075	4.4
Arsenic	0.06	3.7
Méthomyl	0.045	2.7
Parathion méthyl	0.045	2.7
Chlorpyrifos-éthyl	0.03	1.8
Quinalphos	0.02	1.3
Deltaméthrine	0.006	0.4
Tétradifon	0.003	0.17
Diméthoate	0.002	0.1

	Tm (kg/ha)	Total (kg)
FONGICIDES		**4 930.0**
Soufre	75.1	4 475.0
Cuivre	3.53	210.2
Folpel	2.1	124.4
Manèbe	1.0	57.2
Mancozèbe	0.26	15.7
Dinocap	0.16	9.6
Zinèbe	0.14	8.6
Métirame-zinc	0.12	7.1
Métalaxyl	0.1	5.9
Ofurace	0.095	5.6
Cymoxanil	0.08	4.6
Fosétyl-Al	0.03	1.7
Pyrifénox	0.025	1.5
Chlorothalonil	0.01	0.7
Mylclobutanil	0.01	0.6
Difénoconazole	0.004	0.3
Penconazole	0.006	0.3
Triadiménol	0.006	0.3
Fénarimol	0.002	0.1

Tm : taux moyen appliqué, évalué par enquête
Total : estimé par extrapolation sur l'ensemble du bassin versant

Tableau 8 : Quantités de pesticides appliquées en 1995 sur le bassin versant d'après enquête (Louchart *et al.*, 1997).

L'étude a été affinée afin de prendre en compte la spécificité du climat, des sols et de la topographie. Il est alors nécessaire d'étudier les risques à l'échelle de la parcelle. A cette échelle, les risques sont évalués à partir des variables sur la matière active (Demi-vie, Coefficient de partage C_{org}/eau, Hydrosolubilité et Vitesse d'hydrolyse), les pratiques culturales (quantités appliquées, travail du sol propre à chaque parcelle) et la parcelle (topographie). La méthode peut ensuite être affinée en apportant une dimension temporelle : données climatiques et dates d'application des substances.

Pour commencer, l'étude a été effectuée sur les risques de transfert aux eaux de surface (c'est l'origine majeure de la pollution diffuse en milieu méditerranéen). Un rang moyen d'exposition est calculé pour chaque parcelle (moyenne pondérée des rangs d'exposition des molécules), tenant compte des quantités réellement appliquées sur la parcelle, de celles recommandées et du nombre de molécule. L'aptitude au ruissellement est évalué en tenant compte de l'état de surface du sol (humidité, texture, labour ou non) et de la pente et de la longueur de la pente. La combinaison des deux critères (rang moyen d'exposition et aptitude au ruissellement) par multiplication a permis une comparaison des risques potentiels de chaque parcelle et a permis d'établir une cartographie.

Les spécificités climatiques, pédologiques et topographiques ne peuvent être prises en compte que par une évaluation du risque de transfert des polluants à l'échelle de la parcelle. Une modélisation plus précise des transferts nécessitera certainement l'intervention des Systèmes d'Information Géographique.
Cependant, une évaluation à l'échelle du bassin versant a permis de mettre en évidence la forte potentialité de transfert des herbicides par ruissellement de surface.
L'évaluation du risque lié au cuivre ne pourra donc exclure une comparaison avec les autres polluants (en particulier les herbicides), surtout lors des essais de toxicité, qui intègrent l'ensemble des effets des différentes molécules présentes.

2.1.2 Prélèvements

L'ensemble des eaux de ruissellement viticoles a été prélevé sur un bassin versant de Roujan. Ce bassin versant a été instrumenté par le laboratoire Sol et Environnement de l'INRA de Montpellier pour suivre les flux d'eau, de MES (depuis 1992) et de pesticides (depuis 1994). Il est reconnu au plan national (Programme Allegro-Roujan) comme l'un des sites de référence dans le Service d'Observation en Réseau Utilisé pour la Recherche en Hydrologie (SOURHY). Ce bassin est aussi instrumenté à l'exutoire pour collecter en continu les eaux de ruissellement et MES (canal jaugeur de type Venturi équipé de préleveurs automatiques). Au sein du bassin, deux parcelles sur sol brun calcaire différant par leur pratique de désherbage (désherbage total ou travail superficiel du sol) sont instrumentées à l'identique (ex. : parcelle

AW6 « non travaillée » en figure 10) pour permettre une collecte en continu des eaux de ruissellement et des MES à l'échelle de la parcelle et analyser l'influence des pratiques culturales sur la contamination des eaux de surface (Lennartz *et al.*, 1997 ; Andrieux *et al.*, 1998).

À gauche : le canal collecteur imperméabilisé, le pluviomètre
Dans l'abri : préleveurs automatiques et système de liaison radio
À droite : canal venturi avec nilomètre et partiteurs

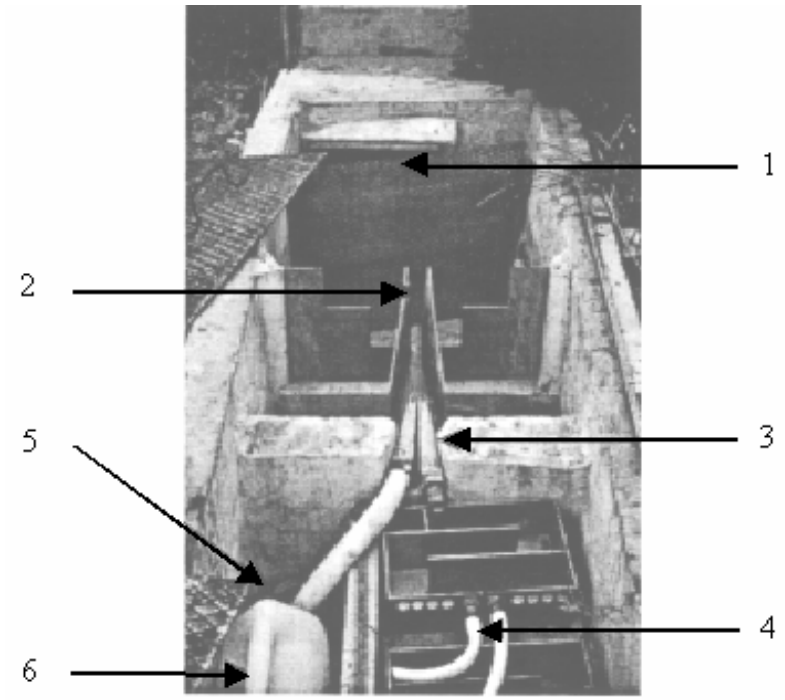
Figure 10 : Système de prélèvement à l'exutoire de la parcelle instrumentée sur sol carbonaté (AW6). Photo INRA-Sciences du Sol, Montpellier.

Les prélèvements concernent principalement la parcelle AW6 « non travaillée ». Notre choix s'est porté sur cette parcelle plutôt que sur l'autre parcelle déjà instrumentée sur le bassin versant, qui comporte *a priori* moins de risque de transfert des polluants par ruissellement de surface (Andrieux *et al.*, 1998). Cette parcelle de 1 200 m^2 présente en effet des caractéristiques particulières propices au ruissellement : croûte de surface présente toute l'année du fait de l'absence de labour par le viticulteur, désherbage chimique intégral et pente marquée (6 à 19 %).

Le ruissellement est canalisé à l'exutoire de la parcelle dans un canal jaugeur de type Venturi, avec une mesure de débit (nilomètre SEROSI avec une précision de 5 mm et une fréquence de mesure de 1 min). Un système de transmission de données en téléphonie GSM vers le laboratoire permet de connaître en temps réel l'évolution de la crue. La pluviométrie est mesurée par un pluviomètre à augets basculeurs (0.5 mm) avec enregistrement automatique des données. Deux types de prélèvements ont été effectués :

- échantillons moyens : un système de partition et de stockage du ruissellement est disposé en aval du canal Venturi. Il permet de récupérer 2/100ème du volume ruisselé (jerrican plastique de 10 L), ou si la crue est plus importante, 2/1 000ème du volume ruisselé (jerrican plastique de 20 L).

- prélèvements détaillés au cours des crues : deux préleveurs d'échantillons automatiques disposés dans l'abri (SIGMA 800 ; 24 échantillons dans des tubes en verre de 330 mL) sont programmés pour commencer le prélèvement dès le début du ruissellement, l'un asservi au temps (1 prélèvement toutes les 30 min) et l'autre asservi au débit, ce qui permet d'échantillonner à la fois les crues courtes et intenses et les crues plus longues. Le prélèvement s'effectue par pompage direct dans le flux de ruissellement dans le canal Venturi.



1 : *arrivée de l'eau ;* 2 : *1ère partition à (1/5ème) ;*
3 : *2ème partition (1/10ème) ;* 4 : *3ème partition (1/10ème) ;*
5- *stockage de 2/100e ;* 6- *stockage de 2/1000ème.*

Figure 11 : Système de partition et de stockage du ruissellement pour le prélèvement des échantillons moyens (Photo : Coulouma, 1998).

D'autre part, des prélèvements ponctuels d'eau de ruissellement à la surface d'une parcelle sur sol acide non instrumentée ont été effectués grâce à un dispositif mobile de prélèvement (mis au point par P. Andrieux) sur la parcelle B121/122 (Figure 12). Ce système est composé d'un collecteur en PVC couvrant la surface d'un inter-rang de vigne, suivi d'un tuyau PVC menant l'eau à deux réservoirs successifs de 20 L. Les prélèvements effectués grâce à ce système ne permettent pas de prélever le ruissellement sur l'ensemble de la parcelle, mais seulement sur un inter-rang. Ils auront une valeur comparative par rapport aux prélèvements effectués sur la parcelle à sol carbonaté.

Figure 12 : Système de prélèvement ponctuel des eaux de ruissellement à la surface de l'inter-rang d'une parcelle viticole (parcelle sur sol acide). Photo A. Devez et R. Gilbin.

Les échantillons sont prélevés dans des flacons en polyéthylène et conservés à + 4 °C jusqu'à leur traitement au laboratoire, dans les 24 h. Pour les analyses différées (biotests sur les eaux, analyses des MES), les échantillons sont conservés et transportés après avoir été filtrés, dans des conditions compatibles avec les analyses effectuées (voir plus bas).

2.1.3 Détermination des caractéristiques des crues

Les données de pluviométrie et de ruissellement ont servi de base au calcul des paramètres permettant de caractériser les événements pluvieux sur la parcelle carbonatée. Concernant la pluie, le volume de pluie de l'événement est exprimé par P (mm), rapporté à la surface de la parcelle. L'intensité de la pluie, étant donné la nature fractale de la pluie, est nécessairement déterminée à un pas de temps défini (1 ou 5 min, par exemple). On définit ainsi l'intensité maximale (Imax), en mm/h, au pas de temps d'une minute ($Imax_{1min}$) ou de 5 min ($Imax_{5min}$). De même, concernant le ruissellement, le volume de ruissellement est exprimé par R (mm), avec le débit maximal Qmax exprimé en L/s ou mm/h. Enfin, pour chaque événement pluvieux, la durée (min) et le coefficient de ruissellement CR (%) sont indiqués.

Pour la construction des hydrogrammes de crues (graphique de variation des débits de ruissellement en fonction du temps) et hyétogrammes (diagrammes représentant l'intensité de précipitation en fonction du temps), l'intensité de la pluie (mm/h) et le débit de ruissellement (mm/h) au pas de temps de 1 min ont été utilisés. Pour l'hyétogramme de la période entière d'étude (janvier 1999 à juin 2000), la pluie au pas de temps de 1 jour (mm/j) a été représentée.

2.2 Pratiques de laboratoire

L'ensemble des analyses effectuées au laboratoire a été effectué selon les recommandations des bonnes pratiques de laboratoire. En particulier, la préparation des échantillons et les analyses des métaux traces ont été effectuées en salle blanche.

Pour les analyses de métaux traces et les biotests, l'ensemble des dilutions et des préparations de solutions ont été effectuées dan une eau ultrapure (système MilliQ, Millipore). Une eau distillée a été utilisée pour les autres usages (rinçages…).

Tout le matériel utilisé est préalablement lavé par un détergent (Extran) et rincé abondamment à l'eau distillée, puis mis dans un bac d'acide (acide nitrique 10 % v/v *p.a.*, 24 h minimum) et rincé à l'eau déminéralisée. De plus, pour l'analyse des métaux traces, le matériel est passé aux ultrasons dans 3 bacs successifs d'acide nitrique (10 % v/v) puis 2 bacs successifs d'eau ultrapure, chacun pendant 60 minutes. Le matériel est séché sous un flux laminaire classe 100. Ce protocole a permis d'éviter la contamination éventuelle des échantillons.

2.3 Caractérisation physico-chimique

Afin d'interpréter les résultats qui seront obtenus lors des études de spéciation physico-chimique, de toxicité et de biodisponibilité du cuivre, une première étape de caractérisation des eaux de ruissellement est nécessaire. Les analyses figurant ci-dessous sont effectuées immédiatement après prélèvement (sauf indication contraire).

2.3.1 Matières en Suspension (MES)

Deux types de filtres ont été utilisés pour la séparation des MES.

Des filtres en fibre de verre (réseau de fibres avec une taille de pores approximative) ont été utilisés pour le traitement de grands volumes d'échantillons (> 100 mL) afin de récupérer de grandes quantités de MES nécessaires aux analyses. La récupération des matières en suspension est effectuée par filtration sur filtre en fibre de verre < 1.2 µm (Whatman GF/F) et les MES conservés à –18 °C pour les tests biologiques et les analyses granulométriques. Les analyses de pH, conductivité, alcalinité, COD et ions majeurs sont effectuées sur le perméat issu de la filtration.

Ce type de filtre, s'il a l'avantage de peu se colmater, ne permet pas de travailler en conditions suffisamment propres pour le dosage des métaux traces. Des filtres en polycarbonate ont été utilisés à cet effet. Pour les analyses des métaux traces et la séparation des colloïdes, les matières en suspension ont été séparées de l'eau par filtration sur membrane < 1 µm (Nuclepore, préalablement lavé à l'acide – HCl 10 % – et rincé à l'eau déminéralisée). Le filtre contenant les MES est séché en salle blanche sous flux laminaire classe 100 (environ

1 semaine) pour la détermination des métaux traces. Le perméat est traité pour l'analyse des métaux traces et la séparation des colloïdes.

La granulométrie des MES a été estimée par granulométrie laser (Coulter® LS).

2.3.2 Colloïdes

La séparation des colloïdes a été effectuée par ultracentrifugation (Centrikon T-1080) des échantillons filtrés (Nuclepore 1 µm), selon un protocole validé sur des échantillons contaminés en métaux (Guéguen and Dominik, 2001). La loi de Stockes a été utilisée pour calculer la durée de l'ultracentrifugation, avec une densité des colloïdes de 1.1 $g.cm^{-2}$ et une vitesse de rotation de 26 000 tr/min à 5°C. Après 14 h d'ultracentrifugation d'un aliquote de 30mL, le surnageant est récupéré en prenant soin de ne pas remettre en suspension le culot de colloïdes, et un nouvel aliquote de 30mL est ajouté dans le tube. L'opération est renouvelée 8 fois. Enfin, le culot contenant les colloïdes (>20 nm) contenu dans environ 240 mL d'échantillon (8×30 mL) est lyophilisé puis pesé pour une détermination du poids des colloïdes.

2.3.3 Paramètres généraux : pH, conductivité, alcalinité

Le pH a été mesuré par un pH-mètre WTW (multical pH 526, électrode SenTix 97T) et conductivité par un conductimètre WTW (LF325, cellule Tetracon 325), selon la norme AFNOR (AFNOR, 1977a). L'alcalinité a été déterminée par titration acide (AFNOR, 1977b).

Sur le terrain, les mêmes pH-mètre et conductimètre ont été utilisés. L'alcalinité et la dureté ont été évaluées par des kits de terrain (Merck), avant confirmation des analyses en laboratoire. Concernant les biotests, le pH, la conductivité et l'alcalinité des milieux utilisés et des échantillons étudiés ont été mesurés par les mêmes méthodes.

2.3.4 Carbone Organique Dissous (COD)

Le carbone organique dissous a été analysé par un analyseur de carbone total (Shimadzu TOC Analyser 5500). Le principe de la mesure est une détection du dioxyde de carbone (par un détecteur infrarouge) formé après oxydation catalytique à haute température (680-950°C) de la matière organique. Nous avons effectué les analyses en mode NPOC (non-purgeable organic carbon) suivant la norme AFNOR (AFNOR, 1985), c'est-à-dire que le carbone organique est mesuré dans un échantillon acidifié ($pH < 2$ avec HCl) dont le carbone inorganique a été purgé par un flux gazeux (O_2/N_2). Les échantillons sont conservés jusqu'à analyse à 4 °C et à l'obscurité, stabilisé par ajout de 1 % de $HgCl_2$ (1 mol/L), en flacon en verre borosilicaté 50mL préalablement calciné (8 h, 550 °C) avec joint Téflon.

2.3.5 Cations

Les ions Ca^{++}, Mg^{++}, Na^{+}, K^{+} ont été analysés par électrophorèse capillaire (Waters Quanta 4000 Capillary Ion Analyser), à détection UV inverse (214 nm), selon la méthode standard du constructeur (Waters, 1996) : L'échantillon est prélevé (30 s, hydrostatique) puis la séparation des ions par électrophorèse est effectuée dans un capillaire AccuSep (75 µm x 60 cm) rempli d'une solution tampon, avec un voltage de 20 kV, à 25 C. Les échantillons sont conservés jusqu'à analyse à 4 °C et à l'obscurité, en milieu acide (1 % d'acide nitrique concentré *p.a.*) en tube en polypropylène de 10 mL.

2.3.6 Anions

Les ions Cl^{-}, SO_4^{--} et NO_3^{-} ont été analysés par électrophorèse capillaire (Waters Quanta 4000 Capillary Ion Analyser), à détection UV inverse (214 nm), selon la méthode standard du constructeur (Waters, 1996) : L'échantillon est prélevé (30 s, hydrostatique) puis la séparation des ions par électrophorèse est effectuée dans un capillaire AccuSep (75 µm x 60 cm) rempli d'une solution tampon, avec un voltage de -15 kV, à 25 C. Les échantillons sont conservés jusqu'à analyse à -18 °C en tube en polypropylène de 10 mL.

2.3.7 Métaux traces

2.3.7.a Métal total dissous

Les métaux sont analysés par ICP-MS (HP 4500, Agilent). La fraction dissoute est conservée jusqu'à analyse en tube en polypropylène de 10mL à 4°C et à l'obscurité, en milieu acide (1 % d'acide nitrique concentré ultrapur, pH < 2).

Pour la détermination de l'arsenic, l'utilisation de la procédure standard précédente est limitée par l'interaction avec les ions chlorure. Afin de valider les résultats obtenus par ICP-MS, nous avons effectué des mesures spécifiques par HG-ICP-MS (ICP-MS avec génération d'hydrures) sur 7 échantillons prélevés. Cette méthode consiste en une pré-réduction de l'arsenic par l'iodure de potassium en présence d'acide ascorbique, l'arsenic III étant la seule espèce formant des hydrures. Les mesures ont été effectuées sur un ICP-MS (VG-Plasmaquad) couplé à une génération d'hydrures selon la méthode d'Andrea (1977), modifiée par Branch *et al.* (1991).

2.3.7.b Métal total particulaire (MES)

Les MES séchées subissent préalablement une minéralisation totale en bombe Téflon. L'attaque des MES (200mg) est effectuée par micro-ondes (ETHOS, Milestone) avec un mélange eau + HNO_3 + HCl + HF (3+5+2+2), selon le programme résumé dans le tableau 9.

Durée (min)	Puissance (W)	Pression (bar)	Température (°C)
5	400	20	110
20	250	20	110
8	600	20	110
15	250	20	110
20		ventilation	

Tableau 9 : Protocole d'attaque des MES au four micro-ondes.

Le minéralisat est évaporé à sec sur plaque chauffante en salle blanche, puis repris par 5mL d'HNO_3 ultrapur. Pour chaque série d'analyses, un blanc des réactifs et un standard international sont ajoutés, et la méthode a été montrée comme étant juste et reproductible pour le manganèse, le cuivre, le zinc, l'argent, le cadmium et le plomb (Guéguen, 2001).

Pour l'étude de la dynamique des concentrations en métaux dans les MES au cours des crues (préleveurs automatiques), le grand nombre d'échantillons à traiter a amené à choisir une autre méthode, la méthode « Osol » extraite de l'ordonnance fédérale des sols en Suisse. Les MES séchées (1g) sont mises en solution dans 10mL d'acide nitrique 2 mol/L, mis à reflux à 100°C pendant 16h en bombe téflon hermétiques. Le culot est centrifugé 15 min à 4 000 tr/min et le surnageant analysé directement.

2.3.7.c Spéciation chimique des formes dissoutes

♦ *Calcul de la spéciation chimique*

Pour les expériences en milieu synthétique, les concentrations en ligands et métaux ont été choisis après calcul de la spéciation chimique à l'équilibre dans les solutions avec MINEQL+ 3.01a (Schecher and McAvoy, 1994). Les précipitations et solides n'ont pas été considérés, après vérification que les concentrations choisies étaient inférieures aux limites de solubilité. Les calculs ont été effectués dans les différents milieux utilisés pour les bioessais, équilibrés avec l'atmosphère à une pression partielle de CO_2 de 3.12×10^{-9} Pa. Les constantes de complexation utilisées pour le calcul sont contenues dans la base de donnée du programme MINEQL+ 3.01a (Schecher and McAvoy, 1994). Dans le cadre de l'étude des complexes formés avec l'oxine et le DDC, le logarithme des constantes de complexation, $Log\,\beta_n$, pour les différents complexes de type MeL_n sont résumés dans le tableau 10, mis à part pour la complexes du cadmium et du DDC pour lesquels aucune constante de complexation n'a pu être trouvée.

Constantes de complexation	oxine$^-$			DDC$^-$		
	Log β 1	***Log β 2***	*Ref.*	***Log β 1***	***Log β 2***	*Ref.*
Cu^{++}	13.50	26.20	*(1)*	14.90	28.80	*(2)*
Zn^{++}	8.52	15.80	*(2)*	nd	11.60	*(2)*
Cd^{++}	9.40	17.10	*(3)*		nd	
Pb^{++}	9.02	17.11	*(2)*	3.85	18.30	*(2)*
Constantes conditionnelles de complexation :						
milieu AAP$_m$ *(bioessai algal)*	***Log β '1***	***Log β '2***		***Log β '1***	***Log β '2***	
Cu^{++}	9.99	20.56		13.53	27.43	
Zn^{++}	6.33	11.48		c	11.54	
Cd^{++}	7.22	12.79		nd	nd	
Pb^{++}	6.14	12.09		3.10	17.55	
NaCl 2% *(bioessai bactérien)*	***Log β '1***	***Log β '2***		***Log β '1***	***Log β '2***	
Cu^{++}	8.89	17.29		14.58	28.48	
Zn^{++}	3.85	6.83		nd	11.21	
Cd^{++}	3.16	6.56		nd	nd	
Pb^{++}	3.34	7.14		2.47	16.91	
Constantes d'acidité	*pKa1*	*pKa2*		*pKa1*	*pKa2*	
H+	5.16	9.63	*(1)*	3.38	nd	*(2)*

Valeurs d'après (1)(Garay et al., 1999) ; (2)(Martell, 1964) ; (3) (Garay and Solis, 1999)
nd : constante non définie

Tableau 10 : Logarithme des constantes de complexation utilisées pour le calcul de la spéciation chimique avec oxine et diethyldithiocarbamate.

Les constantes de complexation sont données selon l'équation 1 suivante :

Équation 1 : Calcul de la constante de stabilité d'un complexe MeLn.

$$\beta_n = \frac{(MeL_n)}{(Me)\times(L)^n}$$

Le logarithme des constantes conditionnelles de complexation, $Log\,\beta'_n$, a aussi été calculé pour les conditions spécifiques du milieu du bioessai algal ($Log\,\beta'_n\ alg$) et le milieu du bioessai bactérien ($Log\,\beta'_n\ bact$). Les constantes conditionnelles de complexation sont calculées selon l'équation 1 où les activités des espèces libres (Me) et (L) sont remplacées par la somme des concentrations de toutes les espèces présentes du métal et du ligand, mis à part

MeL_n. Ainsi $Log\,\beta'_n$ prend en compte l'influence des autres ligands en solutions et la compétition pour la formation du complexe MeL_n.

Les constantes d'acidité, pKa_n, utilisées pour le calcul de spéciation ont été déterminées suivant l'équation 2.

<u>Équation 2</u> : Calcul de la constante d'acidité de l'espèce H_nL.

$$pKa_n = -Log\left(\frac{[H^+]\times[H_{n-1}L\,]}{[H_nL]}\right)$$

Pour l'interprétation de la toxicité en fonction du calcul de la spéciation chimique, seule la concentration en ion libre a été prise en compte, ainsi que les concentrations en complexes avec l'oxine et le DDC dans le cas de l'étude de la toxicité des complexes lipophiles. Les autres complexes sont considérés comme n'étant pas biodisponibles. En effet, même si certains complexes inorganiques, comme les complexes avec les hydroxydes, peuvent être toxiques, nous avons considéré que :

- la toxicité est majoritairement liée à la présence d'ion libre en solution ;
- pour les études en milieux synthétiques, les concentrations en complexes inorganiques sont toujours présents dans les mêmes proportions par rapport à l'ion libre quelle que soit la concentration totale en métal, car les conditions de pH, de force ionique et d'alcalinité sont constantes (Allen and Hansen, 1996).

Pour les échantillons prélevés, le calcul de la spéciation chimique a été effectué sur la base des concentrations en ligands inorganiques et métaux totaux dissous uniquement. La cohérence des résultats avec la toxicité observée sera discutée par rapport à l'influence des ligands colloïdaux et de la matière organique, qui n'auront pas été pris en compte dans le calcul.

♦ *<u>Mesure de l'ion libre/labile</u>*

Notre choix s'est porté sur la DPASV, méthode de sensibilité suffisante pour l'analyse des métaux labiles dans les eaux naturelles. Des études préliminaires en laboratoire ont par ailleurs confirmé que les mesures par résine complexantes de type Chelex-100, ou d'autres résines capables de retenir certaines fractions de métal de caractéristiques données, n'étaient pas satisfaisantes car l'adsorption non spécifique des complexes organiques (ex. : substances humiques) interférait avec la complexation.

L'appareil Metrohm utilisé pour toutes les manipulations réalisées est constitué d'un processeur (Processor 646V) et d'un poste électrodes-cellule (Stand 647V) avec une électrode de référence Ag/AgCl, une contre-électrode en platine et une électrode indicatrice multi-mode à goutte pendante (diamètre intermédiaire de 0.4 mm^2). Les mesures ont été effectuées avec une amplitude d'impulsion de 50 mV et un potentiel de pré-electrolyse de –0.8 V. Les analyses ont été effectuées dans une cellule de mesure en verre siliconée avec un électrolyte (KNO_3 0.1 mol/L) relativement neutre vis-à-vis de la spéciation chimique du cuivre, sans tampon (Florence, 1982a), après dégazage sous flux d'azote (> 10 min) et une durée d'équilibrage de 30 s (Cheng and Chakrabarti, 1994). La mise au point de la méthode a fait l'objet d'un travail de DEA (Devez, 2000) et la validation de l'analyse du cuivre labile par DPASV a été effectuée sur l'eau de ruissellement de la crue du 16 avril 2000.

- *Spéciation des formes de l'arsenic*

Afin d'interpréter les résultats de toxicité observés dans les échantillons, il est important de connaître l'état d'oxydation sous lequel est présent l'arsenic dissous (III ou V). Nous avons pour cela utilisé la même méthode que pour le dosage de l'arsenic total (HG-ICP-MS) : l'arsenic total est analysé après réduction, alors que l'arsenic III est analysé sans l'étape de réduction (pH = 5.5), ce qui permet de doser uniquement l'arsenic III initialement présent dans l'échantillon. Les concentrations en arsenic V sont évaluées par différence ([As]tot - [As III]).

2.3.7.d Spéciation des formes particulaires

Notre choix s'est porté sur la méthode la plus utilisée (Tessier *et al.*, 1979) afin que les résultats obtenus soient comparables aux études existantes (Tableau 11). La concentration en cuivre dans les extraits a été analysée par absorption atomique en four graphite (Varian), l'ICP-MS utilisé ne permettant pas d'analyser de telles matrices.

Outre cette méthodologie, l'évaluation de la mobilité potentielle et de la toxicité de la fraction particulaire du cuivre s'est appuyée sur une extraction aqueuse : 200 mL de MES sont dilués à 100 g/L dans un flacon en polyéthylène de 250 mL, agités 1 h à 10 tr/min. La fraction mobilisée est séparée par filtration (Nuclepore 1 µm). Pour l'extraction, l'eau utilisée pour les biotests a été utilisée (milieu AAP pour le tes algal ; NaCl 2 % pour le test bactérien).

2.3.8 Extractions aqueuses et organiques des MES

Des extractions aqueuses et organiques ont été effectuées sur les MES prélevées à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté, afin de caractériser le potentiel toxique de la phase particulaire

(Jauzein *et al.*, 1999). Les MES humides (10 g/L en poids sec) sont agitées en continu (10 tr/min) dans 100mL de milieu pour les biotests (milieu AAP_{m+Fe} ou NaCl 2%) ou de DMSO (p.a. Merck) pendant 1 heure. L'extrait est centrifugé (15 min, 4 000 tr/min) puis le surnageant filtré (GF/F Whatman) et analysé (caractérisations physico-chimiques et biotests) de la même manière que les eaux de ruissellement. Les biotests ont été effectués sur les extraits dilués dans les milieux de culture, jusqu'à une concentration maximale en DMSO de 0.5%[3].

Fraction	Extractant		Nature de la fraction	Signification environnementale
Échangeable	8mL chlorure de magnésium 1 mol/L ajusté à pH = 7	1 h	adsorbé sur les argiles, hydroxydes de fer et manganèse hydratés, acides humiques	désorption possible par changement de force ionique (zone estuarienne)
acido-soluble	8mL d'acétate de sodium 1 mol/L ajusté à pH = 5 avec acide acétique	8 h	lié aux carbonates	sensible aux changements de pH
réductible	20mL d'une solution de dithionite de sodium 0.3 mol/L + citrate de sodium 0.175 mol/L + acide citrique 0.025 mol/L	1 h	lié aux oxydes de fer et manganèse sous forme de nodules, concrétions, ciments entre particules ou en couche autour des particules	instables en conditions anoxiques
oxydable	3mL d'acide nitrique 0.02 mol/L + 5mL peroxyde d'hydrogène 30 % ajusté à pH = 2	2 h, 85 °C	lié à la matière organique (organismes vivants, détritus, pellicules sur les particules minérales...) et aux sulfures	possibilité de relarguage lors de l'oxydation de la matière organique
	+ 3mL peroxyde d'hydrogène 30 % ajusté à pH = 2	3 h, 85 °C		
	refroidir	30 min		
	+ 5mL d'acétate d'ammonium dans l'acide nitrique 20 %			
résiduelle	acide fluorhydrique + acide perchlorique + acide nitrique	1 h	retenu dans la structure cristalline des minéraux	pas de relarguage possible à court ou moyen terme

Tableau 11 : Protocole d'extraction séquentielle des métaux traces dans les MES (Tessier *et al.*, 1979).

[3] l'absence de toxicité du DMSO utilisé pour les biotests a été vérifiée jusqu'à des concentrations supérieures à 1% dans le milieu. L'effet du DMSO a par ailleurs été montré comme n'ayant pas d'effet significatif sur la toxicité des métaux en eux-mêmes (Cooper, 2001). C'est pourquoi il a été utilisé pour les extractions.

2.4 Biotests

Les concentrations testées font partie d'une série géométrique d'un facteur ½ entre chaque concentration. Les échantillons analysés sont filtrés (< 1 µm) et conservés dans des flacons en polyéthylène à –18 °C jusqu'à exécution des tests.

Pour les bioessais en conditions contrôlées, les sels suivants ont été utilisés pour préparer des solutions stock à 1 g/L de métal dans l'eau ultrapure : $CuSO_4$, $ZnSO_4$, $PbCl_2$ et $CdCl_2$ (sels Merck p.a.).

2.4.1 Bactérie

Les organismes *Vibrio fisheri* utilisés pour le test sont fournis sous forme lyophilisée (fournies par Azur Environmental Corp., USA) et reconstitués dans de l'eau ultrapure.

Les essais ont été exécutés selon le protocole du test Basic Microtox® (Microbics-Corporation, 1992) en milieu NaCl 20 g/L (I = 0.3 mol/L ; $[Cl^-]$ = 34 mmol/L ; pH = 5.5), à 16 °C ± 1 et à l'obscurité. L'inhibition de la luminescence des bactéries en 15 min a été mesurée avec le luminomètre Azur 500. Les bactéries sont placées dans l'échantillon à tester (environ 10^6 cell/mL), dont la salinité est préalablement ajustée (ajout d'une solution de NaCl 220 g/L), et la luminescence des bactéries dans l'échantillon comparée à la luminescence dans une solution standard de NaCl 20 g/L. Les dilutions au ½ sont effectuées dans le même milieu (NaCl 20 g/L).

Pour l'étude de la toxicité des complexes lipophiles des métaux (Paragraphe 3.3, page 79) le test d'inhibition de la bioluminescence a été effectué en microplaques opaques en PE blanc de 96 puits selon la procédure de microluminométrie en microplaque (Blaise *et al.*, 1994). Les conditions du test Basic Microtox® ont été respectées. La bioluminescence a été mesurée chaque minute pendant 45 min avec un luminomètre pour microplaques (LumiCount® - Packard Inst.).

Le pourcentage d'inhibition de la bioluminescence pour une concentration en toxique donnée C (I_c) et à un temps *t* donné a été calculé suivant l'équation 3 :

<u>Équation 3</u> : Calcul du pourcentage d'inhibition de la bioluminescence (I_c) de la bactérie marine *Vibrio fischeri.*

$$I_c = \left[\frac{(R_t \times B_0) - B}{R_t \times B_0} \right] \times 100$$

Rt : ratio de bioluminescence B_t/B_0 dans le contrôle
B_0 : bioluminescence à t=0
B : bioluminescence au temps t

2.4.2 Algue

L'algue utilisée est l'algue verte unicellulaire *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (anciennement *Selenastrum capricornutum* Printz). Les algues sont préalablement lavées par trois fois dans le milieu standard concentrées par centrifugation (6 min à 1 000 g_n) et l'inoculum préparé de façon à obtenir la concentration cellulaire initiale voulue. Les essais biologiques ont été exécutés en microplaque 96 puits en conditions statiques.

2.4.2.a Maintien de la culture

La culture d'algue est effectuée conformément aux recommandations de l'USEPA (1989), dans les mêmes conditions que le déroulement du test décrit plus bas. Un repiquage est effectué tous les 4 à 5 jours (1 mL dans 100 mL de milieu de culture) afin de maintenir la culture en phase exponentielle de croissance.

La première mise en route d'une culture est effectuée à partir d'un stock stérile sur gélose (15 g/L d'agar-agar dans un milieu AAP liquide concentré 1.5×, autoclavé 50 min à 120 °C). Le protocole pour le maintien de la culture est présenté en figure 13.

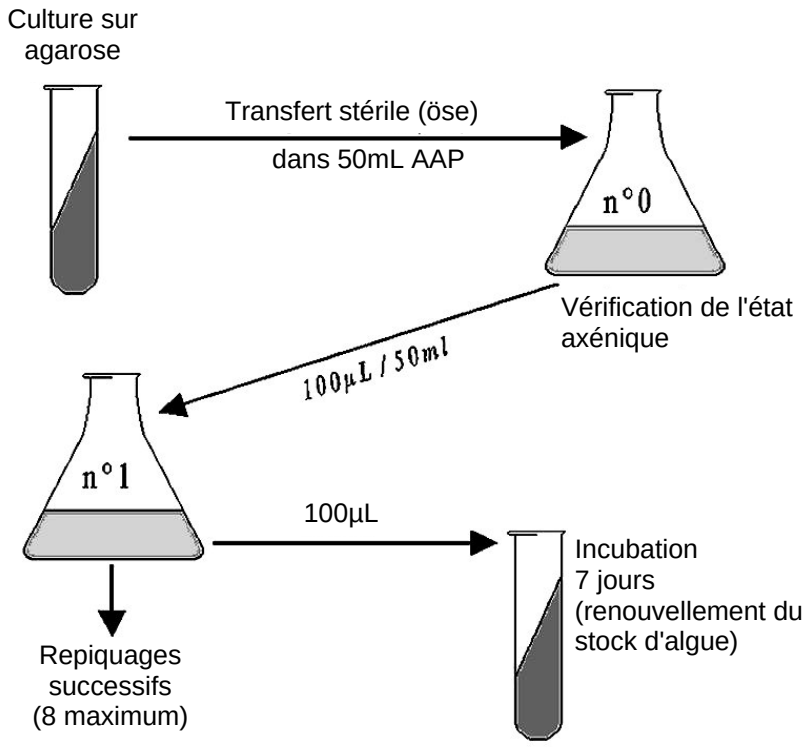


Figure 13 : Schéma de culture des algues en milieu solide et liquide. Adapté de Pardos (1996) selon la procédure USEPA (1989).

2.4.2.b Milieux de culture

Les tests ont été effectués sur la base des protocoles proposés par l'USEPA (1989, 1994) et Environment Canada (1992). Nous avons utilisé le milieu recommandé, à savoir le milieu AAP. Sa composition est donnée dans le tableau 12. Le pH de cette solution synthétique est de 7.5 ± 0.1 et la dureté totale est de 15.2 mg/L de $CaCO_3$. La préparation du milieu s'effectue à partir de 5 solutions de base stériles (autoclavées) concentrées 1000×.

Pour l'étude de la toxicité des métaux, la présence d'EDTA dans le milieu est déconseillée (USEPA, 1994 ; Guéguen *et al.*, 2001b). L'EDTA, qui est présent pour maintenir en solution et éviter la précipitation du fer nécessaire à la croissance des algues, risque de modifier la spéciation des métaux (complexation des ions libres et compétition avec les ligands étudiés) et de diminuer leur biodisponibilité. Cependant, en enlevant l'EDTA, il y a un grand risque de précipitation du fer, ce qui pourrait aussi affecter la spéciation des métaux. De plus, en voulant éviter une compétition entre les ligands (ex. : EDTA contre les ligands lipophiles étudiés au Paragraphe 3.3 ou les ligands présents dans les échantillons testés au Chapitre 4), la compétition entre métaux peut être accrue (cobalt, manganèse, fer, cuivre et zinc contre plomb, cadmium, cuivre et zinc ajoutés). Toutefois, les concentrations des métaux dans le milieu AAP sont de l'ordre du nmol/L, et cet effet peut être considéré comme minime face à des concentrations des métaux à des niveaux toxiques, de l'ordre du µmol/L.

Solution n°	Composé	Concentration		Élément	Concentration		
1	$NaNO_3$	25.5	mg/L	N	4.20	mg/L	
2	$MgCl_2.6H_2O$	10.0	mg/L	Mg	2.65	mg/L	
	$CaCl_2.2H_2O$	4.42	mg/L	Ca	1.20	mg/L	
	H_3BO_4	185.52	µg/L	B	32.44	µg/L	
	$MnCl_2.4H_2O$	415.62	µg/L	Mn	115.38	µg/L	
	$ZnCl_2$	3.28	µg/L	Zn	1.57	µg/L	
	$CoCl_2.6H_2O$	1.43	µg/L	Co	0.35	µg/L	
	$CuCl_2.2H_2O$	0.012	µg/L	Cu	0.004	µg/L	
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	7.26	µg/L	Mo	2.88	µg/L	
	$FeCl_3.6H_2O$	160	µg/L	Fe	33.1	µg/L	**
	$Na_2EDTA.2H_2O$	300	µg/L	-	-		*
3	$MgSO_4.7H_2O$	14.7	mg/L	S	1.91	mg/L	
4	K_2HPO_4	1.04	mg/L	P	0.186	mg/L	
				K	0.469	mg/L	
5	$NaHCO_3$	15.0	mg/L	Na	11.0	mg/L	
				C	2.14	mg/L	

Les concentrations dans les 5 solutions de base sont 1000× plus concentrées que celles indiquées dans le tableau.

* *composé omis pour la préparation du milieu AAP_m et AAP_{m+Fe}*

** *composé omis pour la préparation du milieu AAP_m*

Tableau 12 : Composition du milieu de culture algal : le milieu AAP (USEPA, 1989 ; USEPA, 1994).

Par conséquent, le milieu AAP utilisé lors des biotests a fait l'objet de modifications. Trois milieux ont été testés :

- Milieu AAP « normal », noté AAP (milieu utilisé pour le maintien de la culture)
- Milieu AAP « modifié », sans EDTA ni fer, noté AAP_m
- Milieu AAP « modifié+fer », sans EDTA mais avec fer, noté AAP_{m+Fe}

2.4.2.c Préparation de l'inoculum

Une solution d'algues en phase exponentielle de croissance est centrifugée en tube PP de 100mL (6 min à 2000 tr/min, ou $1000g_n$). Le culot algal est remis en suspension dans le milieu de test (milieu AAP, AAP_m ou AAP_{m+Fe} selon le test) et centrifugé de nouveau. L'opération est renouvelée 3 fois. Le culot algal est récupéré dans un volume minimal de milieu, et la concentration cellulaire mesurée au compteur de particules (Coulter-Counter Z1), dans une solution conductrice (10µL de solution à compter sont placés dans 10mL de NaCl 10 g/L filtré < 0,2 µm). L'inoculum est préparé en diluant les algues dans le milieu du test de façon adéquate pour obtenir une concentration cellulaire de 2.1×10^5 cell/mL (pour le test chronique) ou 2.1×10^6 cell/mL (pour le test aigu en 1 h).

2.4.2.d Incubation

Les tests sont effectués en microplaques transparentes 96 puits en PE, dans un incubateur avec éclairement continu (5 000 - 6 000 lx) à 24°C ± 1. Chaque puits correspond à un réplicat d'une concentration de toxique ou d'échantillon testé (200 µL/puits), dans lequel est ajouté 10µL d'inoculum algal. La concentration cellulaire est alors de 10^4 cell/mL pour le test chronique ou 10^5 cell/mL pour le test aigu. Pour le test chronique, les puits placés sur les bords de la plaque ne sont pas utilisés, mais simplement remplis de milieu de culture, afin d'éviter les effets de bords dus à l'évaporation.

2.4.2.e Mesure de l'effet

Les lectures des microplaque ont été effectués avec un lecteur SPECTRAmax® Gemini XS (Molecular Device) pour les lectures de fluorescence, SPECTRAmax® 340pc (Molecular Device) pour les lectures d'absorbance. Ces appareils fournissent des résultats en unités relatives qui n'ont pas de signification absolue, mais permettent de comparer la réponse obtenue entre les différents échantillons testés et de calculer un pourcentage d'inhibition. Plusieurs activités ont été suivies pour mesurer l'effet sur les algues. Les différentes méthodes ont été testées et comparées pour la toxicité du cuivre, avant leur utilisation pour l'étude de toxicité des eaux de ruissellement.

♦ *Effets chroniques : inhibition de la croissance algale*

La mesure de la densité cellulaire (par absorbance à différentes longueurs d'ondes) ou du contenu en chlorophylle *a* par fluorescence directe (Lecture à 488/685 nm) peuvent s'avérer de bons indicateurs pour évaluer la concentration cellulaire et donc l'inhibition de la croissance (Geis *et al.*, 2000).

♦ *Intégrité membranaire*

L'iodure de propidium est une molécule qui se lie aux acides nucléiques (ADN, ARN) de façon non spécifique à la séquence de base qui les constitue. Quand il est lié, l'iodure de propidium est excitable à une longueur d'onde de 536 nm et fluoresce à 617 nm. Du fait qu'il ne peut pas traverser les membranes biologiques, c'est un indicateur efficace de l'intégrité membranaire des cellules : en présence d'iodure de propidium, la fluorescence n'apparaît que si la membrane est altérée et laisse pénétrer la molécule jusqu'aux acides nucléiques. Cette technique a principalement été utilisée pour les cellules animales (Gagné *et al.*, 1999), mais peut aussi donner des résultats intéressants chez les végétaux.

Un stock d'iodure de propidium (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) de 1 mg/mL a été préparé dans l'eau ultrapure et conservé à l'obscurité à +4 °C. Au moment du test, une dilution de 2.6 mL de solution stock dans 5 mL avec de l'eau ultrapure est effectuée et 10 µL de cette solution est ajouté dans chaque puits, après incubation. Une post-incubation de 30 min dans l'obscurité est effectuée, avant lecture de la fluorescence à 563/617 nm. Ce test ne permet pas, contrairement aux autres, de déterminer une inhibition par rapport à un contrôle, puisque la fluorescence dans le contrôle est nulle (cellules avec leur membrane intacte). L'augmentation de fluorescence ne peut pas être exprimée en % d'inhibition, mais pourra par exemple être exprimée par rapport à la fluorescence obtenue avec un produit connu pour son effet destructeur de la membrane (ex. : méthanol), en prenant la valeur obtenue pour effet maximum.

♦ *Activité estérasique*

La fluoresceine diacétate (FDA) est une molécule lipophile non fluorescente, assimilée facilement par les cellules algales, et hydrolysée par des estérases non spécifiques dans les cellules viables pour former de la fluorescéine, une molécule fluorescente dans le vert (530-560 nm). L'inhibition de la fluorescence de la FDA est un indicateur de l'effet de molécules toxiques sur l'activité de l'enzyme estérase (influence sur la réaction d'hydrolyse de la FDA elle-même) ou de l'intégrité membranaire de la cellule (influence sur l'entrée de la FDA dans la cellule).

Une solution stock de FDA à 1 000 µmol/L a été préparée par dissolution de 0.0208 g de FDA dans 50mL de DMSO. Le stock est conservé à –18 °C, et une partie à 4 °C pour les analyses en cours. Au moment du test, une solution fille est préparée en diluant 0.525 mL de solution stock dans 5mL avec de l'eau ultrapure et 10µL de cette solution est ajouté dans chaque puits, après incubation. Une post-incubation de 15 min (5 000-6 000 lx, 25 °C) est effectuée, avant lecture de la fluorescence à 485/530 nm.

Quelle que soit l'activité suivie, le pourcentage d'inhibition de l'activité des algues à une concentration en toxique donnée est calculé suivant l'équation 4 :

Équation 4 : Calcul du pourcentage d'inhibition de l'activité de l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata.*

$$I_c = \left[\frac{(F_0 - F)}{F_0} \right] \times 100$$

F_0 : activité de l'organisme dans le contrôle (sans toxique)
F : activité de l'organisme avec le toxique

Remarque :

Dans tous les échantillons testés, afin d'éviter d'observer des inhibitions liées à des carences en nutriments (algues) ou à une force ionique trop faible (bactérie), un concentré de milieu de culture a préalablement été ajouté aux échantillons (pour les algues : ajout de 1 mL/L des 5 solutions 1000x concentrées du milieu AAP_{m+Fe} ; pour la bactérie : salinité ajustée à 20 g/L de NaCl avec une solution de NaCl à 220 g/L).

2.5 Analyses statistiques

2.5.1 Validation des données

Pour le traitement statistique des séries d'analyses, les limite de détection, sensibilité, justesse, reproductibilité, exactitude des méthodes ont été vérifiées. Dans l'hypothèse d'une distribution normale, la limite de détection est évaluée par 3 fois l'écart type sur 10 déterminations du blanc (Miller and Miller, 1988).

Il est possible que dans une série d'analyses un des réplicats d'une mesure soit déraisonnablement différent des autres. Il est appelé *« outlier »*. Cette différence est généralement attribuée à une erreur humaine ou à un aléa de la mesure qui n'est pas à prendre en compte dans le résultat définitif, ce qui risquerait de le rendre faux. Afin d'éliminer les valeurs aberrantes d'une série de réplicats, la méthode du *Q* de Dixon a été utilisée (Miller and Miller, 1988).

La comparaison de séries de données, après élimination des éventuels aberrants, a été effectuée par des tests ANOVA et la significativité du test représenté par (*) pour P=0.05, (**) pour P=0.01 et (***) pour P=0.001. Pour les données de toxicité, seul le niveau à P=0.05 a été considéré (voir plus bas).

Enfin, certaines figures utilisent une représentation de type *« boxplot »*, qui a l'avantage de donner sur le même graphique les 10ème, 25ème, 50ème (médiane), 75ème et 90ème percentiles, les *« outliers »* (inférieurs au 10ème percentile ou supérieurs au 90ème percentiles) et la moyenne d'une série de données :

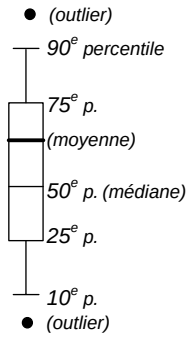


Figure 14 : Signification de la présentation des données en *« boxplots »*.

2.5.2 Expression de la toxicité

La toxicité est calculée à partir des activités des organismes, dont l'inhibition est suivie par différentes méthodes directes ou indirectes présentées précédemment. Afin de permettre une comparaison entre les différents tests effectués, les résultats sont exprimés en terme de CE_{50} ou de TE_{50}. Ils ont été calculés à partir des pourcentages d'inhibition (I_c) des différentes activités des organismes suivies.

Le calcul s'effectue à partir des relations dose-réponse représentant I_c en fonction de la dose (ou du temps) d'exposition, avec le programme Regtox 6.3 (macro pour Microsoft Excel macro mise à disposition par Éric Vindimian, INERIS, France. email : Eric.VINDIMIAN@wanadoo.fr). Cet outil de régression est basé sur le modèle de Hill (1910), initialement établi pour modéliser la liaison de l'oxygène sur l'hémoglobine, mais qui est aussi approprié pour d'autres mécanismes comme des réactions enzymatiques, des relations dose-réponse en toxicologie et écotoxicologie (Vindimian *et al.*, 1983 ; Garric *et al.*, 1990). Ce modèle convient à un large nombre de cas où la mesure d'un effet biologique est exprimé en fonction d'une concentration ou dose. Deux paramètres, le nombre de Hill et la CE_{50} sont les caractéristiques de la relation dose-réponse. Deux autres paramètres, l'effet pour une dose nulle et l'effet maximum à dose infinie sont à définir. Dans le cas où des pourcentages d'inhibition seraient calculés, ces deux paramètres sont respectivement de 0 et 100. La macro est basée sur un algorithme robuste et rapide (Marquardt, 1963) qui permet

d'estimer les paramètres initiaux (nombre de Hill, CE_{50}, effet nul et effet maximum) par itérations successives. Ensuite, une simulation de type *« bootstrap »* entièrement non-paramétrique estime les intervalles de confiance des paramètres, sur un nombre de simulations données (500 est généralement un nombre suffisant). Cette méthode est considérée comme étant tout à fait adaptée aux modèles non linéaires (Efron, 1981).

Les CE_{50} et TE_{50} ont été calculés à partir d'au moins trois concentrations (ou temps), pour lesquelles l'effet observé I_c était compris entre 10 et 90 %. Les valeurs sont données avec un intervalle de confiance à 95 % évalué à partir de 500 simulations non-paramétriques de type *« bootstrap »* avec Lambda = 0.01, Delta Lambda = 5, et critère de convergence = 0.00001. L'effet pour la dose (ou le temps) zéro et l'effet maximum sont imposés respectivement à 0 et 100 dans le modèle.

2.5.3 Corrélations et Analyses multivariées

Le logiciel ADE4 (CNRS Lyon 1) a été utilisé pour les calculs. Les analyses en composantes principales ont été effectuées à partir de la matrice de corrélation obtenue sur les données centrées-réduites. Les différences de variables entre classes (ex. : sol acide/sol carbonaté ou toxique/non toxique) ont été vérifiées par ANOVA.

D'autre part, pour valider les différences entre classes, une analyse discriminante a été effectuée par un test Monte-Carlo sur 10 000 permutations aléatoires, qui permet de tester si les différences sont dues au hasard ou non.

CHAPITRE 3
EFFET DES METAUX SUR DES ORGANISMES AQUATIQUES EN CONDITIONS CONTROLEES

PRISE EN COMPTE DE LA SPECIATION CHIMIQUE POUR INTERPRETER LES RESULTATS DES BIOTESTS

Pour relier les effets observés des métaux avec la spéciation chimique, l'utilisation de milieux les plus simples possibles lors des bioessais est dans un premier temps nécessaire. Le développement depuis quelques années de modèles de spéciation chimiques à l'équilibre (ex. : MINEQL+) permet aujourd'hui d'interpréter les données écotoxicologiques en fonction des espèces chimiques des métaux en présence (Twiss *et al.*, 2000). Cependant, la prise en compte à la fois les impératifs biologiques et chimiques peut amener à des contradictions qui amènent au choix de compromis pour l'établissement des protocoles opératoires.

Ce chapitre présente les résultats obtenus en laboratoire concernant la toxicité du cuivre, ainsi que du cadmium, du plomb et du zinc à titre comparatif. Ces métaux, tous divalents dans les conditions des bioessais, ont été choisis pour permettre une comparaison des comportements chimiques par rapport aux effets toxiques observés. Dans un premier temps, après une validation des méthodes testées, la sensibilité des indicateurs d'effet du cuivre sur l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* sera présentée ainsi que l'influence du milieu choisi (en particulier l'influence de l'EDTA). Dans un deuxième temps, l'influence du milieu d'ajustement osmotique pour le test sur la bactérie *Vibrio fischeri* sera présenté et les résultats discutés par rapport aux concentrations en ion libre. Enfin, la toxicité des complexes lipophiles des métaux (CLM) en comparaison de la toxicité de l'ion libre sera évoquée.

Les résultats, outre leur apport pour la compréhension générale de la toxicité des métaux pour les micro-organismes en relation avec la spéciation chimique, sont une contribution à l'amélioration des biotests dans un objectif de caractérisation de l'exposition des organismes aquatiques aux métaux. Ils serviront de base à l'interprétation des résultats de toxicité des eaux de ruissellement agricoles présentés au chapitre suivant.

3.1 Effet du cuivre sur l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*

Comme le soulignent Blaise *et al*. (Blaise *et al.*, 1998) dans une revue de la littérature sur les tests algals en microplaque, différentes mesures d'effet à court terme et à long terme ont été utilisées, et des validations croisées sont nécessaires pour déterminer la sensibilité des différents indicateurs aux polluants.

Nous nous proposons ici de comparer deux méthodes de quantification indirecte de la biomasse pour le calcul d'inhibition de la croissance algale (mesures indirectes par absorbance et fluorescence) puis de différentes activités spécifiques (activité estérasique, intégrité membranaire, fluorescence chlorophyllienne) et enfin les réponses obtenues pour chaque méthode concernant la toxicité du cuivre.

Les effets aigus sur l'algue unicellulaire d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* ont été mesurés dans les huit premières heures d'incubation alors que les effets chroniques sur la croissance ont été mesurés après une incubation entre 24 et 72 h.

3.1.1 Quantification de la biomasse algale : validation d'une alternative au comptage cellulaire

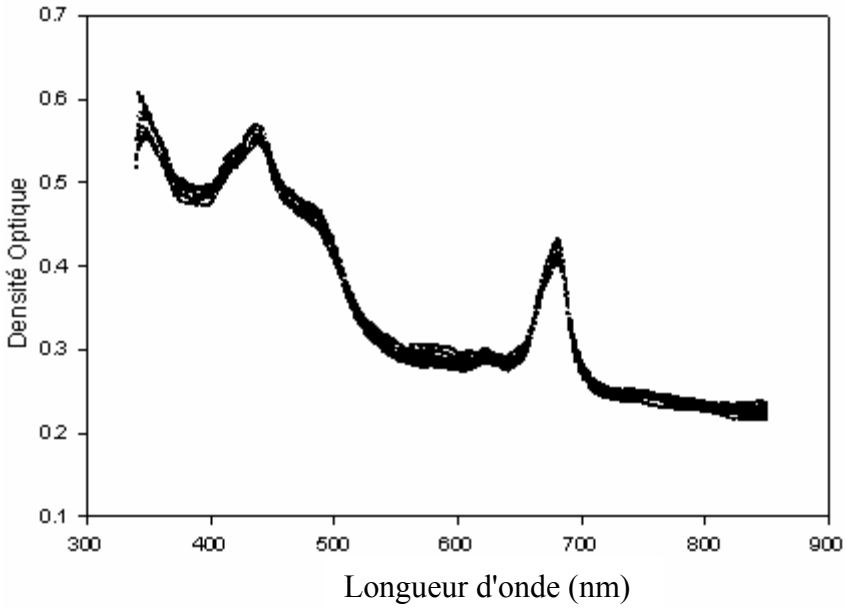
Le protocole défini par la norme ISO pour l'essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce (ISO, 1989) conseille un comptage direct des algues pour l'évaluation de la biomasse algale, l'utilisation éventuelle de méthodes alternatives devant préalablement être validée pour des concentrations aussi faibles que 10^4 cell/mL. La ligne directrice de l'OCDE (OCDE, 1984) et la méthode de l'USEPA (USEPA, 1989) mentionnent, outre l'utilisation d'un compteur électronique de particules ou d'un microscope pour une quantification directe de la biomasse, l'utilisation possible de méthodes indirectes comme la fluorescence (estimation du contenu en chlorophylle) ou de l'absorbance (turbidité ou couleur du milieu). D'autre part, les protocoles sont établis pour des tests en erlenmeyers avec des volumes d'essais importants (plusieurs dizaines ou centaines de mL) et des durées d'incubation de 96 h.

Le développement des microbiotests a conduit depuis quelques années à diminuer les volumes, les temps d'incubation ainsi que la densité algale initiale (Blaise *et al.*, 1998). Le développement récent de spectrophotomètres ou de fluorimètres pour microplaques suffisamment sensibles rend possible la validation de tests miniaturisés en microplaques utilisant des méthodes alternatives de quantification des algues, comme la méthode proposée par Environment Canada (1992). Ainsi, Harwood (Harwood, 1994) a pu mettre en évidence que la technique photométrique en microplaque était tout aussi valable que le dénombrement par comptage électronique pour évaluer la toxicité de substances pures. Cependant, pour certains échantillons complexes, la sensibilité et la précision de la mesure par absorbance sont plus faibles que le dénombrement direct.

Nous avons évalué les performances du mode opératoire présenté au Chapitre 2 avec suivi de l'absorbance et de la fluorescence. Nous avons dans un premier temps déterminé les longueurs d'onde de travail optimales dans les conditions du test, puis évalué la validité des mesures d'absorbance et de fluorescence entre 0 et 72 h.

3.1.1.a Choix de la longueur d'onde d'absorbance

Le spectre d'absorption de *Pseudokirchneriella subcapitata* dans le domaine visible (Figure 15) montre deux maxima à 430-450 nm et vers 690 nm.



Mesure de l'absorbance (n = 8) entre 340 et 850 nm avec un pas d'1 nm. concentration cellulaire=10^5 cell/mL,en microplaque 96 puits

Figure 15 : Spectre d'absorption dans le domaine visible de *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Tous les végétaux contiennent de la chlorophylle *a*, qui constitue pour les algues planctoniques environ 1 à 2 % du poids sec (APHA, 1985). Les autres pigments présents dans les algues planctoniques sont la chlorophylle *b* et *c*, les xanthophylles et carotènes. La quantification de ces différents pigments peut s'effectuer par des mesures spectrophotométriques après extraction dans la zone du pic observé vers 690 nm, à 750, 665, 664 et 647 nm.

Les études recensées dans la littérature ne permettent pas de définir une longueur d'onde optimale précise, et plusieurs longueurs d'ondes sont préconisées dans les protocoles de biotests sur les algues. L'USEPA (1989) recommande une mesure de la turbidité à 750 nm, comme dans les études de Lukavski (1992) et Marsalek and Rojickova-Padrtova (2000). D'autre part Harwood (1994), qui a obtenu un spectre d'absorption comparable à celui présenté en figure 15, conseille parmi les trois longueurs d'ondes testées dans son étude (430,

450 et 690 nm) une mesure à 430 nm. D'autres études mesurent l'absorbance à 450 nm, 420 nm ou encore 690 nm (Blaise *et al.*, 1998).

Nous avons choisi d'utiliser la longueur d'onde optimale avec le mode opératoire suivi. Le spectre obtenu montre que le maximum d'absorbance à 440 nm présente le meilleur rapport signal/bruit de fond. Cette longueur d'onde a été sélectionnée pour l'utilisation lors des biotests.

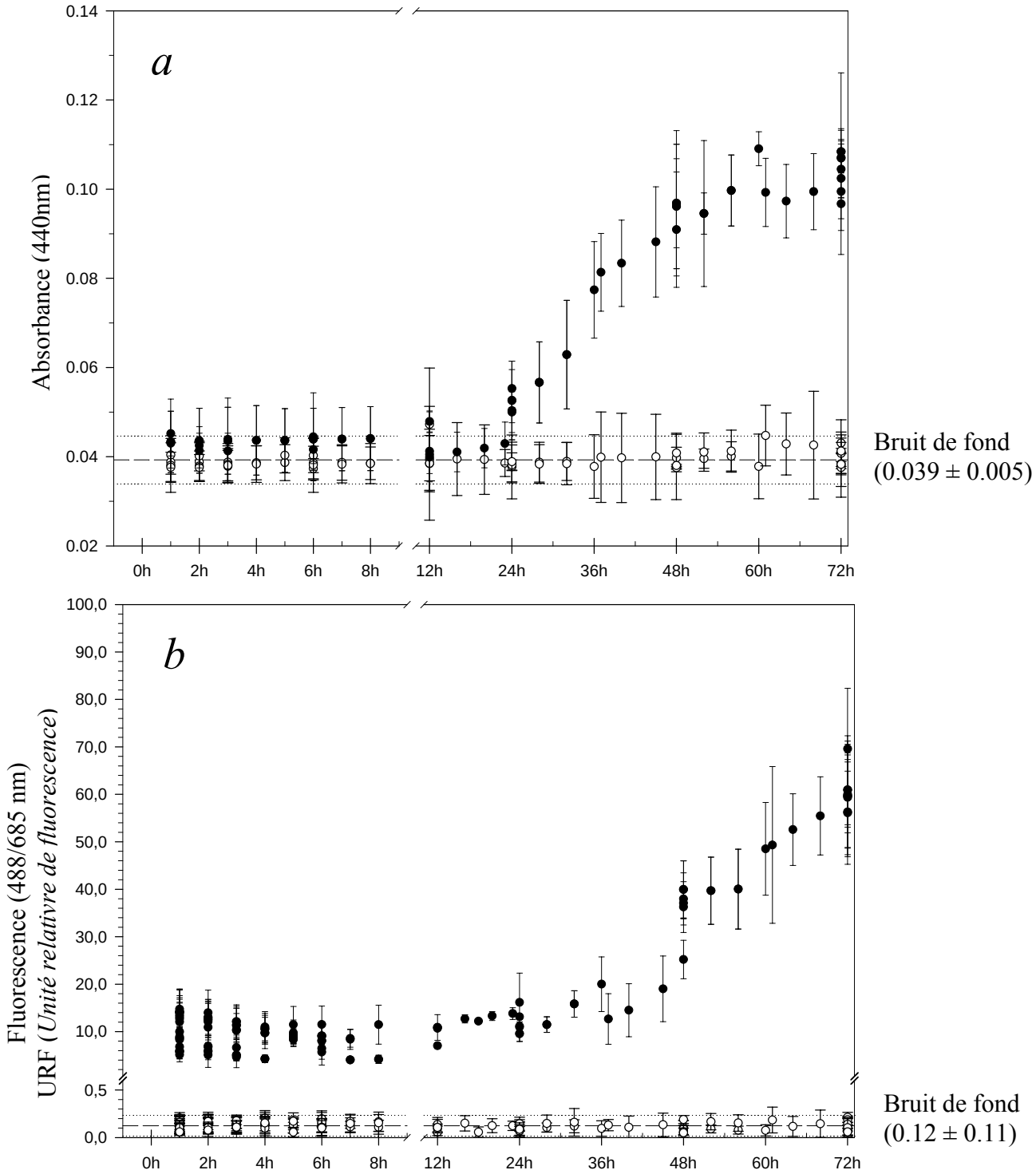
3.1.1.b Choix du couple de longueurs d'onde de fluorescence

La détermination de la chlorophylle *a* s'effectue classiquement à un couple de longueur d'onde de 430/663 nm (APHA, 1985) ou 430/671 ± 10 nm (Mayer *et al.*, 1997). Après une étude de la fluorescence de *Pseudokirchneriella subcapitata* dans les conditions du test, nous avons pu déterminer un couple de longueur d'onde optimal de 488/685 nm, qui a été utilisé pour les tests.

3.1.1.c Corrélation des mesures d'absorption et de fluorescence avec le dénombrement cellulaire de Pseudokirchneriella subcapitata : domaine de validité.

La figure 16 présente les valeurs du bruit de fond (milieu sans algue) et du milieu avec un inoculum standard d'algues (10^4 cell/mL au temps initial) issus des lectures d'absorbance et de fluorescence. Les résultats montrent que la méthode de lecture par absorbance ne permet pas d'obtenir un signal significativement différent du bruit de fond avant 24h, temps qui correspond à un nombre suffisant de cellules du fait de la croissance. Nous avons pu déterminer que l'absorbance des algues est significativement différente du bruit de fond à des concentrations algales supérieures à 3.2×10^4 cell/mL. Cependant, même après 72 d'incubation, le rapport signal / bruit de fond reste faible (de l'ordre de 2).

En revanche, la lecture par fluorescence permet de détecter la présence des algues dans le milieu dès la première heure, avec un rapport signal / bruit de fond de l'ordre de 10, toujours significativement différent du bruit de fond. Celui-ci atteint 70 après 72 h.



Bruit de fond (○) et culture algale (●) entre 1 et 72h d'incubation avec intervalle de confiance (P=0.05, n=5-8). Concentration cellulaire initiale=10^4 cell/mL

Figure 16 : Bruit de fond et valeurs de la culture algale dans les biotests en microplaque avec *Pseudokirchneriella subcapiata* effectués avec mesure de l'absorbance (a) et de la fluorescence (b).

3.1.1.d Validation des Indicateurs d'effets spécifiques : activité estérasique (FDA) et intégrité membranaire (IP)

Le tableau 13 présente le bruit de fond du milieu et la réponse de la culture d'algues (10^5 cell/mL) obtenus pour le suivi de l'activité estérasique et de l'intégrité membranaire. Les niveaux d'activité estérasique permettent d'envisager un suivi l'inhibition dès une heure d'exposition, ce qui en fait un indicateur précoce d'effet. Concernant l'intégrité membranaire, les valeurs obtenues avec les algues ne sont pas significativement différentes du bruit de fond, ce qui montre que l'iodure de propidium n'est pas en contact avec les acides nucléiques. Le test d'une molécule connue pour altérer la membrane (ex. : Méthanol 10% après 1 h d'exposition) montre que la fluorescence obtenue avec l'iodure de propidium est deux ordres de grandeur supérieure au bruit de fond (1 240 ± 124 URF).

Temps	Activité estérasique (FDA)		Intégrité membranaire (IP)	
(heures)	Bruit de fond	Culture algale	Bruit de fond	Culture algale
1	1.68 ± 0.23	26.57 ± 1.65	11.89 ± 1.57	12.55 ± 0.74
2	1.71 ± 0.17	27.13 ± 2.48	11.82 ± 0.83	12.14 ± 0.73
3	1.59 ± 0.15	24.12 ± 2.44	12.70 ± 1.09	12.21 ± 1.07
4	1.70 ± 0.11	31.20 ± 2.27	11.56 ± 1.87	12.32 ± 0.69
5	1.46 ± 0.11	34.90 ± 5.30	11.27 ± 0.69	12.41 ± 1.21
6	1.67 ± 0.15	37.44 ± 7.44	12.24 ± 1.18	12.07 ± 1.11
7	1.29 ± 0.11	33.82 ± 5.12	11.47 ± 1.47	12.44 ± 0.87
8	1.24 ± 0.13	34.18 ± 1.39	11.21 ± 0.79	12.09 ± 0.84

Valeurs en Unités Relatives de Fluorescence avec intervalle de confiance (P = 0.05, n = 12)

Tableau 13 : Bruit de fond et valeurs de la culture algale dans les biotests en microplaque avec *Pseudokirchneriella subcapiata* effectués avec mesure de l'activité estérasique et d'intégrité membranaire.

3.1.2 Comparaison de la toxicité du cuivre évaluée par les différents indicateurs d'effet

La toxicité du cuivre a été testé selon le mode opératoire décrit dans le Chapitre 2, dans le milieu AAP_m avec ajout de sulfate de cuivre. Le tableau 14 synthétise les résultats de toxicité du cuivre obtenus avec les différents indicateurs d'effet.

L'effet observable le plus précoce sur l'algue est celui observé avec la FDA (activité estérasique), qui est le résultat soit d'une action sur la membrane, soit d'une action sur l'activité de l'esterase dans la cellule. L'intégrité membranaire n'est pas affectée par le cuivre à des concentrations supérieures à 15 mg/L, comme l'ont montré les expériences avec l'iodure

Temps (heures)	Croissance (Absorbance)	Chlorophylle (Fluorescence)	Activité estérasique *(FDA)*	Intégrité membranaire *(IP)*
1	- - -	> 10 000	125 (82-191)	> 15 000
2	- - -	10 874 (8 713-14 948)	757 (361-1456)	> 15 000
3	- - -	6 458 (4 251-8 452)	599 (463-749)	> 15 000
4	- - -	3 695 (3 260-4 111)	520 (426-620)	> 15 000
5	- - -	3 017 (2 691-3 261)	482 (396-569)	> 15 000
6	- - -	2 930 (2 602-3 215)	401 (134-807)	> 15 000
7	- - -	2 487 (2 198-2 751)	334 (257-391)	> 15 000
8	- - -	1 702 (1 633-1 883)	265 (222-308)	> 15 000
12	- - -	693 (441-1090)	139 (54-267)	> 15 000
24	36.8 (28.7-44.6)	47.7 (33.0-71.0)	46.7 (28.7-69.5)	- - -
48	10.6 (9.8-11.5)	12.7 (11.2-13.7)	28.5 (17.5-46.6)	- - -
72	9.8 (9.2-11.1)	10.7 (9.1-11.5)	15.2 (14.9-19.1)	- - -

CE_{50} en µg/L avec intervalle de confiance (P = 0.05, n = 6) - Milieu AAP_m

Tableau 14 : Toxicité du cuivre (CE_{50}) pour l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* entre 1 et 72 h, évaluée par biotests en microplaques. Comparaison des effets sur la croissance, la fluorescence de la chlorophylle, l'activité estérasique et l'intégrité membranaire.

de propidium (IP). D'autres études ont aussi montré que le cuivre n'a pas d'effet significatif à court terme sur le potentiel membranaire de *Pseudokirchneriella subcapitata* (Franklin *et al.*, 2001).

Après 24 h, on observe une inhibition significative de la fluorescence, accompagnée d'une hausse de la sensibilité de l'activité estérasique. C'est aussi à partir de 24 h que les effets sur la croissance commencent à être mesurés. Cet effet sur l'inhibition de la croissance a déjà été reporté et expliqué par des changements de perméabilité pour les ions Na^+. On observe parallèlement un accroissement de la taille des cellules (Riisgard *et al.*, 1980) due au blocage de la division cellulaire malgré une photosynthèse toujours active (accumulation de carbone dans les cellules). A 24 h et 48 h, la croissance, aussi bien que la fluorescence de la chlorophylle et l'activité estérasique ont des sensibilités comparables au cuivre.

Ces résultats illustrent la complexité de l'effet toxique du cuivre, dont la traduction dans les différentes activités métaboliques est spécifique à une espèce donnée. Par exemple, l'effet chronique du cuivre sur la fluorescence de la chlorophylle *a* est différent d'une espèce végétale à l'autre, selon que le cuivre inhibe le flux d'électron dans le photosystème au niveau donneur ou accepteur d'électrons (Samson *et al.*, 1988 ; Yruela *et al.*, 1993). Plus généralement, trois conclusions ressortent des résultats :

- l'inhibition de l'activité estérasique (FDA) est un indicateur précoce (dès 1h) de la toxicité et permet d'évaluer la toxicité du cuivre à des niveaux de contamination correspondant à des milieux très pollués (CE_{50} de l'ordre de 100 µg/L) ;

- le cuivre n'a pas d'effet sur l'intégrité membranaire des algues jusqu'à des concentrations très élevées (> 10 mg/L) ;
- les effets chroniques (à partir de 48 h) sont les plus sensibles (CE_{50} de l'ordre de 10 µg/L), avec une variabilité plus faible que les autres paramètres.

3.1.3 Implications pour l'utilisation du biotest

Nous avons pu montrer que la quantification de la biomasse algale par absorbance était valide pour l'évaluation de l'inhibition de la croissance après plus de 24 h.

Une comparaison avec les données de la littérature sur d'autres expériences en microplaque est difficile, car la réponse des bioessais est influencée par des facteurs liés à la procédure elle-même (lumière, température, inoculum, milieu, indicateur d'effet…) et la spécificité des équipements disponibles dans les laboratoires. Cependant, l'ensemble des données répertoriées dans la littérature montre que les tests chroniques (3 à 5 jours) restent plus sensibles que les tests en exposition aiguë (Figure 17).

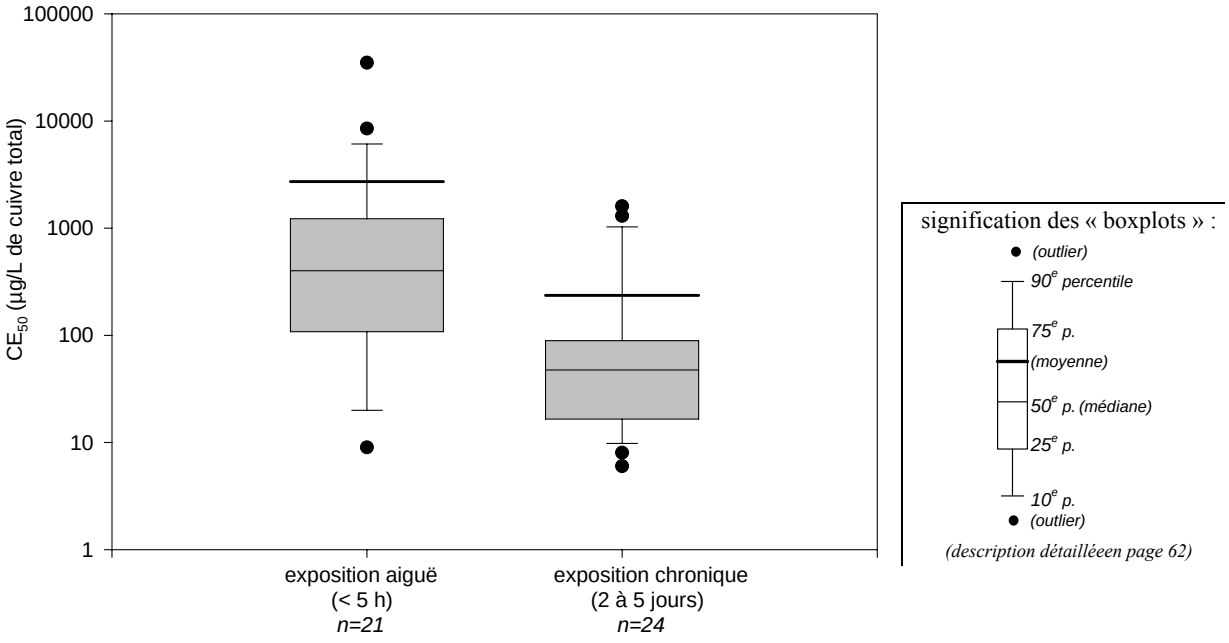


Figure 17 : Toxicité du cuivre pour *Pseudokirchneriella subcapitata* reportée dans la littérature en exposition aiguë et chronique pour des tests en microplaques.(Haley *et al.*, 1986 ; Versteeg, 1990 ; Tubbing *et al.*, 1994 ; Van der Heever and Grobbelaar, 1996 ; Blaise *et al.*, 1998 ; Franklin *et al.*, 2001).

Les tests en microplaque ont déjà fait l'objet d'une validation avec les résultats d'inhibition de la croissance obtenus classiquement en erlenmeyers : une amélioration des performances est notée avec le test en microplaque (bruit de fond, variabilité) alors que les médianes des concentrations inhibitrices sont similaires pour les deux méthodes (Geis *et al.*, 2000). D'autre part, les résultats présentés ci-dessus montrent qu'il est possible d'adapter les tests de croissance en microplaque pour obtenir des informations plus précises sur l'inhibition des activités métaboliques.

Les résultats obtenus en milieu AAP_m montrent que la sensibilité de *Pseudokirchneriella subcapitata* est satisfaisante en exposition chronique (CE_{50} = 10 µg/L de cuivre total) pour l'étude des effets à des niveaux de contamination réaliste. Néanmoins, il est nécessaire de prendre quelques précautions pour étudier l'effet des métaux, et en particulier enlever l'EDTA du milieu de culture, qui augmente par un facteur 4 les CE_{50} (la CE_{50} dans le milieu AAP avec EDTA est de 39.2µg/L de cuivre total). Cet effet n'est pas entièrement dû à la baisse d'ion libre, comme le montrent les calculs par MINEQL+ (Tableau 15) : la toxicité exprimée en concentrations en cuivre libre cuivre libre est de 1.2 µg/L avec EDTA (3% de 39.2µg/L) alors que sans EDTA la toxicité exprimée en ion libre est plus forte, avec une CE_{50} de 0.4 µg/L (4% de 9.8µg/L).

Tous les autres paramètres étant comparables par ailleurs (pH, conductivité…), l'EDTA n'a pas d'effet sur la baisse de la concentration en ion libre, mais aurait plutôt un effet indirect sur la spéciation (augmentation des complexes avec les hydroxydes en absence d'EDTA).

Milieu de culture	**CE_{50} 72h (*)**	**% ion libre**	**% hydroxy-complexes**	**% carbonate-complexes**	**% EDTA-complexes**
AAP	*39.2 (38.2-41.1)*	*3%*	*53%*	*7%*	*36%*
AAP_{m+Fe}	*9.8 (9.2-11.1)*	*4%*	*84%*	*11%*	*0%*

(*) Inhibition de la croissance, CE_{50} en µg/L de cuivre

Tableau 15 : Toxicité du cuivre pour *Pseudokirchneriella subcapitata* dans le milieu AAP avec et sans EDTA. Relation avec les concentrations en ion libre.

Le test chronique d'inhibition de la croissance est le plus adapté à l'étude des effets du cuivre. Parmi les méthodes testées, la mesure par fluorescence est la plus sensible et permet de suivre l'évolution des effets entre 1 et 72 h.
Concernant les autres indicateurs d'effet, l'information qu'ils apportent peut être utile pour mieux identifier l'action des éléments toxiques dans les échantillons, et faire la part de la toxicité du cuivre par rapport aux autres contaminants.

3.2 Influence du milieu d'ajustement osmotique pour le biotest bactérien

L'inhibition de la luminescence de la bactérie marine *Vibrio fischeri* est utilisée depuis de nombreuses années pour la mesure de la toxicité des composés chimiques et de diverses matrices environnementales (Blaise *et al.*, 1994). Cependant, l'utilisation de chlorure de sodium nécessaire pour l'ajustement osmotique des échantillons pose des problèmes conceptuels quant à la validité des résultats pour des échantillons d'eau douce. Ce point a déjà été relevé dans la littérature (Carlson-Ekvall and Morrison, 1995a), et d'autres sels ont été testés à la place du NaCl. D'autre part, des molécules comme le sucrose, n'ayant pas *a priori* d'effet sur la spéciation, ont été proposé comme alternative (Ankley *et al.*, 1990 ; Villaescusa *et al.*, 1997). Cependant, il n'a pas été démontré que l'augmentation de la sensibilité du biotest pour les métaux grâce à l'utilisation d'ajustements osmotiques alternatifs était due uniquement à des changements de spéciation ou aussi à des effets sur le métabolisme des bactéries.

L'objectif est ici de tester les alternatives au chlorure de sodium dans le test d'inhibition de la bioluminescence de *Vibrio fischeri* par les métaux en relation avec la concentration en ion libre calculée.

L'influence du sel d'ajustement osmotique sur la toxicité du cuivre, du zinc, du cadmium et du plomb a été testé pour trois solutions : NaCl 20 g/L, $NaNO_3$ 30.2 g/L ou Sucrose 206 g/L dans l'eau ultrapure, ajusté à pH=5.5 et à l'équilibre avec l'atmosphère. L'inhibition de la luminescence à 5, 15, 30 et 45 min a été mesurée par essai en microplaque et les CE_{50} moyennes calculées à partir de 6 réplicats. Les résultats, présentés en figure 17, sont exprimés en concentration de métal total et de métal libre (calcul de spéciation chimique à l'équilibre par MINEQL+). Les différences significatives ($P<0.05$, $n=6$) sont indiquées par une astérisque.

3.2.1 Toxicité du cuivre

La CE_{50} du cuivre (exprimée en concentration totale) dans le milieu standard du test (NaCl) est significativement supérieure aux CE_{50} dans les deux milieux alternatifs, et la CE_{50} dans le $NaNO_3$ est supérieure à celle dans le sucrose, quel que soit le temps. Cependant, les différences de toxicité entre les trois milieux ont tendance à s'amenuiser avec le temps (la différence entre $NaNO_3$ et sucrose à 45 min n'est plus significative). Exprimées en concentrations en ion libre, les CE_{50} à 30 min et 45 min ne sont pas significativement différentes quel que soit le milieu considéré, ce qui est en accord avec le modèle d'activité de l'ion libre (FIAM). Cependant, à 5 et 15 min, les différences sont significatives entre les trois milieux, même si l'on exprime les CE_{50} en concentrations en ion libre. Ces différences de cinétique pourraient être dues à l'interaction des ions du milieu sur la membrane bactérienne.

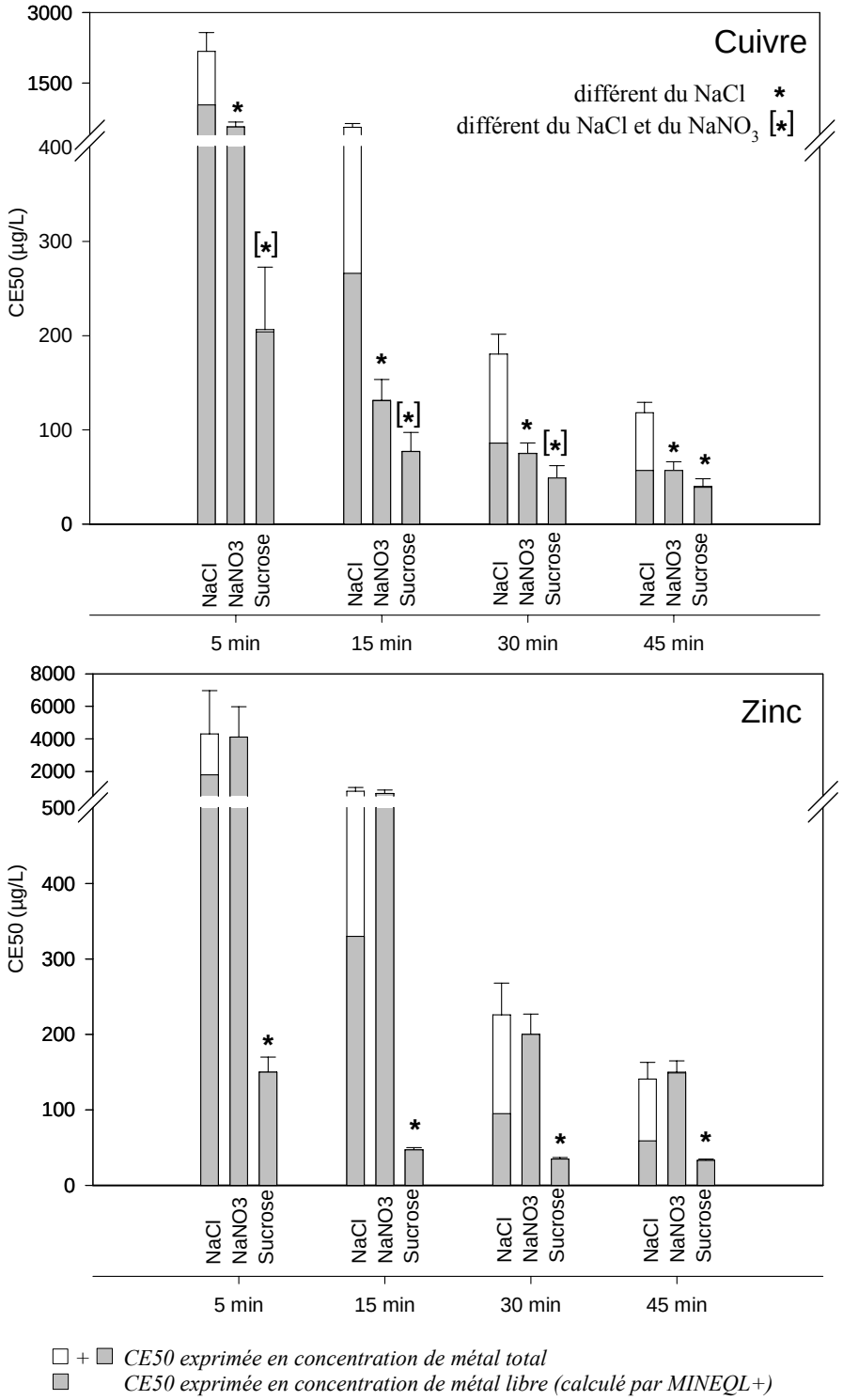


Figure 18 : Toxicité des métaux (CE_{50} avec intervalle de confiance, n = 6, P = 0.05) pour la bactérie *Vibrio fischeri* dans trois milieux d'ajustement osmotique.

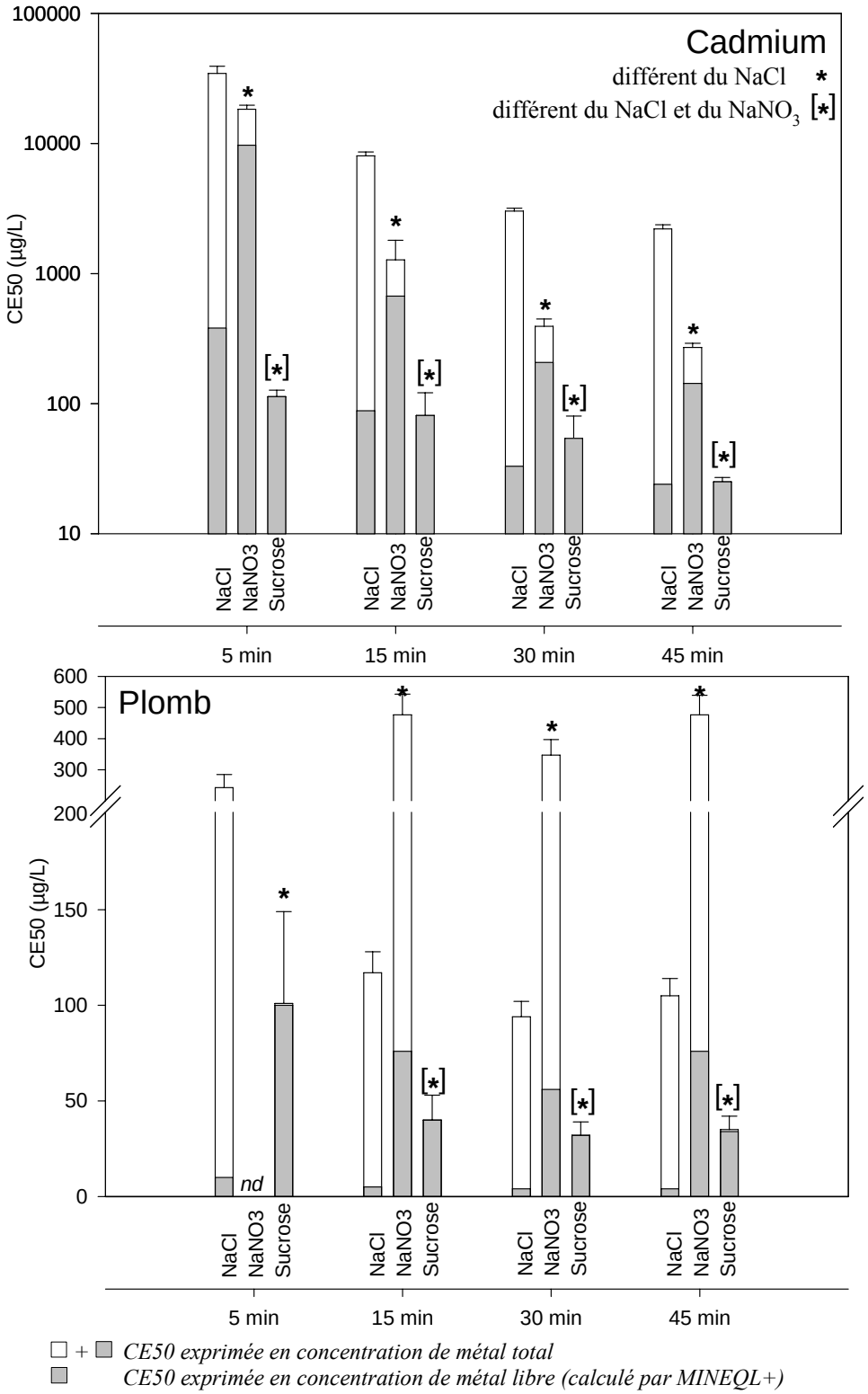


Figure 17 (suite)

En termes de possibilités d'utilisation de cette méthode, la CE_{50} à 45 min du cuivre se rapproche de concentrations réalistes de milieux contaminés (CE_{50} 45 min = 108±11 µg/L de cuivre total dans le milieu NaCl 20g/L), et est améliorée d'un facteur 2 en utilisant les milieux alternatifs comme le $NaNO_3$ ou le sucrose (CE_{50} 45 min = 57 ± 9 et 40 ± 8 µg/L de cuivre total, respectivement).

3.2.2 Toxicité du zinc

Les résultats concernant la toxicité du zinc sont similaires à ceux du cuivre, avec une sensibilité un peu plus faible. Cependant, on peut noter que les CE_{50} calculées en concentrations en ion libre dans le milieu $NaNO_3$ sont 2 fois plus élevées que dans les autres milieux, en désaccord avec le FIAM. Deux hypothèses peuvent être avancées :

- une surestimation des concentrations en ion libre par le calcul MINEQL+ : Dans la base de donnée de MINEQL+ utilisée, la complexation du zinc par les nitrates n'est pas prise en compte, par approximation, car l'affinité de ce métal pour les nitrates est plus faible qu'avec les autres métaux testés, comme le plomb (LogK=1.17) et le cadmium (LogK=0.4). Mais compte tenu des fortes concentrations en nitrates présentes dans le milieu, il est possible que cette approximation surestime la concentration en ion libre. D'autre part, nous n'avons pas pris en compte la cinétique de complexation.
- une sensibilité plus faible des bactéries au zinc en présence de nitrates, par un effet sur la membrane ou sur le métabolisme lié à l'indicateur d'effet (la bioluminescence).

3.2.3 Toxicité du cadmium

Pour le cadmium, la situation est la même que pour le zinc, c'est à dire que les concentrations en ion libre calculées par MINEQL+ dans le milieu $NaNO_3$ sont surestimées par rapport aux autres milieux.

On note aussi des CE_{50} très élevées dans le milieu NaCl, en relation avec la forte affinité du cadmium pour les ions chlorure et de l'utilisation du sel $CdCl_2$. L'utilisation d'un milieu alternatif (sucrose) pour l'étude de la toxicité de ce métal paraît donc très souhaitable.

3.2.4 Toxicité du plomb

La toxicité du plomb dans le milieu NaCl est faible, et augmente peu au cours du temps, contrairement aux autres métaux. L'utilisation de $NaNO_3$ a pour effet de diminuer la sensibilité du test malgré des concentrations en ion libre plus fortes que dans le milieu NaCl (4% d'ion libre dans le milieu NaCl contre 20% dans le milieu $NaNO_3$).

3.2.5 Conclusions

Le calcul par MINEQL+ n'a pas permis de valider la toxicité de l'ion libre dans le milieu $NaNO_3$ pour le zinc et le cadmium. Les constantes de complexation de MINEQL+ seraient à vérifier. D'autre part, l'ion libre ne permet pas toujours d'expliquer l'effet observé. Certains auteurs mentionnent que des complexes inorganiques peuvent être toxiques dans une moindre mesure : $CuOH^+$ et $Cu(OH)_2$ par exemple ont une toxicité équivalente à 0.75 et 0.70 fois celle de l'ion libre, respectivement (He *et al.*, 2001). Mais ce n'est pas le cas pour nos résultats car les complexes avec les hydroxydes sont toujours négligeables (<1% du métal total), quel que soit le métal et le milieu considéré. Les complexes présents significativement le milieu NaCl sont $MeCl^+$ (44,% 38%, 36% et 56% du Cu, Zn, Cd et Pb total, respectivement) et $MeCl_2$ (8,% 14%, 52% et 30% du Cu, Zn, Cd et Pb total, respectivement). Dans le milieu $NaNO_3$ seul le complexe $Me(NO_3)^+$ est significativement présent en plus de l'ion libre (47% et 84% du Cd et du Pb total, respectivement – concentrations <1% pour le Cu et Zn). Enfin, dans le sucrose, aucun des métaux n'est considéré comme étant complexé, et les concentrations en ion libre supérieures à 99%.

Au vu des fortes concentrations de complexes parfois présents, il est probable que les complexes inorganiques des métaux, même s'ils sont peu toxiques, aient un effet non négligeable. C'est pourquoi, même si le sel d'ajustement osmotique est modifié, le test bactérien avec *Vibrio fischeri* reste peu réaliste pour le test de la toxicité des métaux en eau douce.

Les résultats obtenus n'ont permis de valider que partiellement les effets observés par rapport aux concentrations calculées en ion libre, en particulier pour les autres métaux que le cuivre. Plusieurs paramètres entrent en compte, dont les approximations de MINEQL+ qui demanderaient à être vérifiées.
Mais plus généralement, le test d'inhibition de la bioluminescence de la bactérie marine reste critiquable pour une utilisation en eau douce, en particulier pour tester l'effet des métaux. L'utilisation de sucrose pour l'ajustement osmotique du milieu augmente significativement la sensibilité du test pour les métaux étudiés, mais ne permet pas d'atteindre une sensibilité comparable au test algal.

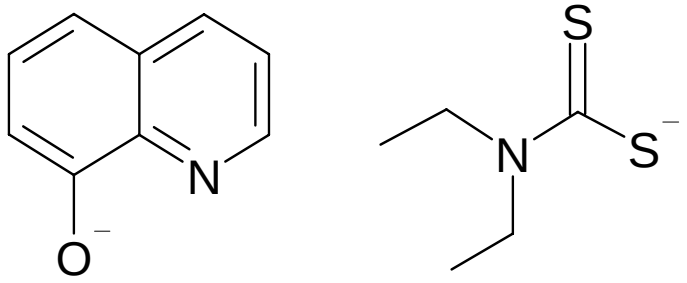
3.3 Biodisponibilité des complexes lipophiles des métaux[4]

L'étude des CLM nécessite l'utilisation de méthodes adéquates permettant la mesure des effets biologiques en liaison avec la spéciation chimique des métaux. L'utilisation répandue de bioessais utilisant des micro-organismes (bactéries, algues unicellulaires) est généralement justifiée par la faible taille des organismes, la facilité de culture et un taux de croissance élevé, permettant une approche *in vitro* à petite échelle avec un large spectre possible de suivi des inhibitions aiguës ou chroniques des activités des organismes (Wells *et al.*, 1997). Dans le cas des CLM, les expériences avec des organismes unicellulaires ont l'avantage d'utiliser des milieux simples et bien définis, qui permettent le contrôle de la spéciation chimique en relation avec les effets observés. La spéciation chimique dans les milieux utilisés peut être simplement calculée à partir des constantes de complexation des molécules en présence. Dans ce sens, les bioessais avec les micro-organismes ont été utilisés comme des indicateurs de la spéciation chimique des métaux (Guy and Kean, 1980 ; Morel *et al.*, 1988) et pour la mesure de la capacité de complexation des eaux naturelles (Srna *et al.*, 1980 ; Sunda and Ferguson, 1983 ; Hering *et al.*, 1987). Afin d'identifier la toxicité des CLM, les microbiotests semblent des outils adaptés pour lier la toxicité à la spéciation chimique.

Dans cet objectif, nous avons comparé la toxicité (chronique et aiguë) observée en présence d'ion libre et/ou de CLM. La spéciation chimique de quatre métaux (cuivre, zinc, cadmium et plomb) a été calculée avec deux ligands (oxine et diethyldithiocarbamate), et comparée avec les effets biologiques observés par des microbiotests avec la bactérie *Vibrio fischeri* et l'algue unicellulaire d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata*. A partir des résultats obtenus dans cette étude, et à la lumière des travaux précédents sur les CLM, un autre objectif a été d'identifier la possible distribution et répartition des CLM dans les milieux aquatiques, et d'évaluer la nécessité de prendre en compte l'effet des CLM dans les modèles de biodisponibilité des métaux pour les organismes aquatiques.

Le Quinolin-8-ol (oxine) Aldrich *p.a.* et le diethyldithiocarbamate (DDC), sous forme de sel de sodium Fluka *p.a.* ont été choisis comme ligands lipophiles modèles (Figure 19). Des solutions stock de ligand à une concentration de 1 mol/L ont été préparées dans du DMSO (Merck *p.a.*). Des solutions stock à 1 g/L de chaque métal, cuivre ($CuSO_4$), zinc ($ZnSO_4$), plomb ($PbCl_2$) et cadmium ($CdCl_2$), ont été préparées dans l'eau ultrapure, à partir de sels Merck *p.a.* Pour chaque mélange ligand-métal testé, les solutions stocks sont ajoutées en quantité voulue dans les milieux de culture, équilibrés 1h à l'obscurité à température ambiante avant d'effectuer les bioessais.

[4] Ce paragraphe présente des résultats soumis dans la revue *Environmental Toxicology and Chemistry*. La même structure dans la présentation a été conservée.



Oxine Diethyldithiocarbamate (DDC)

Figure 19 : Structure des ligands utilisés pour former les complexes lipophiles des métaux.

Les tests de toxicité ont été effectués sur l'algue unicellulaire d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* et la bactérie marine *Vibrio fischeri* conformément aux protocoles modifiés en microplaque. La toxicité des quatre métaux (Cu, Zn, Cd, Pb) avec ou sans ligand dans le milieu (1 µmol/L d'oxine ou de DDC) a été évaluée. Pour chaque métal, 8 concentrations en série (3 réplicats) avec des facteurs de dilution de 2 et 5, respectivement pour la bactérie et l'algue, ont été testées et la réponse comparée à la mesure dans les contrôles (6 réplicats). Les concentrations maximales testées en cuivre, zinc, cadmium et plomb ont été respectivement de 157.5, 152.9, 89.0 et 48.3 µmol/L pour le bioessai algal et de 19.1, 13.1, 562.0 et 41.4µmol/L pour le bioessai bactérien. Par ailleurs, la toxicité possible des ligands seuls (oxine et DDC) a aussi été testée entre 0.1 et 10 µmol/L.

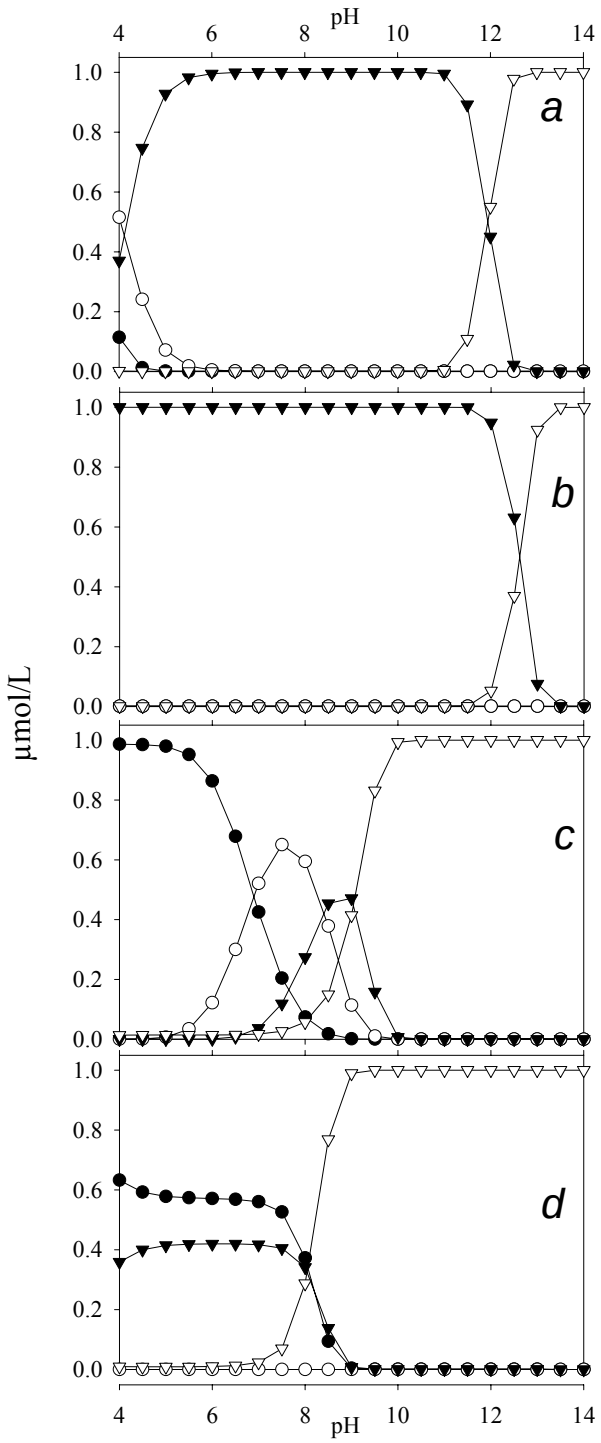
Les concentrations en ligands et métaux ont été choisis après calcul de la spéciation chimique à l'équilibre dans les solutions avec MINEQL+ 3.01a (Schecher and McAvoy, 1994). Pour l'interprétation de la toxicité en fonction du calcul de la spéciation chimique, seule la concentration en ion libre a été prise en compte, ainsi que les concentrations en complexes avec l'oxine et le DDC. Les autres complexes sont considérés comme n'étant pas biodisponibles.

3.3.1 Résultats

3.3.1.a Calculs de spéciation chimique

♦ *Étude de l'influence du pH*

L'influence du pH sur la formation de complexes des métaux avec l'oxine ou le DDC dans le milieu AAP_m est illustré en figure 20.



Me^{++} (●), MeL^{+} (○), MeL_2 (▼), complexes inorganiques (▽).
Les autres diagrammes sont présentés en annexe 1.

Figure 20 : Diagrammes de spéciation, à pH = 4 à 14, des mélanges Cu + oxine (a), Cu + DDC (b), Zn + oxine (c), et Zn + DDC (d). Calculs effectués dans le milieu AAP_m (I = 0.001 mol/L), avec [Me] = 1 µmol/L et [L] = 2.2 µmol/L.

Le DDC, considéré comme un monoacide, présente un comportement simple : l'espèce $Me(DDC)_2$ domine à pH inférieur à 12.0 pour le cuivre et inférieur à 9.7 pour le plomb. La complexation avec les carbonates domine à des pH supérieurs. L'espèce $Me(DDC)^+$ n'est significativement présente à aucun pH. Le comportement est similaire pour le zinc, avec un changement de l'espèce majoritaire à pH = 8. Mais à cause de constantes de complexations du $Zn(DDC)_2$ plus faibles, l'ion libre Zn^{++} est aussi présent à pH alcalin (60 % de zinc libre et 40 % de $Zn(DDC)_2$).

Les diagrammes calculés pour l'oxine sont plus complexes car la molécule est un diacide. Le cuivre, parmi les métaux étudiés, présente la plus forte constante de complexation avec l'oxine ce qui entraîne la présence dominante de l'espèce $Cu(oxine)_2$ sur une large gamme de pH (5 à 12). Pour les autres métaux, $Me(oxine)^+$ est présent pour des pH entre 5 et 9 (maximum à pH = 7) et $Me(oxine)_2$ présent à des pH entre 6 et 10 (maximum à pH = 9). Les espèces inorganiques dominent à pH inférieur à 5 (ion libre) et supérieur à 11 (complexes avec les carbonates).

La comparaison des diagrammes de spéciation en fonction du pH dans le milieu du biotest algal (milieu AAP_m) et dans l'eau pure ne montrent pas de différences significatives (*cf.* présentation de la totalité des diagrammes en annexe 1). La faible force ionique (I = 0.001 mol/L) est insuffisante pour avoir une influence. D'autre part, dans le milieu du biotest bactérien (20 g/L de NaCl, correspondant à I = 0.3mol/L et $[Cl^-]$ = 34 mmol/L), les complexes inorganiques avec les ions chlorures sont significatifs à pH acide, ce qui entraîne une baisse des concentrations en ion libre et en complexes MeL^+. Cependant, les concentrations en complexe MeL_2 sont inchangées.

Les résultats ont été obtenus pour des concentrations en métaux de 1 µmol/L et en ligand de 2.2 µmol/L, pour des pH de 4 à 14. Le premier paramètre à considérer pour l'interprétation est la valeur des constantes d'acidité (pKa_n) des ligands oxine et DDC (Tableau 10, page 52).

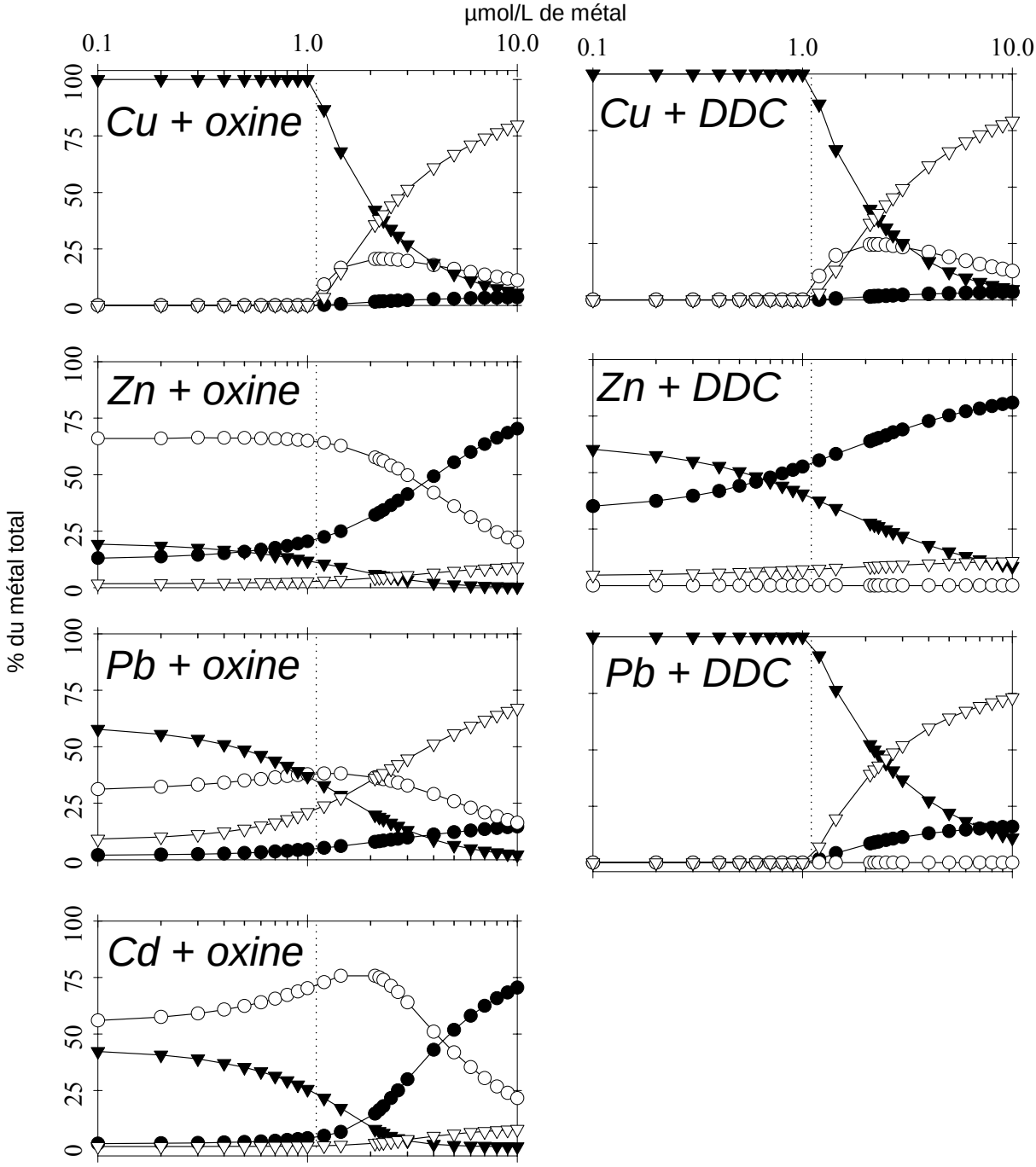
♦ *Étude de l'influence de la concentration en métal total*

L'influence de la concentration en métal total (de 0.1 à 10 µmol/L) pour une concentration donnée de ligand (2.2 µmol/L) est illustrée, dans le milieu AAP_m, par la figure 21.

Ces résultats montrent une présence significative des complexes MeL_2 à une concentration en métal total [Me]t < ½[L]t : espèce majoritaire (> 99 % du métal total) pour les mélanges cuivre-oxine, cuivre-DDC et Pb-DDC, et de 20 % à 50 % du métal total pour les autres mélanges.

Quand les concentrations en métal total [Me]t > ½[L]t, les concentrations en complexe MeL_2 décroissent (sauf pour le mélange Pb-DDC), avec une augmentation du complexe MeL^+ (pour tous les métaux avec l'oxine, et pour le cuivre avec le DDC) et des complexes inorganiques (complexes avec les hydroxydes pour le cuivre et le zinc, avec les carbonates pour le cadmium et le plomb). Dans le milieu pour le bioessai bactérien, la forte force ionique favorise la formation de complexes inorganiques et décroît les concentrations en ion libre et

en complexes avec les ligands organiques, sauf pour le cuivre (avec oxine et DDC) et le plomb (avec le DDC).



Me^{++} (●), MeL^{+} (○), MeL_2 (▼), complexes inorganiques (▽).

Figure 21 : Diagrammes de spéciation avec [Me] = 0.1 à 10 µmol/L. Calculs dans le milieu du biotest algal, AAP_m (pH = 7.5, I = 0.001 mol/L), avec [L] = 2.2 µmol/L.

Ces résultats s'expliquent clairement au regard des constantes conditionnelles de complexation dans les milieux des biotests (Tableau 10, page 52). Pour le DDC, $Log\,\beta'_{alg}$ pour le milieu AAP_m (biotest algal) et $Log\,\beta'_{bact}$ pour le NaCl 20 g/L (biotest bactérien) ne changent pas significativement des constantes de complexation $Log\,\beta$. Par contre, $Log\,\beta'_{bact}$ pour la complexation du zinc, du cadmium et du plomb avec l'oxine sont très inférieurs (environ 1/3) aux $Log\,\beta$ correspondants, du fait de la formation de complexes avec les chlorures. Les différences entre les constantes de complexation $Log\,\beta$ et les constantes conditionnelles $Log\,\beta'$ sont les plus faibles pour le cuivre, qui garde une forte affinité pour les ligands organiques dans les deux milieux. Au contraire, les différences sont les plus fortes pour le cadmium en milieu NaCl 2%, dû à la forte affinité de ce métal pour les chlorures.

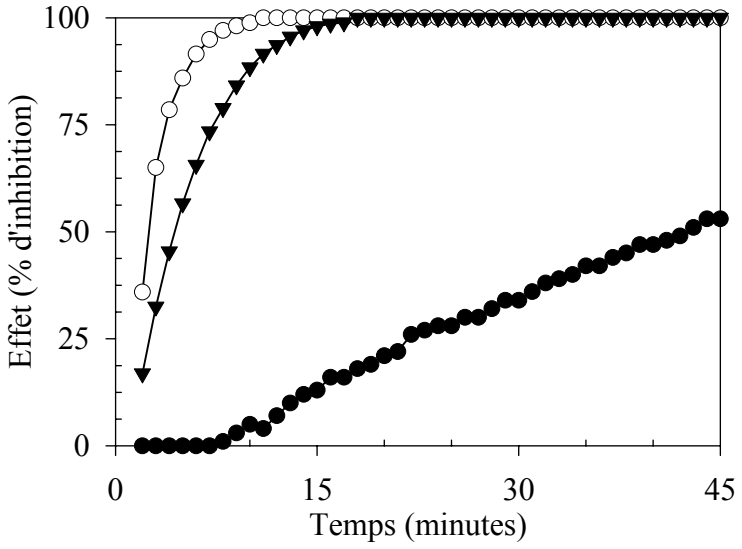
Les résultats issus des calculs de spéciation chimique montrent que, excepté pour le cuivre, les mélanges entre métaux et ligands lipophiles (oxine ou DDC) ne permettent pas d'effectuer les biotests avec la seule présence d'une espèce toxique (ion libre, MeL^+ ou MeL^2). Par conséquent, les résultats de toxicité seront interprétés en fonction des concentrations en ion libre, en complexes inorganiques et complexes lipophiles des métaux.

3.3.1.b Résultats de toxicité

Les résultats de toxicité ont été mis en relation avec la spéciation chimique calculée dans les milieux des bioessais. Ils ont été obtenus avec 1 µmol/L d'oxine ou de DDC dans le milieu, et un ajout de métal suffisant pour calculer les CE_{50} et TE_{50}. Pour les deux organismes, aucun effet toxique n'a été observé en présence d'oxine ou de DDC (jusqu'à 10 µmol/L) en absence de métaux.

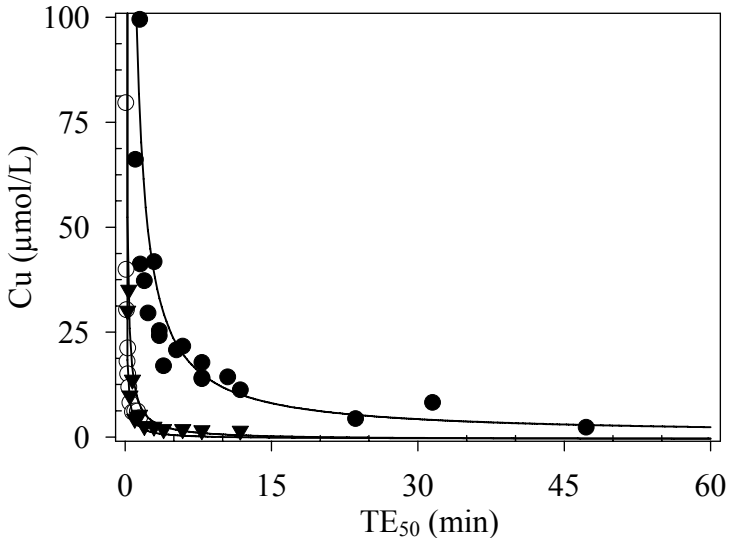
♦ *Vibrio fischeri*

Les effets aigus sur la bactérie marine *Vibrio fischeri* (inhibition de la bioluminescence) ont été mesurés chaque minute pendant 45 min. La présence de ligands (oxine ou DDC) entraîne une augmentation de la toxicité à un temps donné (ex. : CE_{50} 15min du cuivre = 9.1 ± 1.2 sans ligand ; 0.45 ± 0.2 avec oxine et 0.24 ± 0.16 avec DDC) mais influence aussi le temps nécessaire pour l'observation des effets. Une illustration en est donnée pour le cuivre ([Cu]t = 2.86 µmol/L) en figure 22. Ces résultats ont permis de calculer les TE_{50} (temps nécessaires pour atteindre 50% d'inhibition de la bioluminescence) pour chaque concentration en métal testée (Figure 23).



Résultats dans le milieu standard NaCl 20 g/L (●), avec oxine 1 µmol/L (○) et avec DDC 1 µmol/L (▼).

Figure 22 : Influence de la présence d'oxine et de DDC sur l'effet du cuivre sur la bactérie *Vibrio fischeri,* entre 2 et 45 min. Inhibition de la bioluminescence à [Cu]t = 2.86 µmol/L.



Résultats dans le milieu standard NaCl20 g/L (●), avec oxine 1 µmol/L (○) et avec DDC 1 µmol/L (▼).

Figure 23 : Influence de la présence d'oxine et de DDC sur l'effet du cuivre sur la bactérie *Vibrio fischeri,* entre 2 et 45 min. Régression inverse du premier ordre des concentrations totales en cuivre en fonction du TE_{50}.

Cette représentation permet de mettre en évidence une relation inverse de premier ordre, exprimé par l'équation 5:

Équation 5 : Relation entre la concentration d'exposition en métal total dissous et le TE_{50} pour la bactérie marine *Vibrio fischeri.*

$$C = C_0 + \alpha / TE50$$

Dans cette équation, C_0 (en µmol/L de métal total dissous) correspond au niveau de tolérance des bactéries sous lequel aucun effet n'est observé sur 45min, et α (min.L.µmol^{-1}) est une expression du temps nécessaire pour obtenir 50 % d'effet à une concentration totale en cuivre donnée. Les valeurs des paramètres de régression obtenues pour les différents mélanges de métal et de ligand sont présentées dans le tableau 16.

Métal +ligand	Paramètres de la régression inverse de premier ordre: α (min.L.µmol^{-1})	C_0 (µmol/L)	r²
Cu	114.43 (***)	0.45	0.882
+ oxine	6.77 (***) d	-0.13	0.903
+ DDC	12.42 (***) d	-0.63	0.803
Zn	223.67 (***)	-2.16	0.815
+ oxine	150.65 (***) d	-3.15	0.924
+ DDC	134.93 (***) d	-2.26	0.975
Cd	1 008.40 (***)	-2.34	0.998
+ oxine	1 100.56 (***) d	-12.92 (**) d	0.993
+ DDC	524.27 (*) d	-47.83 d	0.530
Pb	13.84	-0.23	0.742
+ oxine	12.93 (**)	-0.18	0.885
+ DDC	4.08 (***) d	-0.23	0.948

*Entre parenthèses, les coefficients significativement différents de 0 sont marqués par *** (P = 0.0001), ** (P = 0.001) ou * (P = 0.05). Il est aussi indiqué si les coefficients obtenus en présence de ligands sont significativement différents (d) des coefficients sans ligand (2×écart-type).*

Tableau 16 : Toxicité des métaux pour la bactérie marine *Vibrio fischeri* (I = 0.3mol/L ; pH = 5.5) sans ligand et avec 1 µmol/L d'oxine ou de DDC.

Aucun des C_0 n'est significativement différent de 0, sauf pour le mélange cadmium-oxine. Pour ce dernier mélange, α est significativement différent de la valeur de α pour le cadmium sans ligand. Cela indique que l'oxine diminue l'effet du cadmium sur *Vibrio fischeri* (toxicité et vitesse d'apparition de la toxicité), ce qui est certainement dû à la formation de $Cd(oxine)^+$.

De plus, les effets toxiques sont influencés par l'importante complexation du cadmium avec les chlorures. Pour les autres mélanges métal-ligand, α est plus faible en présence de ligand lipophile (statistiquement différent des expériences sans ligands pour tous les métaux, sauf pour le mélange plomb-oxine). L'effet est le plus marqué pour le cuivre, en accord avec sa forte affinité pour les ligands organiques.

♦ *Pseudokirchneriella subcapitata*

Pour l'algue, la toxicité (inhibition de la fluorescence de la chlorophylle) a été testée en 1h pour les effets aigus, et en 72h pour illustrer la toxicité chronique des CLM. Les résultats sont reportés dans le tableau 17.

Métal + Ligand	CE_{50} (µmol/L de métal total) 1 heure	72 heures
Cu	31 (20-47)	0.20 (0.19-0.21)
+ oxine	47 (30-74)	0.30 (0.27-0.35)*
+ DDC	11 (7-19)*	0.82 (0.34-1.07)*
Zn	63 (39-95)	0.40 (0.31-0.50)
+ oxine	66 (35-112)	1.13 (1.04-1.19)*
+ DDC	4 (2-8)*	0.19 (0.15-0.22)*
Cd	219 (89-585)	0.16 (0.13-0.20)
+ oxine	425 (154-533)	0.24 (0.20-0.30)*
+ DDC	32 (30-34)*	0.04 (0.03-0.04)*
Pb	61 (44-86)	2.53 (1.86-3.64)
+ oxine	120 (69-208)*	1.45 (1.13-1.86)*
+ DDC	32 (15-65)	0.06 (0.05-0.08)*

*Les CE_{50} sont données avec leur intervalle de confiance entre parenthèse (P = 0.05). * indique la différence significative des CE_{50} avec ligand lipophile par rapport aux expériences sans ligand (P = 0.05).*

Tableau 17 : Toxicité des métaux pour l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* dans le milieu AAP_m (I = 0.001 mol/L ; pH = 7.5) avec et sans ligand lipophile (1 µmol/L d'oxine ou de DDC).

L'oxine n'a pas augmenté la toxicité, et a même provoqué une augmentation significative de la CE_{50} pour le cuivre, le cadmium et le zinc (exposition chronique) et le plomb (exposition aiguë). Cependant, une augmentation des effets chroniques est observée pour le plomb (CE_{50} = 2.53 µmol/L sans ligand et 1.45 µmol/L avec oxine). Cette absence d'effet de l'oxine sur la toxicité a été attribuée à la faible solubilité des complexes $Me(oxine)_2$ en eau douce, entraînant une adsorption sur les parois des microplaques et une floculation. Ces phénomènes ont en effet été observés pour des concentrations en ligand proches de la limite de solubilité des complexes (10 µmol/L), et a pu être aussi significatif à des concentrations plus faibles (bien qu'il n'ait pas été observé lors des expériences avec 1µmol/L d'oxine).

La présence de DDC a eu un effet plus marqué sur la toxicité aiguë des métaux pour l'algue (augmentation significative de la toxicité pour tous les métaux, sauf pour le plomb). L'effet est maintenu sur 72 h pour le zinc et le cadmium, et devient significatif pour le plomb.

Finalement, on peut noter que les faibles solubilités des complexes en eau douce sont sans doute une limite à l'observation des effets des CLM pour l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*.

3.3.2 Discussion

Les résultats concernant la toxicité des CLM ont été obtenus pour quatre métaux (cuivre, zinc, plomb, cadmium) et deux ligands (oxine, DDC) pour deux bioessais (une bactérie marine et une algue d'eau douce). Ils ont été mis en relation avec la spéciation chimique calculée et ont montré les différences de comportement des métaux étudiés avec les ligands choisis. Bien que ces résultats aient été obtenus *in vitro*, ils ont servi de base à une discussion plus large concernant les possibilités d'utilisation des outils testés pour l'étude de l'importance des CLM en milieu naturel.

3.3.2.a Relations entre la toxicité et la spéciation chimique

Les résultats obtenus avec la bactérie marine ont donné des informations claires sur le temps d'exposition nécessaire à l'observation d'un effet (TE_{50}) en présence des CLM par rapport à l'ion libre. Cependant, les effets ont été accrus uniquement en présence de complexes de type MeL_2, alors qu'en présence de complexes de type MeL^+ la toxicité est diminuée. En effet, seuls les complexes neutres (de type MeL_2) sont lipophiles alors que les complexes chargés (MeL^+) peuvent être considérés comme non biodisponibles. La formation des CLM est par ailleurs dépendante non seulement des propriétés des molécules (constantes de complexation et solubilité), mais aussi de la composition du milieu (ex. : compétition avec les chlorures). La connaissance de la spéciation chimique est donc nécessaire pour attribuer les effets toxiques à l'ion libre et/ou aux CLM.

D'autre part, les différences d'effet des CLM en comparaison de l'effet de l'ion libre a été plus marqué pour la bactérie que sur l'algue. Ce comportement pourrait être lié aux différences métaboliques de ces deux organismes, ainsi qu'aux différences de spéciation chimique dans les deux milieux. Cependant les calculs de spéciation montrent que les concentrations en CLM sont plus élevées dans le milieu AAP_m du biotest algal que dans le NaCl 20 g/L utilisé pour le biotest bactérien, à cause de la force ionique et du pH. Ceci est en contradiction avec la toxicité observée. Une explication de la plus forte toxicité en eau salée pourrait être la plus forte lipophilie des complexes dans un milieu de force ionique élevée. En effet, Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 1998) ont mesuré que les constantes conditionnelles de partage entre l'eau et l'octanol (une évaluation de la lipophilie) pour les complexes du cuivre et du cadmium avec le DDC sont affectées par les concentrations en ligand, le pH et plus particulièrement la force ionique.

On peut donc conclure que les calculs de spéciation chimique donnent des informations complémentaires nécessaires pour expliquer la toxicité observée et l'attribuer à la présence d'ion libre et/ou de CLM. Cependant, ces informations ne sont pas suffisantes pour prévoir totalement les effets des CLM, qui sont aussi dépendantes de la lipophilie des complexes dans un milieu donné. Ce dernier point pourrait être pris en compte grâce aux K_{ow} des complexes, déterminés pour différentes conditions de pH et de force ionique.

3.3.2.b Comportement des métaux avec les ligands lipophiles étudiés

Les effets des deux ligands ont montré des différences suivant le métal considéré. Pour illustrer ce comportement, un rapport des effets avec l'oxine et le DDC a été calculé pour les deux biotests. Le rapport des α (α_{oxine} / α_{DDC}) a été calculé pour le test sur la bactérie et le rapport des CE_{50} chroniques (72 h) pour l'algue. Les valeurs des rapports sont présentées dans le tableau 18. Les effets, pour les deux bioessais, sont supérieurs avec l'oxine qu'avec le DDC pour le cuivre (rapport < 1) et inversement pour le cadmium (rapport >> 1). Les rapports pour le zinc et le plomb sont intermédiaires. Ce comportement est en accord avec la classification des métaux selon les principes de chimie de coordination (Figure 1, page 2), avec une préférence des métaux de type B (cadmium, plomb) pour les ligands à groupes thiol alors que le cuivre et le zinc (métaux de transition plus proches d'un comportement de type A) ont une préférence pour les ligands contenant des groupes carboxyliques ou amines. Les quatre métaux étudiés se classent du type A au type B dans le même ordre que les rapports d'effets oxine/DDC observés. Par exemple, les effets du cuivre sont plus important en présence du ligand comportant un site avec de l'oxygène et de l'azote (oxine) alors que les effets du cadmium sont plus importants en présence du ligand avec un groupe thiol (DDC). Cependant, les différences d'effet avec l'oxine et le DDC ne sont pas significatives (Tableaux 16 et 17) et la tendance observée nécessiterait d'être confirmée par des expériences supplémentaires.

Métal	Cu	Zn	Pb	Cd
Vibrio fischeri (α_{oxine} / α_{DDC})	0.54	1.12	2.10	3.17
Pseudokirchneriella subcapitata ($CE_{50\ ;\ oxine\ 72h}$ / $CE_{50\ ;\ DDC\ 72h}$)	0.4	5.9	6.1	24.2

Tableau 18 : Rapport de toxicité des métaux avec l'oxine et le DDC pour la bactérie *Vibrio fischeri* (rapport des α) et l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* (rapport des CE_{50} 72h).

3.3.2.c Utilité et limites des bioessais pour identifier l'effet des CLM dans l'environnement

Les résultats obtenus montrent la nécessité de lier la spéciation chimique des métaux avec la toxicité (ex. : présence de MeL_2, influence de la force ionique et du pH). L'usage de bioessais à exposition courte (1 min à 72 h) dans des milieux relativement simples nous a permis d'éviter des interférences dues au changement de pH et des carences nutritives. Dans une revue exhaustive, Stauber et Davis (2000) soulignent que les mesures ou calculs de la spéciation chimique sont des compléments nécessaires à l'évaluation de la biodisponibilité du cuivre par des bioessais, mais aussi que la limitation principale à cette approche reste la faible sensibilité des organismes généralement utilisés pour détecter des effets à des concentrations en ion libre réalistes vis-à-vis des concentrations environnementales. Nos résultats sont une illustration de ce problème. Concernant la toxicité des CLM, la sensibilité des bioessais est au moins 2 à 10 fois supérieure que pour l'ion libre, mais cela ne signifie pas que ces concentrations soient réalistes.

D'autre part, nous avons observé de faibles effets de l'oxine avec le bioessai algal, à cause de la faible solubilité du complexe et des pertes par adsorption. L'utilisation de plaques en quartz ou en verre est donc à conseiller pour ce type d'étude, comme le soulignent Gellert et Stommel (1999). La tendance des CLM à s'adsorber sur les surfaces indique aussi que dans l'environnement ce type de molécules est susceptible de s'adsorber sur les MES ou les sédiments. Or, les bioessais que nous avons utilisés sont principalement adaptés pour les études de toxicité des éléments dissous (Ronnpagel *et al.*, 1995), ou nécessitent une étape d'extraction aqueuse ou organique, qui est peu représentative des conditions environnementales. L'étude de la présence et des effets éventuels des CLM dans les compartiments solides des écosystèmes aquatiques nécessiterait d'autres bioessais tels que des organismes benthiques ou des poissons dont l'exposition par ingestion pourrait être prise en compte.

Enfin, on peut remarquer qu'un avantage de l'approche par bioessais est la réponse globale qu'ils permettent d'obtenir, prenant en compte les interactions de polluants multiples et des diverses molécules présentes. Cette approche est donc indispensable pour l'étude des CLM. Mais d'autre part, ces mêmes bioessais sont sensibles à un ensemble d'éléments toxiques, et la corrélation des effets avec les métaux dans un des échantillons complexes multicontaminés nécessiterait un ensemble de caractérisations chimiques sur l'ensemble des éléments toxiques présents, qu'il n'est pas toujours possible d'obtenir.

3.3.2.d Importance des CLM dans l'environnement

Une des conclusions tirées à partir des résultats sur la toxicité des CLM est que ces composés sont plus stables dans les eaux à forte force ionique (ex. : océans, estuaires) que dans les eaux douces, et qu'ils sont susceptibles de s'adsorber facilement sur les particules. Cependant, la présence dans l'environnement des CLM est nécessairement due à des apports anthropiques, et les eaux douces pourraient être plus contaminées que les océans, par effet de dilution.

Les molécules qui forment des complexes lipophiles neutres avec les métaux sont utilisés pour différentes activités humaines : activités industrielles (xanthates dans les agents de flotation, dithiocarbamates dans les lubrifiants à haute pression et les accélérateurs de vulcanisation), activités agricoles et forestières (fongicides de type dithiocarbamates et Cu-oxine) et produits pharmaceutiques (ex. : le Disulfiram, qui forme des dérivés de type DDC) (Phinney and Bruland, 1997a ; Burkitt *et al.*, 1998). Leur présence pourrait être importante dans des milieux contaminés par ces activités spécifiques où les ligands lipophiles sont utilisés conjointement avec les métaux, par exemple dans les bassins versants agricoles où les métaux comme le cuivre et le zinc et des CLM (Zinèbe, Ziram, Manèbe, Thiram, Disulfiram, Frebam…) sont utilisés comme fongicides.

La plupart des exceptions au FIAM reportées dans la littérature avec des complexes organiques sont liées à la formation de complexes neutres de type MeL_n, comme avec l'oxine et le DDC que nous avons utilisé (Campbell, 1995). La matière organique naturelle (MON) peut avoir différents effets sur ce type de CLM dans l'environnement. Il a été montré par exemple que la MON peut en augmenter la solubilité (et le transfert) et protéger les organismes contre la toxicité des CLM par adsorption (Florence and Stauber, 1986 ; Powell and Town, 1991 ; Fukushima *et al.*, 1994). D'autre part, la MON pourrait augmenter la biodisponibilité des métaux par d'autres mécanismes. Par exemple, certains ligands hydrophiles comme le citrate ou les acides aminés peuvent augmenter la biodisponibilité des métaux par un mécanisme de « transport accidentel » (Guy and Kean, 1980 ; Errecalde *et al.*, 1998). La biodisponibilité des métaux peut aussi être augmentée par la présence de substances humiques (Giesy, 1983 ; Winner, 1985) et de MON des eaux usées (Carlson-Ekvall and Morrison, 1995b). L'hypothèse d'un changement de perméabilité membranaires des organismes cibles dû à la présence de MON a été avancée pour expliquer ce phénomène (Parent *et al.*, 1996 ; Vignault *et al.*, 2000). Par conséquent, le rôle de la MON sur les CLM dans l'environnement est assez difficile à appréhender : du fait que la MON elle-même est la cause d'exceptions au FIAM, il semble difficile de faire la différence avec les CLM dans des eaux contenant une multitude de ligands organiques naturels et synthétiques.

3.3.3 Conclusion

Nous avons montré les effets des complexes lipophiles de quatre métaux (cuivre, zinc, cadmium et plomb) formés avec l'oxine et le diethyldithiocarbamate, avec un bioessai sur la bactérie marine *Vibrio fischeri* et sur l'algue d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata*. Le comportement des métaux avec les ligands a été en accord avec la chimie de coordination (métaux de type A ou B). Nous avons identifié des effets biologiques supérieurs lorsque les complexes neutres des métaux avec les ligands étaient présents, comme l'ont montré les calculs de spéciation chimique. Nous avons ainsi pu calculer des vitesses d'apparition de l'effet qui pourraient être utiles pour la modélisation de la toxicité des métaux. Cependant, la spécificité des effets métaboliques suivis et l'influence de la force ionique sur la lipophilie des complexes seraient à considérer plus en détail.

Ces résultats sont basés sur l'interprétation d'effets sur les organismes choisis, et devraient être confirmés par des mesures de bioaccumulation. Des résultats préliminaires obtenus par mesure de bioaccumulation de zinc radiomarqué en présence ou en absence de DDC vont dans ce sens (Obrist D, 2001 - Diplôme en préparation à l'Institut Forel, DESNE, Université de Genève).

Concernant la présence dans l'environnement des CLM, les études *in vitro* (incluant la présente étude) et les études de terrain reportées dans la littérature montrent qu'ils devraient être plutôt présent dans le compartiment sédimentaire des écosystèmes aquatiques, et aussi plus représentés dans les écosystèmes marins. D'autre part, le rôle de la matière organique est à clarifier.

Enfin, l'évaluation de la présence et de l'importance des CLM nécessite l'utilisation de méthodes analytiques adéquates pour l'identification des ligands lipophiles (ex. : extractions liquide/liquide ou SPE) en complément des analyses de spéciation chimique (ion libre et espèces inorganiques) et de la quantification des autres toxiques. Dans ce contexte, les bioessais que nous avons utilisé peuvent s'avérer utiles.

3.4 Conclusions générales du chapitre

L'objectif de ce chapitre était de mettre en relation la toxicité des métaux pour les micro-organismes évaluée par des biotests avec la spéciation chimique calculée par MINEQL+. Les résultats obtenus mettent en évidence qu'il est nécessaire de maîtriser la spéciation chimique pour une bonne caractérisation de la biodisponibilité des métaux pour les organismes aquatiques.

Concernant les tests utilisés, le test chronique d'inhibition de la croissance algale par mesure de fluorescence semble le plus adapté à l'étude des effets du cuivre, et permet de suivre l'évolution des effets entre 1 et 72 h. D'autres indicateurs (activité estérasique, intégrité membranaire) peuvent apporter une information complémentaire utile pour mieux identifier l'action des éléments toxiques dans les échantillons, et faire la part de la toxicité du cuivre par rapport aux autres contaminants. Cependant, la calibration des biotests pour d'autres toxiques que les métaux n'a pas été effectuée et les niveaux relatifs de sensibilité ne peuvent pas être connus *a priori*.

Le test d'inhibition de la bioluminescence de la bactérie marine est difficilement applicable en eau douce, en particulier pour tester l'effet des métaux. L'utilisation de sucrose pour l'ajustement osmotique du milieu augmente significativement la sensibilité du test pour les métaux étudiés, mais ne permet pas d'atteindre une sensibilité comparable au test algal. L'utilisation d'alternatives au chlorure de sodium est préconisé, en particulier pour l'étude des effets du cadmium.

La prise en compte de la spéciation chimique par le calcul des concentrations en ion libre ou de CLM a permis d'améliorer l'interprétation des résultats de toxicité par rapport aux

concentrations totales. Cependant, il ne nous a été permis de valider que partiellement les effets observés par rapport aux concentrations calculées, en particulier pour les autres métaux que le cuivre. Plusieurs paramètres entrent en compte, dont les approximations de MINEQL+ qui demanderaient à être vérifiées. D'autre part, un pré-requis fondamental pour l'application du FIAM est l'existence d'un pré-équilibre entre les métaux en solution et liés aux sites de transport à la surface des membranes biologiques. Les différences observées par rapport au FIAM dans les expériences de modification des milieux pour le biotest bactérien, l'effet indirect de l'EDTA dans le biotest algal, ainsi que l'effet des CLM pourraient être mieux modélisés par la prise en compte des cinétiques en relation avec la chimie de coordination des métaux (Hudson, 1998). Et dans cette optique, il serait concevable d'inclure l'effet de complexes avec par exemple des ligands inorganiques faibles (OH^-, Cl^-, CO_3^{2-}) afin d'inclure leur éventuelle part d'effet.

Enfin, nous avons montré les effets des complexes lipophiles de quatre métaux (cuivre, zinc, cadmium et plomb) formés avec l'oxine et le diethyldithiocarbamate, et pu observer des comportements en accord avec la chimie de coordination des métaux. Les cinétiques de toxicité très rapides des CLM ont été identifiées, et en cours de confirmation par des expériences de bioaccumulation. Leur rôle dans l'environnement reste cependant à confirmer.

Le chapitre suivant présente les résultats obtenus lors d'une étude de la toxicité des eaux de ruissellement viticoles en relation avec la spéciation et la biodisponibilité du cuivre. Les conclusions de l'étude méthodologique seront prises en compte pour la mise en œuvre des analyses et leur interprétation dans des échantillons complexes comme des eaux de ruissellement viticoles.

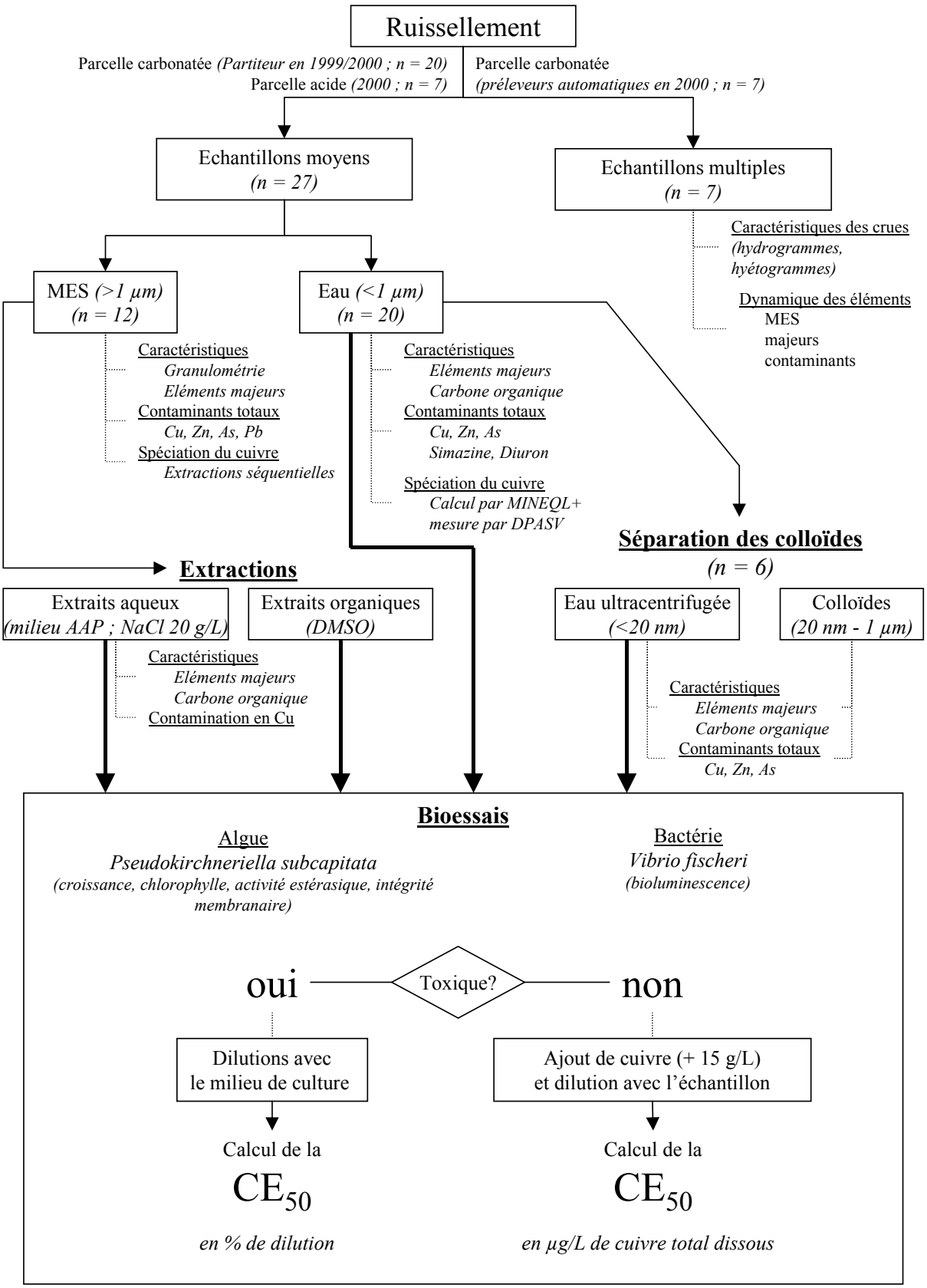


Figure 24 : Organigramme de l'analyse du ruissellement des parcelles viticoles.

CHAPITRE 4
ÉTUDE DES EAUX DE RUISSELLEMENT DE PARCELLES VITICOLES

L'objectif général de cette étude de terrain est de mettre en évidence les paramètres déterminant la contamination des eaux de ruissellement en cuivre (caractéristiques de la pluie, traitements phytosanitaires, type de sol…), et d'évaluer ses effets potentiels sur les organismes aquatiques en étudiant les facteurs contrôlant sa biodisponibilité (caractéristiques générales des eaux, ligands dissous, matières en suspension, colloïdes) en comparaison des autres contaminants présents dans les échantillons. Les résultats de spéciation chimique du cuivre et de toxicité observée seront discutés par rapport à la place du cuivre dans l'exposition des organismes aquatiques aux produits phytosanitaires exportés dans les eaux de ruissellement viticoles.

Afin de répondre à ces objectifs généraux, différentes informations ont été obtenues sur l'ensemble des prélèvements effectués. La démarche suivie est présentée en figure 23. Tout d'abord, rappelons que pour des raisons opérationnelles il n'a pas été possible d'échantillonner toutes les crues de la période d'étude de 18 mois (voir annexe 2) et d'effectuer l'ensemble des caractérisations proposées d'une manière systématique. L'objectif n'était pas ici de proposer un suivi systématique de l'ensemble des événements pluvieux. Il s'est agi plutôt de déterminer les points les plus pertinents concernant l'exposition des organismes aquatiques au cuivre apporté par les eaux de ruissellement de parcelles viticoles. Pour cela, différentes approches complémentaires ont été utilisées.

- Le premier objectif a été de déterminer quantitativement le ruissellement, sa relation avec la pluie et les volumes d'eau et de MES exportées hors des parcelles : les précipitations observées au cours de la période et le ruissellement associé (eau et MES) ont été étudiés pour la parcelle carbonatée, en 1999 et 2000 pour ce qui est des échantillons moyens du partiteur, et en 2000 pour les échantillons des préleveurs automatiques. Les données obtenues pour les moyennes des crues, ainsi que les informations plus précises apportées par les hydrogrammes de crues et hyétogrammes sont présentés dans le paragraphe 4.1.

- Ensuite, nous avons différencié la fraction dissoute et particulaire pour caractériser les niveaux de contamination, la spéciation et la biodisponibilité du cuivre dans les eaux de ruissellement et caractériser la toxicité des échantillons. Cette étude a été effectuée sur les échantillons moyens du partiteur de la parcelle à sol carbonaté en 1999 et 2000 afin d'étudier les variations saisonnières, et en 2000 sur les échantillons de la parcelle à sol acide afin d'étudier les différences entre les deux types de sol.
  - L'étude des MES est présentée au paragraphe 4.2. La caractérisation des MES est d'abord présentée (granulométrie, éléments majeurs constitutifs) puis les concentrations en métaux (Cu, Zn, As, Cd, Pb). Ces résultats seront mis en relation avec les résultats fournis par la spéciation par extractions séquentielles. Enfin, la toxicité des extraits aqueux et organiques sera présentée.
  - L'étude de la fraction dissoute est présentée au paragraphe 4.3. La caractérisation chimique générale des eaux est d'abord considérée (ions majeurs, métaux traces, carbone organique, pesticides dissous) en insistant sur les variations temporelles et spatiales (sol acide / sol carbonaté). Une étude de la spéciation du cuivre est ensuite proposée, avec d'une part un calcul de l'effet de la matrice inorganique par MINEQL+, d'autres part des mesures par DPASV, et enfin la détermination de la fraction colloïdale (>20 nm). En dernier lieu, la toxicité des échantillons sera présentée et discutée à la lumière des caractérisations chimiques effectuées.

Les biotests utilisés dans cette étude (détail des protocoles au chapitre Matériel et Méthodes) sont considérés comme des indicateurs d'effet des contaminants, et en particulier de la toxicité du cuivre. C'est pourquoi les résultats sont mis en parallèle avec les données chimiques. Pour les échantillons dont une toxicité a pu être observée, les CE_{50} (en % de dilution) ont été calculées à partit de dilutions en série dans le milieu de culture. Pour les échantillons non toxiques, un ajout de cuivre de 15 mg/L (ajout de 15 µL/mL d'une solution stock de $CuSO_4$ à 1 g/L de cuivre) a été effectué dans l'échantillon, et 16 dilutions séquentielles (facteur de dilution de 2) effectuées avec l'échantillon lui-même afin d'évaluer la capacité « tampon » protectrice de la toxicité du cuivre. La CE_{50} est alors exprimée en µg/L de cuivre (présent dans l'échantillon + ajouté).

4.1 Caractérisation du ruissellement sur la parcelle sur sol carbonaté

Il est dans un premier temps important de caractériser quantitativement le ruissellement, c'est à dire de connaître les quantités d'eau et de MES qui sont exportées des parcelles viticoles. Les données de pluie et de ruissellement (eau et MES) mesurés de janvier 1999 à juillet 2000 sur la parcelle sur sol carbonaté sont présentés en figures 24 à 26 (données en annexe 3).

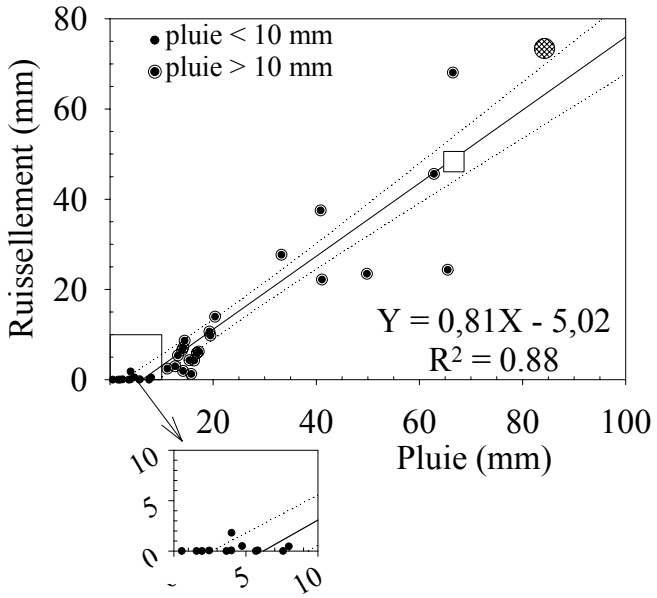
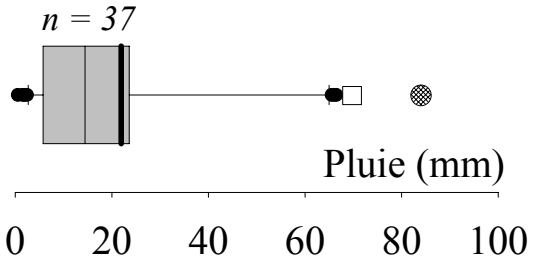


Figure 25 : *Relation entre la pluie et le ruissellement à l'exutoire de la parcelle sur sol carbonaté.*



voir signification des « boxplots » en figure 14, page 62.

Figure 26 : *Répartition en « boxplot » des événement pluvieux de la période d'étude selon le volume de pluie.*

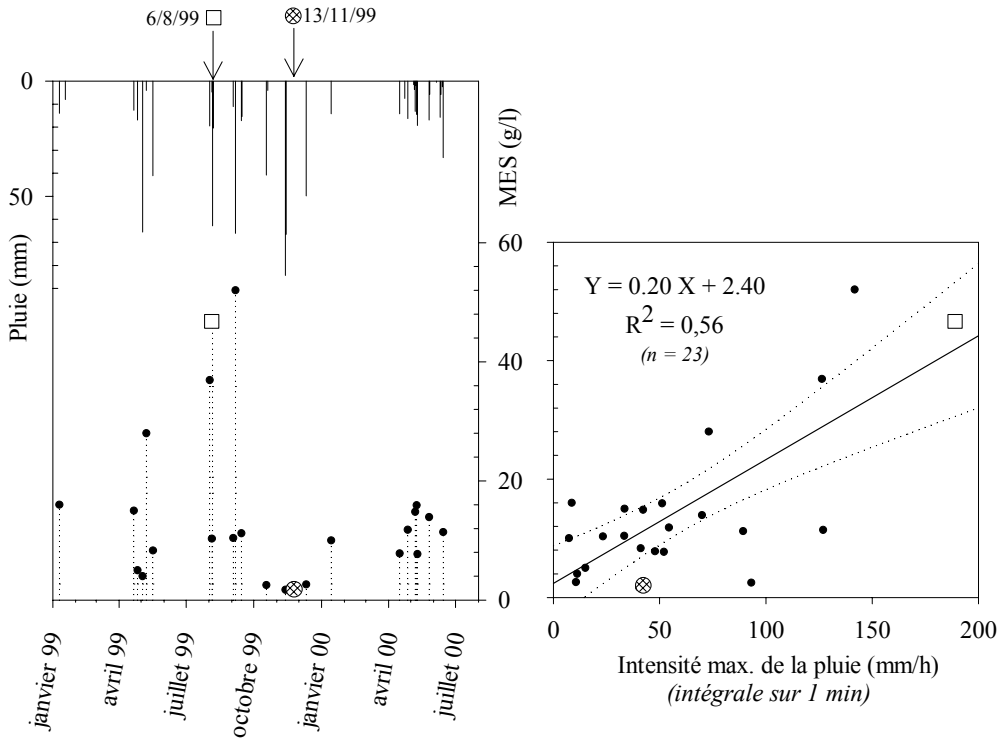


Figure 27 : Pluie de janvier 1999 à juillet 2000, et concentrations moyenne en MES dans les eaux de ruissellement à l'exutoire de la parcelle sur sol carbonaté. Corrélation avec l'intensité maximale de la pluie pour chaque événement pluvieux.

La crue du 6 août 1999 (notée □) et celle du 13 novembre 1999 (notée ⊗) sont prises comme exemple pour la présentation des résultats.

Rappelons tout d'abord que le ruissellement, consécutif aux précipitations météoriques, est spécifique de plusieurs facteurs comme le climat (dans le cas présent, méditerranéen subhumide), l'état du sol et la pente de la parcelle considérée : dans le cas de la parcelle sur sol carbonaté, le sol n'est pas travaillé et comporte tout au long de l'année une croûte propice au ruissellement. La pente y est forte, de 6 à 19 %. La possibilité d'extrapolation à une situation générale est difficile : la parcelle d'étude fait figure d'un cas particulièrement propice au ruissellement de surface au sein du bassin versant.

Tout d'abord, considérons l'ensemble des événements pluvieux recensés en 1999 et au premier semestre 2000 : sur les 37 événements répertoriés, 75 % des événements ne représentent que 35% des précipitations de la période (281 mm), avec des volumes de précipitation pour chaque événement inférieure à 20.4 mm (Figure 26). Les 25% d'événements restant (neuf événements) représentent 65 % de la pluie (soit 529 mm) et près de 79 % du volume de ruissellement (soit 371 mm), avec en particulier la période du 12 au 14 novembre 1999 qui représente à elle seule plus du quart des précipitations (et plus du tiers du ruissellement) sur la période de 18 mois. Cette répartition des pluies est caractéristique du climat connu dans la région du Languedoc-Roussillon, avec de fortes précipitations en automne et au printemps, entrecoupées de longues périodes sèches et quelques orages isolés parfois violents.

Dans un second temps, il a été possible de vérifier que la pluie et le ruissellement sont fortement corrélés (Figure 25), avec cependant une nuance : les événements pluvieux inférieurs à 10 mm ne sont pas significatifs du point de vue du ruissellement. Le coefficient de ruissellement total sur la période considéré est de 58 %, ce qui correspond à une lame ruisselée de 471 mm pour des précipitations de 811 mm (625 mm pour l'année 1999, et 187 mm pour le premier semestre 2000). Cette moyenne est à pondérer selon l'événement pluvieux considéré : il est toujours inférieur à 10% pour les pluies inférieures à 10 mm, alors qu'il peut atteindre 100 % pour les pluies les plus conséquentes (moyenne de 72% pour les pluies supérieures à 20.4 mm, le 75ème percentile).

Un autre paramètre à considérer est l'intensité de la pluie. Considérons les deux crues prises comme exemple, toutes deux conséquentes en terme de pluie et de ruissellement : la crue du 6 août 1999 et celle du 13 novembre 1999. La pluie lors de ces deux événements a été respectivement de 62.8 mm et 84.3 mm, avec un ruissellement de 45.6 mm (coefficient de ruissellement CR = 72.6%) et 73.5 mm (CR = 87.2%). Si ces deux événements pluvieux sont comparables quant au volume d'eau considéré, il n'en est pas de même pour les teneurs en MES associées : respectivement 52 g/L et 1.7 g/L, alors que la moyenne de concentration des MES se situe à 13.4 g/L de MES sur l'ensemble de la période d'étude. Cette différence est expliquée clairement par les intensités maximales des pluies (Imax à 1 min) pour les deux événements (Figure 27), respectivement de 190 mm/h et 40 mm/h. Un autre paramètre, lié, est la durée totale de la pluie qui est de 50 minutes le 6 août 1999, alors que les précipitations se répartissent sur 17 heures le 13 novembre 1999.

Plus généralement, on observe une corrélation positive entre l'intensité de la pluie et la concentration en MES (Figure 27). Cependant, la corrélation n'est pas parfaite ($r^2 = 0.52$) du fait que les mesures de MES sont des moyennes sur l'événement pluvieux entier, alors que l'intensité maximale est une donnée ponctuelle sur 1 min.

La corrélation entre l'intensité de la pluie et la concentration en MES est beaucoup plus forte lorsque l'on ne considère plus les concentrations moyennes de chaque crue, mais le détail des événements pluvieux. Par exemple, la crue du 16 avril 2000 (Figure 27, les autres crues sont présentées en annexe 11) montre qu'au cours du ruissellement, les concentrations en MES dans les eaux de ruissellement à l'exutoire de la parcelle sont étroitement liées. Le même type de comportement a été observé sur la plupart des crues, mais les corrélations entre l'intensité de la pluie, le débit du ruissellement et la concentration est cependant meilleure lors des événements courts et intenses comme celui du 16 avril 2000. Pour les pluies moins intenses et plus réparties dans le temps, la corrélation est moins marquée, bien que significative.

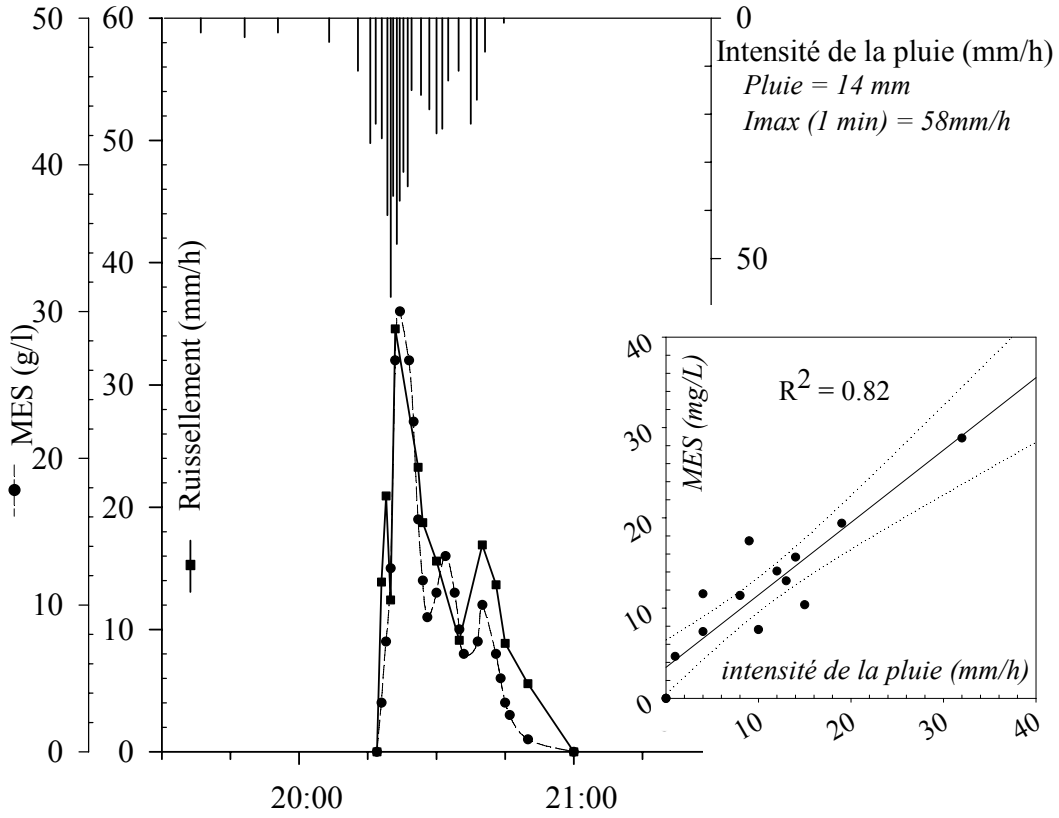


Figure 28 : Corrélation entre l'intensité de la pluie, le ruissellement et la teneur en MES des eaux de ruissellement à l'exutoire de la parcelle sur sol carbonaté. Exemple de la crue du 16 avril 2000.

Quelques événements pluvieux représentent donc quantitativement la majorité du volume ruisselé et des MES exportées à l'exutoire de la parcelle. Il est nécessaire de prendre en compte ces caractéristiques dans l'évaluation de l'exposition et de la toxicité liée à ces événements. En effet, les quelques crues majeures au cours d'une année sont susceptibles d'avoir un impact beaucoup plus conséquent que des volumes de ruissellement plus faibles, même si ces derniers s'avéraient toxiques.

4.2 MES et cuivre associé

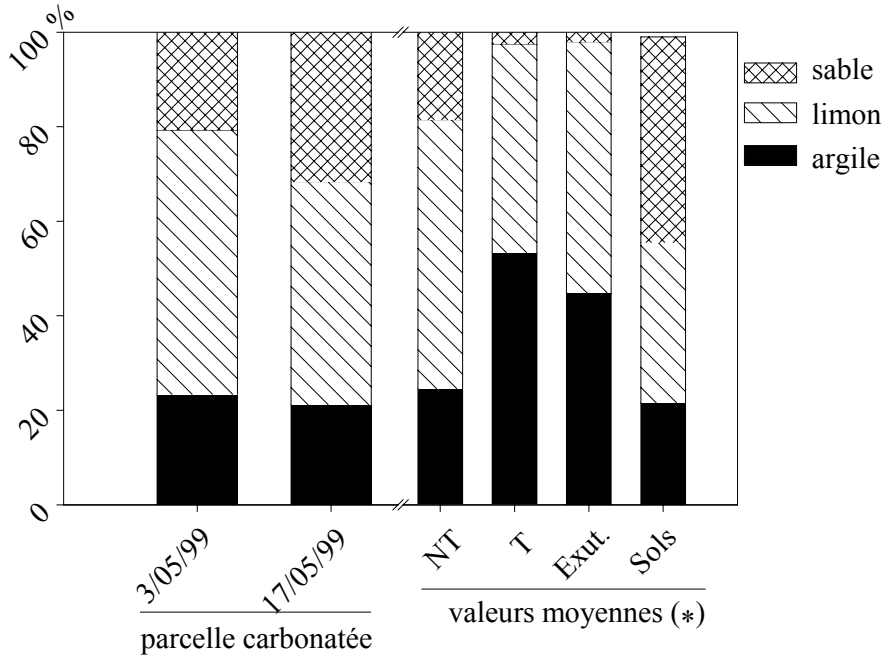
L'objectif de l'étude des MES, séparées des eaux de ruissellement par filtration (>1µm), est d'évaluer la mobilité du cuivre et son potentiel de libération dans la fraction dissoute. Nous présenterons dans un premier temps les caractéristiques physico-chimiques des MES échantillonnées (granulométrie, éléments majeurs, métaux traces), puis les informations apportées par la spéciation par extractions séquentielles. Enfin, les résultats des extractions douces (extraction aqueuse et extraction au DMSO) couplées aux biotests seront présentés et interprétés en termes de biodisponibilité et d'exposition potentielle des contaminants associés aux MES pour les organismes aquatiques.

4.2.1 Répartition granulométrique des MES

La granulométrie laser des MES des eaux de ruissellement est relativement stable, comme le montre la figure 28 sur l'exemple de deux crues en mai 1999. Pour information, nous avons représenté les résultats moyens d'analyses granulométriques des MES effectuées lors de précédentes études (Andrieux *et al.*, 1993 ; Coulouma, 1998) sur la même parcelle, au sol carbonaté non travaillé (NT), et sur une autre parcelle au sol carbonaté travaillé (T), ainsi qu'à l'exutoire du bassin versant et dans les sols.

Les résultats confirment que la texture des MES est majoritairement argilo-limoneuse (Limon fin – Argile). Pour la parcelle étudiée, les argiles sont moins présents que, par exemple, sur le même type de sol travaillé. Cependant, les différences sont faibles entre les sols, les MES à l'issue des parcelles et les MES à l'exutoire du bassin versant.

Par ailleurs, les résultats montrent une différence (non significative) entre les deux crues de mai 1999 prises comme exemple : les sables sont plus présents, et par conséquents les argiles et limons moins présents dans les MES de la crue du 17 mai 1999 que dans celles du 3 mai 1999. Cette différence pourrait être attribuée à la pluie plus intense le 17 mai que le 3 mai ($Imax_{1min}$ = 42 et 11 mm/h, respectivement), les différences d'intensité entraînant une légère ségrégation des particules. Cependant, la tendance demanderait à être confirmée par une étude plus systématique.

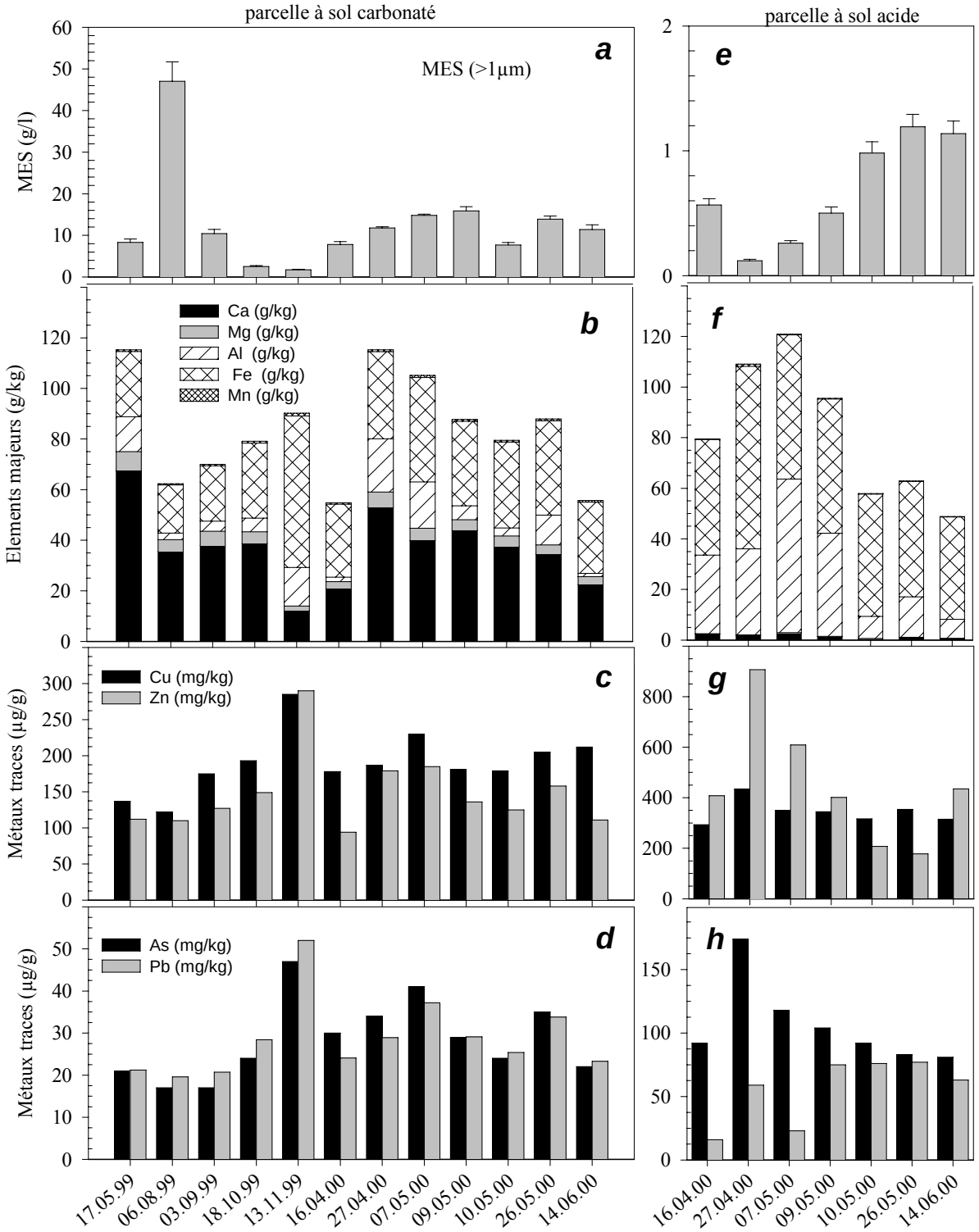


(*) moyenne de la répartition granulométrique des MES sur 3 crues à l'exutoire de la parcelle carbonatée « non travaillée » (NT) et « travaillée » (T), ainsi qu'à l'exutoire (Exut.) du bassin versant (Coulouma, 1998) ; moyenne de la répartition granulométrique des sols du bassin versant sur 56 prélèvements en 1992 sur l'ensemble du bassin versant (Andrieux et al., 1993).

Figure 29 : Répartition granulométrique des MES dans les eaux de ruissellement à l'exutoire de la parcelle carbonatée. Comparaison avec d'autres analyses de MES et de sols sur le bassin versant.

Enfin, il n'a pas été possible de déterminer la granulométrie des MES prélevés sur la parcelle sur sol acide. Le mode de prélèvement ponctuel n'a pas permis d'échantillonner suffisamment de matériel (MES < 1g/L). Un examen visuel du sol et des MES de cette parcelle a montré cependant que celles-ci sont de couleur rouge-jaune (en accord avec le sol formé de dépôts continentaux caillouteux rouges), alors qu'elles sont plutôt brun-jaune sur les versants en terrasses où est située la parcelle sur sol carbonaté (affleurements calcaires). Une autre caractéristique des prélèvements issus de cette parcelle est l'abondance des débris végétaux (>200µm) dans les eaux de ruissellement, provenant des résidus de la taille (sarments) laissés à la surface du sol par l'agriculteur.

Les principales variations dans la texture des MES ne sont donc pas observées à l'exutoire d'une même parcelle, mais principalement entre les différentes parcelles du bassin versant. Une étude plus précise de la minéralogie des MES (Coulouma, 1998) a confirmé cette différence entre les unités morpho-pédologiques. La dolomite est absente sur le plateau alors qu'elle est plus présente sur les terrasses (formations calcaires). Au contraire, le plateau à sol rouge devrait fournir des MES à teneur en hydroxydes de fer supérieure aux MES provenant des versants.



a,e : moyenne sur 3 réplicats (P=0.05) ; b,c,d et f,g,h : moyenne sur 5 réplicats (+-/ 5% ; P=0.05)
voir données brutes en annexe 6

Figure 30 : Caractéristiques des MES à l'exutoire de la parcelle carbonatée et des MES prélevées sur la parcelle acide.

4.2.2 Éléments majeurs constitutifs des MES

Les concentrations en calcium, magnésium, aluminium, fer et manganèse dans les MES échantillonnés à l'exutoire de la parcelle sur sol carbonaté sont présentées en figure 30b. Les concentrations moyennes sont de 37.1 g/kg pour le calcium, de 4.3 g/kg pour le magnésium, de 12.7 g/kg pour l'aluminium, de 32.8 g/kg pour le fer et de 0.7 g/kg pour le manganèse. L'élément majoritaire est le calcium, ce qui est en accord avec le sol carbonaté de la parcelle. Les concentrations en magnésium et en calcium sont fortement corrélées ($r=0.94$, $P<0.01$). On observe par ailleurs des variations dans le contenu en éléments majeurs des MES, en particulier pour le calcium (12.2 à 67.6 g/kg) et le fer (19 à 59.9 g/kg).

Deux cas particuliers sont à noter. D'une part la concentration la plus élevée en fer - et la concentration en calcium la plus faible - est observée lors de la crue du 13 novembre 1999, qui comme nous l'avons présenté précédemment est une crue de faible intensité particulièrement longue. D'autre par, la situation inverse est observée (concentrations élevées en calcium et faibles concentrations en fer) lors des crues plus intenses (ex. : crue du 6 août 1999, $Imax_{1\ min} = 190$ mm/h). Il semble donc que les caractéristiques de la pluie soient à l'origine d'une ségrégation des particules exportées de la parcelle, comme nous l'avons montré par l'analyse granulométrique, mais aussi que les MES sont plus concentrées en fer et en aluminium lors des crues longues et peu intenses, ou en calcium lors des orages courts et intenses. Ces deux éléments confortent l'hypothèse d'un un entraînement de particules plus fines (des argiles à teneur en fer et aluminium plus élevées) lors des événements pluvieux de faible intensité.

Par comparaison, les MES issues de la parcelle sur sol acide (Figure 30f) ont des concentrations en fer plus fortes (40 à 72 g/kg) et en calcium plus faibles (0.5 à 2.8 g/kg), ce qui est lié au type de sol de la parcelle. Mais surtout, les concentrations en MES sont beaucoup plus faibles que dans les prélèvements de la parcelle carbonatée (0.5 à 1.2 g/L), ce qui est dû à la fois au type de prélèvement (ponctuel), à l'état du sol et à la pente plus faible que sur la parcelle à sol carbonaté.

La nature des MES dépend des caractéristiques des sols qui en sont l'origine. Les caractéristiques des MES provenant des deux parcelles étudiées diffèrent principalement par leur contenu en fer et calcium, ainsi que par leur répartition granulométrique.
L'intensité de la pluie a une influence sur la composition des MES (granulométrie, éléments majeurs), les événements les plus intenses exportant certainement du matériel de plus grosse taille (sable) et de nature moins argileuse (moins de fer et d'aluminium) que les événements de faible intensité. Cependant, l'intensité de la pluie détermine surtout les quantités de matière exportées lors de chaque événement pluvieux.

4.2.3 Métaux traces dans les MES

Les concentrations en métaux traces dans les MES de la parcelle sur sol carbonaté sont présenté en figure 30c-d. Elles sont en moyenne de 188 µg/g (122 à 285 µg/g) pour le cuivre, de 154 µg/g (94 à 320 µg/g) pour le zinc, de 28 µg/g (17 à 47 µg/g) pour l'arsenic, de 29 µg/g (20 à 52 µg/g) pour le plomb et toujours inférieures à la limite de détection (0.1 µg/g) pour le cadmium et pour l'argent. Les variations de concentration entre les crues sont peu importantes, mais on peut noter que les concentrations maximales sont atteintes, pour tous les métaux, lors de la crue du 13 novembre 1999. Les MES de cette crue comportent par ailleurs des concentrations en fer importantes (voir plus haut). Plus généralement, on peut observer une bonne corrélation entre les concentrations en fer et les concentrations en métaux traces : la corrélation du fer et du Cu, Zn, As et Pb ($r=0.89$, 0.91, 0.92 et 0.97 respectivement) est très significative ($P<0.01$).

Dans les MES prélevés sur la parcelle acide (Figure 30g-h), les concentrations sont en moyenne de 344 µg/g (293 à 434 µg/g) pour le cuivre, de 449 µg/g (178 à 907 µg/g) pour le zinc, de 106 µg/g (81 à 174 µg/g) pour l'arsenic, de 56 µg/g (16 à 77 µg/g) pour le plomb et toujours inférieures à la limite de détection (0.1 µg/g) pour le cadmium et pour l'argent. Il n'a pas été possible sur cette parcelle de lier la quantité de MES à l'intensité de pluie, ni d'effectuer d'analyse granulométrique. On remarque cependant la même corrélation des concentration en métaux traces avec le fer.

Les concentrations totales en métaux traces dans les MES donnent peu d'information quant à leur mobilité et leur biodisponibilité potentielle. Une première information peut être apportée par des extractions séquentielles.

4.2.4 Spéciation du cuivre dans les MES

La figure 31 présente les résultats de l'extraction séquentielle des MES issues de la parcelle carbonatée, avec pour comparaison les résultats obtenus sur les sols de la même parcelle, les sédiments de la rivière Peyne en aval du bassin versant et les sédiments d'une rivière proche du site d'étude soumise à une pollution urbaine.

La fraction oxydable du cuivre est la plus significative pour tous les points analysés. Elle est la plus forte dans le sédiment de référence (non contaminé), où elle atteint 95%. Ce comportement général est à mettre en relation avec la forte affinité connue du cuivre pour la matière organique, tant pour la matière organique d'origine naturelle que pour celle d'origine anthropique.

Les MES et sols de la parcelle à sol carbonaté ont des proportions relativement importantes en cuivre oxydable (50% ± 10%), malgré la faible teneur en matière organique des sols de la parcelle (<3%). Ces résultats sont en accord avec de précédentes études sur le bassin versant (Ribolzi, 1996). D'autre part, dans les sols, la fraction acido-soluble est présente (14 à

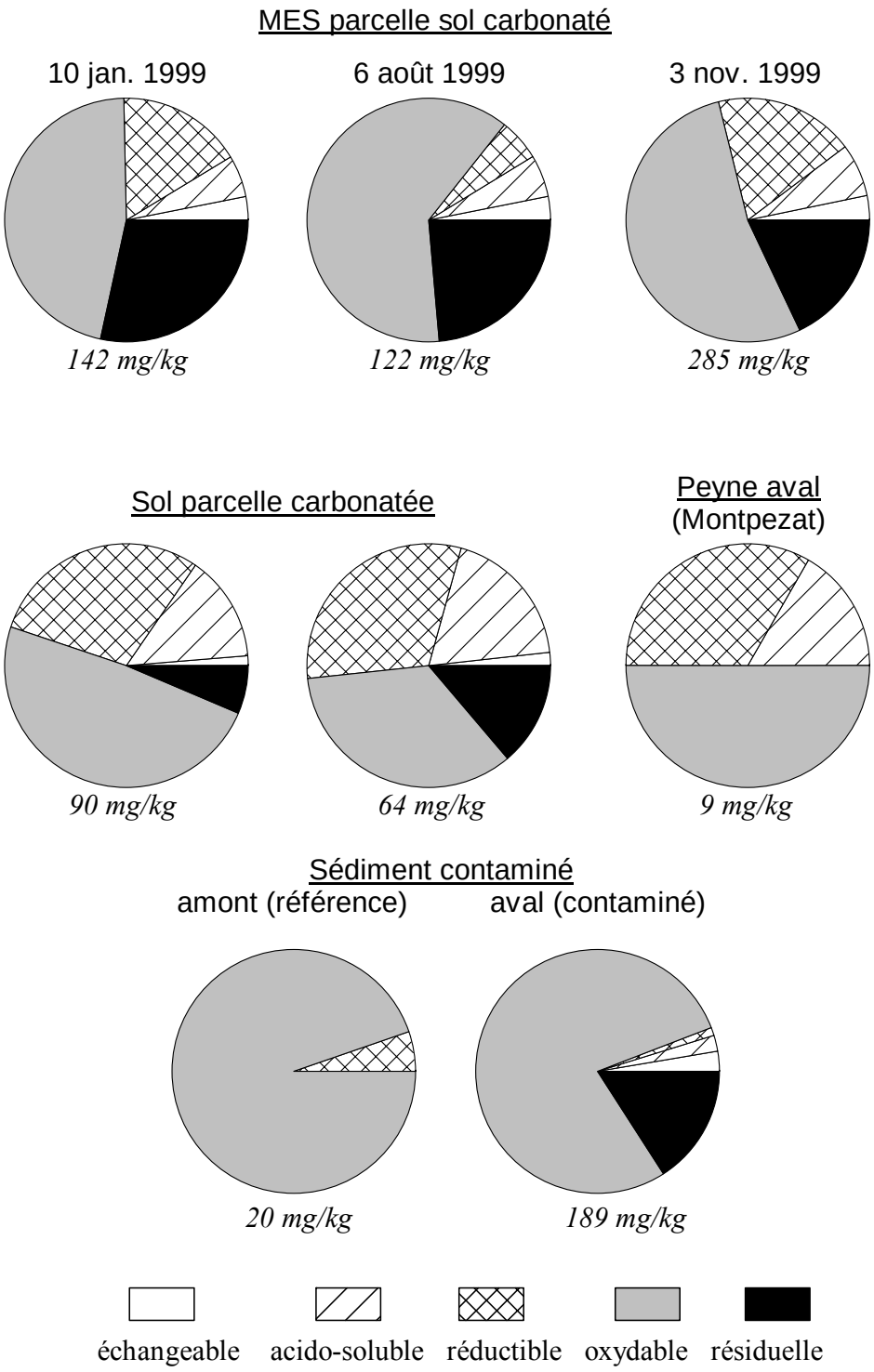


Figure 31 : Spéciation des formes du Cu (crue 1/5/99) suivant le schéma d'extractions séquentielles de Tessier (Tessier *et al.*, 1979).

19%) alors que c'est une fraction minoritaire des MES (<9%). La fraction réductible est aussi présente avec 30% de cuivre associé. Enfin, dans les MES comme dans les sols, la fraction échangeable est faible (1 à 5%).

Concernant les sédiments de la Peyne, la fraction oxydable est comparable à celle observée sur le bassin versant de Roujan, et la principale différence notable est l'absence de cuivre résiduel.

Les informations apportées par ce type d'analyses doivent être interprétées avec précaution. En effet, rappelons que la définition des fractions est opérationnelle et que l'efficacité de l'extraction est difficilement contrôlable, comme le montrent les variations de la fraction résiduelle. Nous en resterons donc aux points majeurs qui ressortent des analyses effectuées :

- La fraction échangeable est peu présente, que ce soit dans les MES ou les sols de la parcelle à sol carbonaté ;
- La fraction oxydable est importante dans les sols comme dans les MES, ce qui illustre l'importance de la matière organique comme ligand du cuivre ;
- La fraction réductible est plus importante dans les sols que dans les MES. D'autre part, la tendance est à l'augmentation de cette fraction dans les crues peu intenses (ex. : 3 novembre 1999) par rapport aux crues plus intenses (ex. : 6 août 1999) où c'est la fraction oxydable qui augmente. Ce comportement est en accord avec les analyses granulométriques et de fer précédentes.

La contamination des MES en métaux traces est surtout significative pour le cuivre et le zinc, avec des concentrations supérieures à 100 µg/g. Cependant, le cuivre particulaire apparaît comme étant peu échangeable avec la fraction dissoute.
Des variations sont observées en fonction de l'intensité de la pluie, qui a une influence sur la taille et la nature (contenu en fer) des particules exportées, avec une tendance à l'augmentation des métaux traces dans les particules fines et la fraction réductible. Cependant la relation entre les teneurs en cuivre et la partie argileuse des MES sur la parcelle à sol carbonaté n'a pu être établie (Coulouma, 1998), contrairement à d'autres métaux (ex. : zinc). Ces résultats tendraient à confirmer l'influence des molécules organiques plutôt que de l'argile sur l'incorporation du cuivre aux particules. Ce point serait à confirmer par des analyses de répartition granulométrique plus précises et systématiques et une caractérisation de la matière organique particulaire.
L'effet de l'intensité de pluie reste cependant principalement quantitatif. Par exemple, même si les MES sont plus concentrées en métaux traces lors de l'événement du 13 novembre 1999 (285 µg/g de Cu) que celui du 6 août 1999 (122 µg/g de Cu), les quantités de cuivre particulaire exporté de la parcelle à sol carbonaté sont respectivement de 4.3 et 31.4 grammes de cuivre. Cependant les différences de nature des particules (et de concentration en métaux traces) lors des événements peu intenses et très intenses pourraient être importantes à prendre en compte dans le cadre d'une évaluation plus globale des transferts de contaminants associés aux particules dans les milieux aquatiques récepteurs (rivière Peyne et Hérault).

4.2.5 Toxicité des extraits des MES et implications pour l'exposition des écosystèmes aquatiques récepteurs

Des extractions aqueuses ont été effectuées sur les MES prélevée à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté au cours des 12 crues caractérisées. Les extractions aqueuses aussi bien que les extraits organiques an DMSO n'ont pas permis de mettre en évidence une toxicité associée aux MES.

D'autre part, les extraits aqueux présentent des concentrations en cuivre du même ordre de grandeur que les concentrations dans la fraction dissoute des eaux de ruissellement desquelles les MES sont issues (voir paragraphe suivant). Les concentrations en matière organique sont par ailleurs assez élevées dans les extraits aqueux (20.2 à 25.7 mg/L), ce qui peut expliquer les forts ajouts nécessaires pour atteindre une toxicité.

Les MES sont donc, au vu des fortes concentrations en cuivre, des réservoirs importants de cuivre dans les eaux de ruissellement. Cependant, les extractions aqueuses, organiques et les extractions séquentielles ont montré que les contaminants sont fortement associés aux MES ou sont libérés sous des formes non biodisponibles. Si des concentrations en cuivre importantes peuvent être extraites des particules, le métal n'est pas sous une forme biodisponible car il est libéré conjointement avec un ensemble de ligands, en partie organiques.
La méthodologie adoptée, basée sur des biotests utilisant des organismes aquatiques, ne peut cependant pas permettre de se prononcer avec certitude sur l'absence de risque consécutif à l'exposition d'autres organismes aux MES (organismes benthiques, poissons). Au regard des importants volumes de MES exportés lors de certains événement pluvieux à l'exutoire de la parcelle étudiée, l'exportation et le transport du cuivre (et plus généralement des produits phytosanitaires) vers les rivières (la Peyne, puis l'Hérault) puis vers les écosystèmes aquatiques particulièrement sensibles que sont les étangs littoraux du Languedoc-Roussillon doit être évaluée en détail. Ce point dépasse largement les objectifs fixés pour la présente étude.

4.3 Éléments dissous

L'objectif est ici de déterminer la contamination en cuivre et sa toxicité dans les eaux (<1 µm) en prenant en compte les autres contaminants et ligands présents dans les échantillons influents pour la spéciation du cuivre et la toxicité. Les prélèvements ont dans un premier temps été caractérisés (ions majeurs, métaux traces, carbone organique, pesticides) en considérant les variations temporelles (influence de la saison et des applications de produits phytosanitaires) et spatiales (sol acide / sol carbonaté). Une étude de la spéciation du cuivre est ensuite proposée, avec d'une part un calcul de l'effet de la matrice inorganique par MINEQL+, d'autres part des mesures par DPASV, et enfin la détermination de la fraction

colloïdale (>20 nm). En dernier lieu, la toxicité des échantillons sera présentée et discutée à la lumière des caractérisations chimiques effectuées.

4.3.1 Matrice des ions majeurs

La connaissance des concentrations en ions majeurs est nécessaire aussi bien pour la modélisation de la spéciation chimique à l'équilibre que pour l'interprétation des résultats de toxicité. Les résultats pour l'année 1999, sur la parcelle à sol carbonaté et ceux du premier semestre 2000 (parcelle à sol acide et carbonaté) sont présentés en figure 33. La balance ionique est vérifiée (avec une erreur inférieure à 10%), ce qui valide les résultats obtenus.

Les eaux de ruissellement de la parcelle à sol carbonaté ont un pH stable légèrement alcalin (7.4 à 8.2), et les ions majeurs de la phase dissoute sont Ca^{++} (moyenne de 0.55 mmol/L, soit 74% des cations) pour les cations et HCO_3^- pour les anions (moyenne de 0.9 mmol/L, soit 58% des anions). La distribution des ions a été reportée sur le diagramme présenté en figure 32, et fait ressortir que le pôle cationique est de nature calcique, sans grand changement d'une crue à l'autre. Le pôle anionique majoritaire est bicarbonaté, avec cependant une composante sulfatée non négligeable pour certaines crues. Les sulfates sont particulièrement présents lors des crues de printemps (21 avril 1999 et avril-mai 2000), en association avec les nitrates.

Les eaux de ruissellement provenant de la parcelle à sol acide ont un pH neutre (6.8 à 7.1), avec un pôle cationique potassique-sodique stable (K = 40% et Na =19% des cations) et un pôle anionique à tendance bicarbonaté ou chloruré selon les cas. Les nitrates, comme sur la parcelle à sol carbonaté, sont présents au printemps.

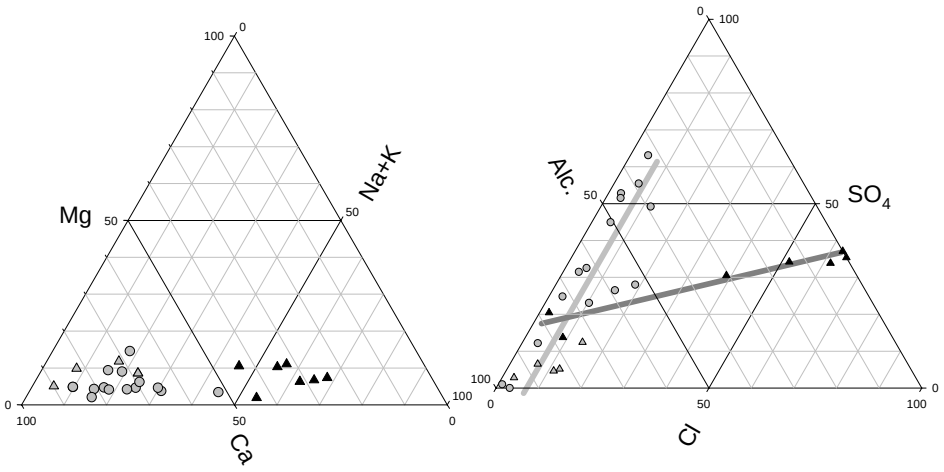
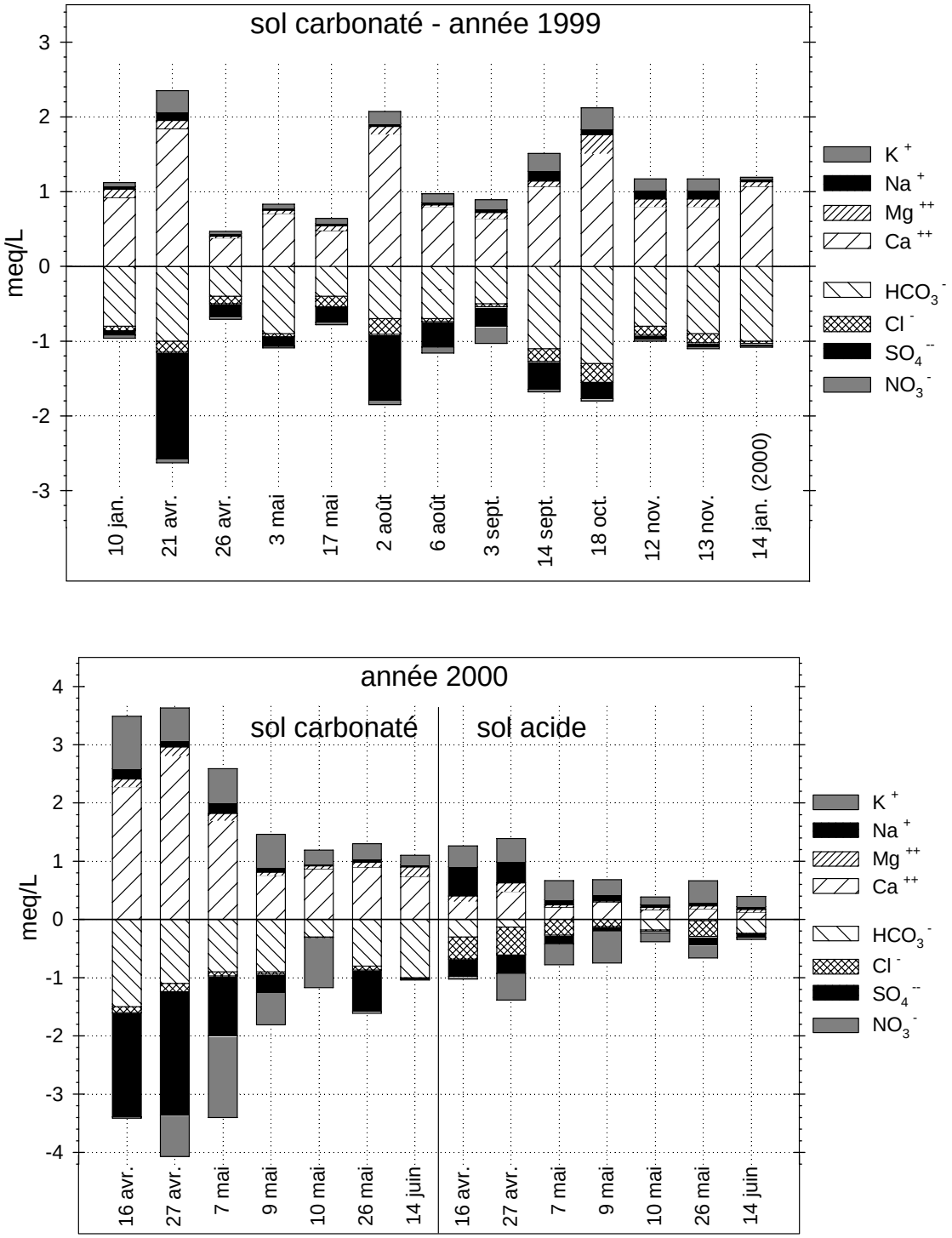


Figure 32 : Diagrammes de Piper des eaux de ruissellement de la parcelle à sol carbonaté (en grisé) et de la parcelle à sol acide (en noir) pour les années 1999(○) et 2000(△).



voir données brutes en annexe 4 et 9

Figure 33 : Concentrations en ions majeurs dans les échantillons moyens des eaux de ruissellement sur sol carbonaté (1999) et sur deux types de sols (avril à juin 2000).

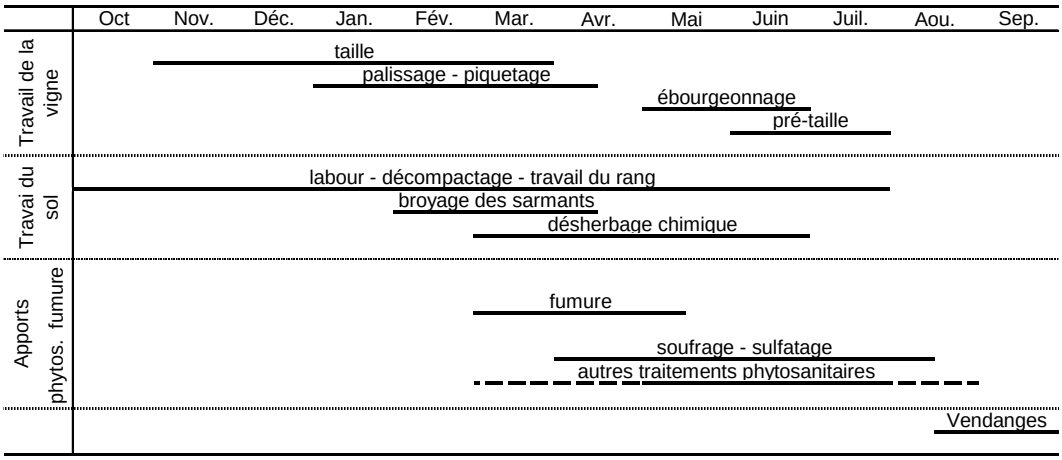
D'autre part les concentrations en carbone organique dissous varient de 0.4 à 15 mg/L (moyenne de 5.3 mg/L) pour les eaux de la parcelle à sol carbonaté et de 5.6 à 17 mg/L (moyenne de 10.5 mg/L) pour les eaux issues de la parcelles à sol acide. Aucune variation temporelle ou corrélation avec d'autres paramètres globaux des eaux ou des MES n'a pu être établie. Cependant ce paramètre pourra être utile pour les interprétations de biodisponibilité du cuivre.

Au sein d'une parcelle, la composition générale des eaux est relativement stable, mis à par les sulfates et nitrates, en liaison probable avec l'application de produits phytosanitaires sur les parcelles (voir plus bas). Par ailleurs, les eaux de ruissellement ont des caractéristiques très différenciées selon le type de parcelle considéré : en plus des différences de pH et de composition en ions majeurs, on peut remarquer que la charge globale des eaux est plus faible en moyenne sur la parcelle acide (conductivité = 98µS/cm ; de 50 à 142) que sur la parcelle carbonatée (conductivité = 175µS/cm ; de 90 à 401). Le carbone organique dissous est lui plus important sur la parcelle acide. Ces différences sont en premier lieu dues au type de sol des parcelles, qui donne aux eaux de ruissellement des caractéristiques spécifiques à chaque parcelle.

Les différences de composition des eaux entre les deux parcelles est illustré par une ACP (en annexe 10), dont les différences ont été validées par analyse discriminante. L'ACP montre en outre une évolution temporelle en parallèle sur les deux parcelles, ce qui indique une influence saisonnière (état du sol, traitements phytosanitaires, intensité des pluies) similaire sur les deux parcelles.

4.3.2 Utilisation de produits phytosanitaires pendant la période d'étude

Le tableau 19 présente le calendrier cultural type de la vigne sur le bassin versant de Roujan, et le détail des produits phytosanitaires utilisés sur la parcelle à sol carbonaté (suite à une enquête auprès de l'agriculteur) est présenté en annexe 8.



voir le détail des produits phytosanitaires utilisés lors de la période d'étude en annexe 8.

Tableau 19 : Calendrier cultural type de la vigne sur le bassin versant de Roujan (Louchart *et al.*, 1997).

Les herbicides utilisés (Diquat, Diuron, Glyphosate, Paraquat et Terbuthylazine, et une application de DNOC en 1999) sont appliqués au printemps, principalement en avril. Les fongicides sont appliqués sur l'ensemble de la période de croissance de la vigne, qui va de mars aux vendanges (fin août, septembre). Un ensemble de fongicides a été utilisés en plus du cuivre : l'agriculteur a surtout utilisé du Folpel et du Metalaxyl (plusieurs applications en 1999 et 2000), ainsi qu'une application de Dinocap (en 1999 et 2000), de Manèbe et de mirante (en 1999) et de Mancozèbe et du Cymoxanil (en 2000).

Un ensemble d'herbicides est appliqué en début de saison (avril) alors que les fongicides peuvent être appliqués tout au long du printemps et de l'été. Les concentrations dans les eaux de ruissellement vont donc dépendre de ces caractéristiques d'application.

D'autre part, le cuivre est utilisé avec un ensemble de molécules organiques qui d'une par sont susceptibles d'être toxiques et d'autre part peuvent interagir avec le cuivre (par exemple, le mirante, Manèbe et Mancozèbe ont des structures proches du DDC, dont la toxicité des complexes métalliques lipophiles qu'il peut former a été étudiée en laboratoire).

4.3.3 Concentrations moyennes en métaux traces et pesticides

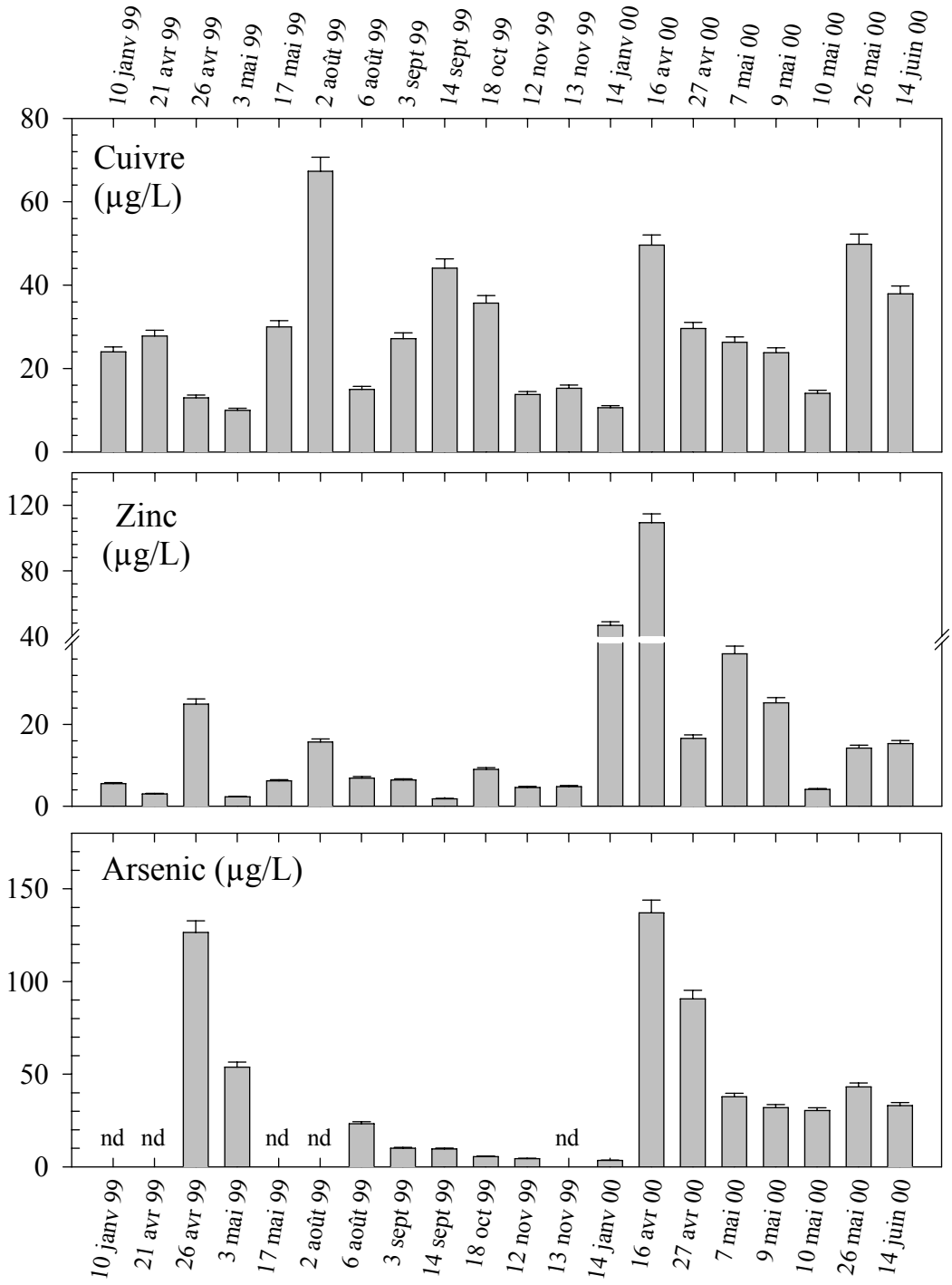
Les concentrations en métaux traces dissous sont présentées en figure 34 (sol carbonaté) et figure 35 (sol acide) et les concentrations en Simazine et Diuron en figure 36 (seulement sur sol carbonaté). Les résultats obtenus sur la parcelle à sol carbonaté seront exploités en premier lieu, en raison du plus grand nombre de données et d'informations disponibles sur la pluie et les produits phytosanitaires appliqués. Les résultats obtenus sur la parcelle à sol acide sont donnés à titre de comparaison.

4.3.3.a Cuivre

Les concentrations en cuivre dissous, comme dans les MES, varient peu (20 à 70 µg/L), ce qui montre que le cuivre est presque devenu un « fond biogéochimique » aux concentrations où il est présent dans les sols. Les concentrations en cuivre sont peu dépendantes des applications de produits phytosanitaires sur la parcelle, car les périodes d'application sont réparties au cours de la saison (principalement dans les périodes humides). Une corrélation significative ($r=0.63$, $P<0.01$) est observée entre les concentrations en cuivre dissous et les concentrations en carbone organique dissous, ce qui confirme l'importance de la matière organique dans la complexation du cuivre dans les eaux naturelles. Une régression linéaire multiple sur l'ensemble des crues analysées a permis de déterminer les facteurs déterminants pour prévoir les concentrations en cuivre dissous (Équation 6).

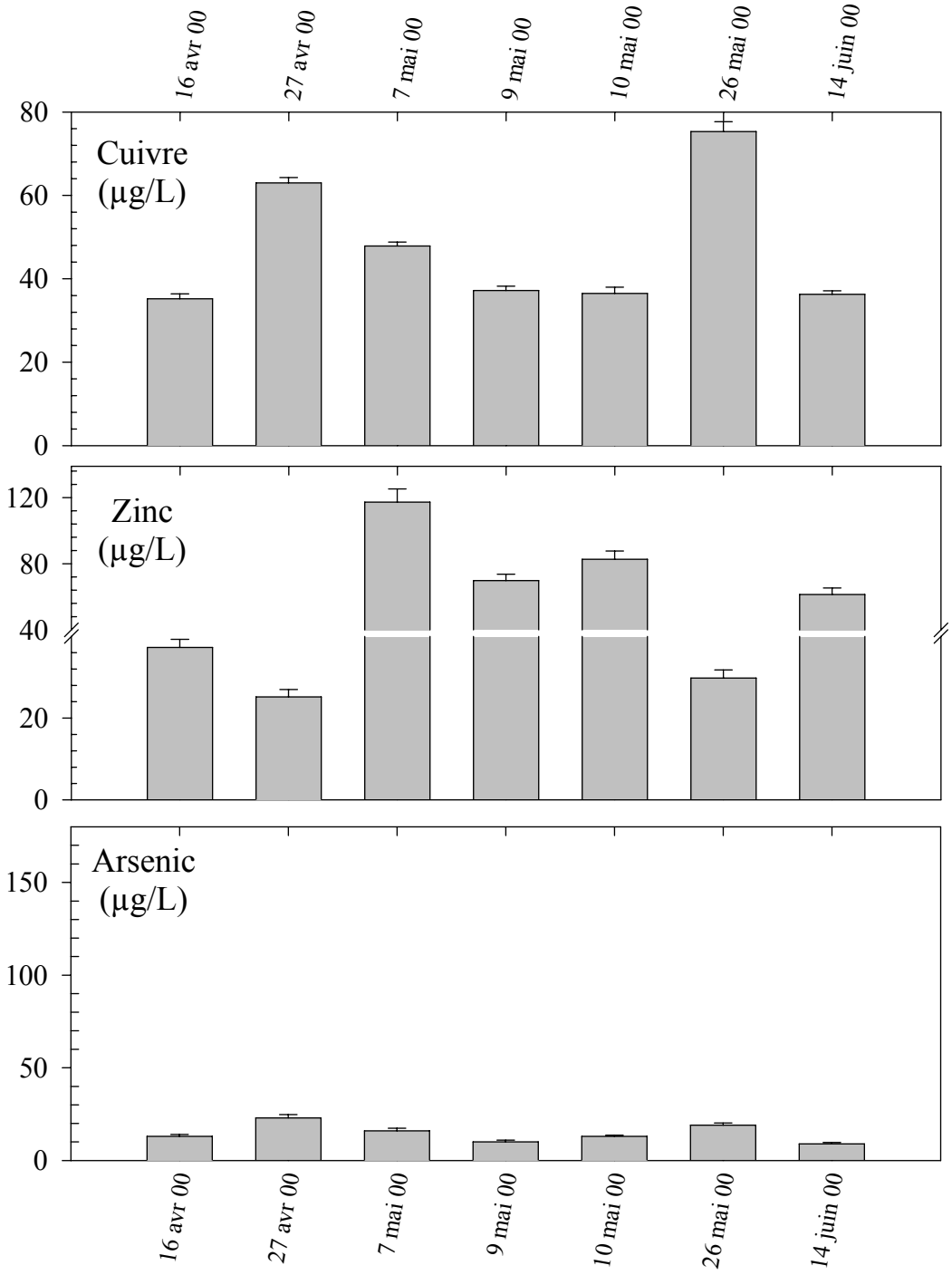
Équation 6 : Détermination des paramètres explicatifs des concentrations en cuivre dissous dans les eaux de ruissellement.
Variables centrées réduites, $r^2=0.764$ $n=27$, $P<0.01$.

$$[Cu]d = 0.57[Corg] + 0.41[Cond] + 0.39[pH] + 0.21[Cu]p - 0.09[Alc] - 0.07[Fe]$$



voir données brutes en annexe 5.
nd *: élément non déterminé*

Figure 34 : Concentrations moyennes en cuivre, zinc et arsenic total dissous (fraction <1µm) dans les eaux de ruissellement de la parcelle sur sol carbonaté.



voir données brutes en annexe 9.

Figure 35 : Concentrations moyennes en cuivre, zinc et arsenic total dissous (fraction <1µm) dans les eaux de ruissellement de la parcelle sur sol acide.

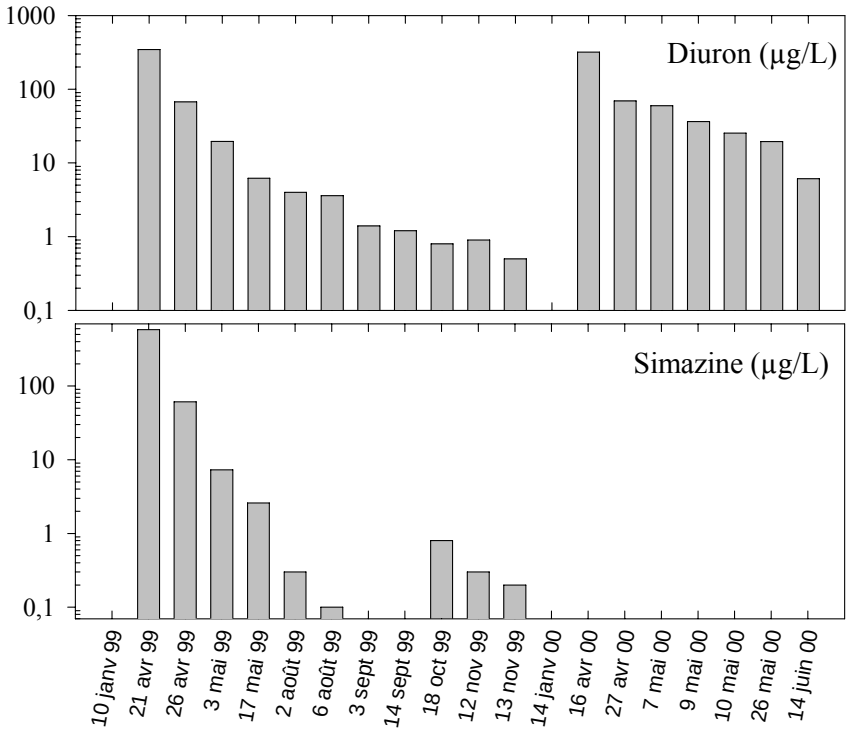


Figure 36 : Concentrations moyennes en Simazine et Diuron total dissous (fraction <1µm) dans les eaux de ruissellement de la parcelle sur sol carbonaté.

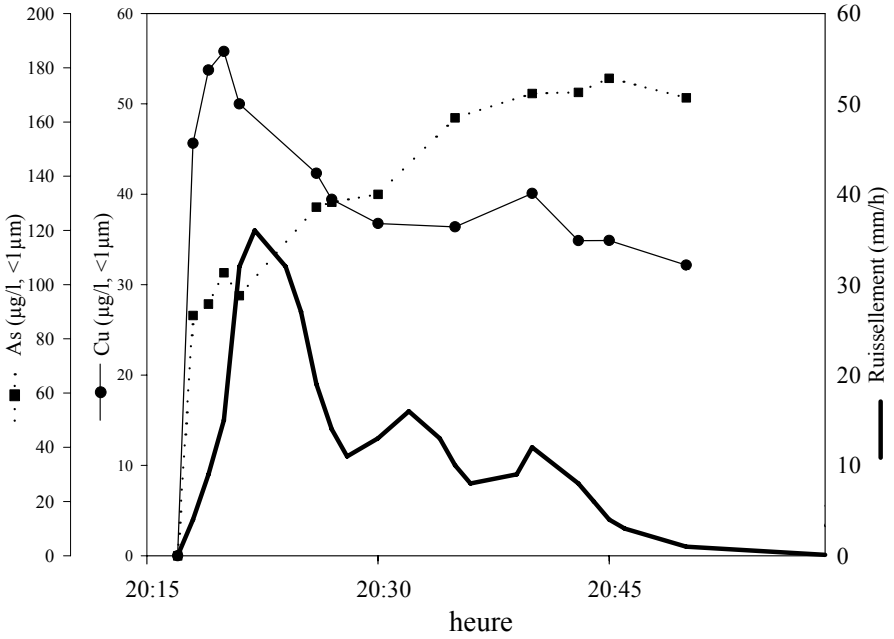


Figure 37 : Dynamique du cuivre et de l'arsenic total dissous (fraction <1µm) dans les eaux de ruissellement de la parcelle à sol carbonaté. Crue du 16 avril 2000.

Les paramètres les plus explicatifs sont le carbone organique dissous ([Corg]), la conductivité ([Cond]) et les ions hydroxydes, qui représentent globalement les ligands du cuivre. Le cuivre particulaire ([Cu]p) représente la source en cuivre dissous. Les facteurs inorganiques comme l'alcalinité ([Alc]) ou le fer dissous ([Fe]) ont une influence mineure par rapport aux autres paramètres (sans la prise en compte de ces deux paramètres, la régression est peu changée avec r^2=0.759).

4.3.3.b Arsenic et herbicides organiques

Le comportement de l'arsenic, du Diuron et de la Simazine est différent de celui du cuivre. Les concentrations sont élevées au printemps, après une applications unique, et diminuent au cours de la saison. Le zinc présente aussi un comportements similaire, en liaison avec son application sous forme de mirante. Leur concentration dans les eaux est donc fortement liée aux applications effectuées sur la parcelle.

Concernant l'arsenic, les analyses de spéciation par HG-ICP-MS ont révélé une présence majoritaires d'arsenic oxydé (As V > 97% de l'arsenic total dissous, sur 10 crues analysées d'avril 1999 à avril 2000 provenant de la parcelle à sol carbonaté).

4.3.4 Dynamique des contaminants au cours d'une crue

Les variations des concentrations en éléments majeurs et métaux traces sont présentés en annexe 11. La figure 37 présente par exemple la dynamique du cuivre et de l'arsenic dissous dans les eaux de ruissellement de la parcelle à sol carbonaté lors de la crue du 16 avril 2000. Le cuivre a un comportement parallèle à ce que l'on peut observer pour la concentration en MES, c'est à dire que sa concentration est dépendante de l'intensité du ruissellement. Au contraire, les concentrations en arsenic sont faibles au début de la crue (lorsque l'intensité est forte) et plus élevées en fin de crue. Ce phénomène a été observé sur les autres crues analysées en 2000 (voir annexe 11), mais moins nettement sur les crues plus complexes que celle du 16 avril 2000. D'autre part, le comportement de l'arsenic a tendance à se rapprocher de celui du cuivre au cours des crues plus tardives (ex. : 14 juin 2000), en parallèle avec une diminution moyenne des concentrations (de 150 µg/L en avril à 30 µg/L en juin).

La dynamique radicalement différente du cuivre et de l'arsenic dissous confirme que les mécanismes de transfert de ces éléments sont différents :

Le cuivre, corrélé à la matière organique, a le même comportement que les éléments particulaires. Il n'est donc pas transporté sous forme dissoute, mais plutôt associé à la matière organique et aux colloïdes. Les apports de cuivre par les applications de produits phytosanitaires ne modifient pas ce comportement.

Les concentrations en arsenic dans les eaux de ruissellement dépendent fortement des applications en début de saison (avril). Le stock est ensuite lessivé au cours des crues successives et transporté principalement sous forme dissoute, ce qui est confirmé par la présence d'As V en majorité. En fin de saison (été), le comportement de l'arsenic se rapproche de celui du cuivre, et le stock d'arsenic restant lié aux ligands organiques et inorganiques. La dynamique est a priori la même pour les herbicides organiques, avec en plus la dégradation des produits et la formation de métabolites.

4.3.5 Spéciation du cuivre dissous

Afin d'interpréter les résultats de toxicité qui seront obtenus sur les eaux de ruissellement échantillonnées, il est nécessaire d'évaluer l'état de spéciation du cuivre.

Les résultats présentés précédemment ont montré des variations dans la composition des eaux de ruissellement dans le temps, mais principalement entre les deux parcelles étudiées. Dans un premier temps, le calcul de la spéciation du cuivre dans les différentes crues analysées sera comparée à la spéciation calculée dans les milieux utilisés pour les biotests. Dans un second temps, les informations apportées par la DPASV seront présentées. Enfin, les résultats de séparation des colloïdes par ultracentrifugation seront discutés.

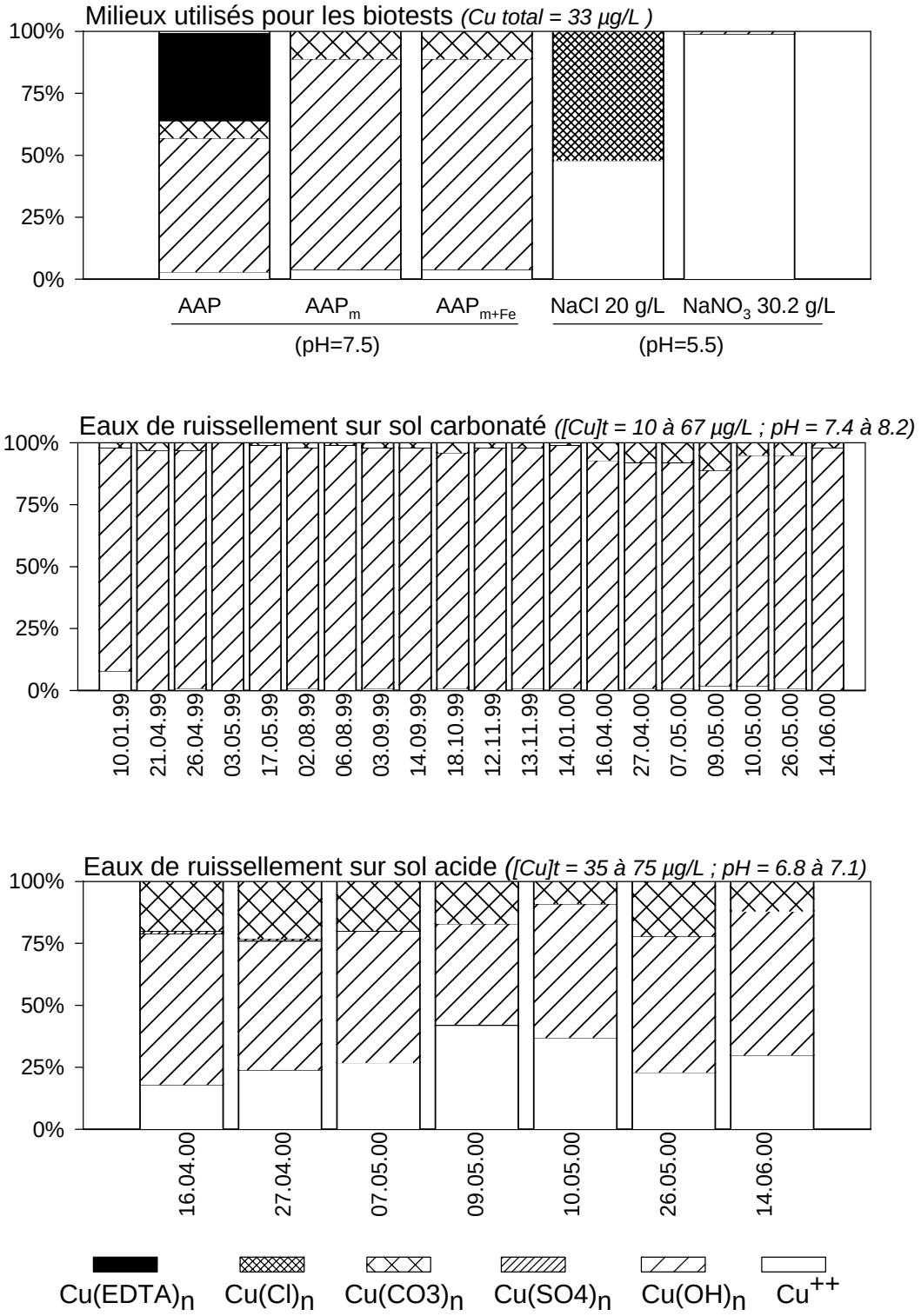
4.3.5.a Calcul de la spéciation chimique du cuivre

Les résultats du calcul de spéciation du cuivre en solution par MINEQL+ sont présentés en figure 38, pour les eaux de ruissellement des deux parcelles et pour les milieux des biotests. La concentration en ion libre dans le milieu de culture algal AAP est de 1% ([Cu++]= 6.1 nmol/L). Elle est de 4% ([Cu++]= 6.3 nmol/L) dans les milieux modifiés AAP_m et AAP_{m+Fe}. Les calculs dans les eaux de ruissellement du bassin versant de Roujan donnent une estimation de l'ion libre pour les eaux de la parcelle sur sol carbonaté de 0.2 à 1.7% (0.48 à 8.8 nmol/L), et pour les eaux de la parcelle sur sol acide de 18 à 42% (100 à 270 nmol/L).

La matrice inorganique des eaux issues de la parcelle à sol acide est moins complexante pour le cuivre, et la concentration en ion libre calculée est de deux ordres de grandeur supérieure aux concentrations dans les eaux issues de la parcelle à sol carbonaté. Cependant, ce calcul reste théorique puisqu'il ne prend pas en compte la complexation avec les ligands organiques et l'adsorption sur les hydroxydes de fer. Sa valeur est comparative, par rapport à la toxicité qui sera observée.

4.3.5.b Mesure du cuivre labile par DPASV

Les résultats de l'analyse de l'ion labile par DPASV ont fait l'objet d'un travail de mise au point méthodologique (Devez, 2000). Les résultats obtenus concernent les crues du 21 avril 1999 et du 16 avril 2000, et n'ont pas montré la présence de cuivre labile dans les échantillons. Le calcul par MINEQL+ présenté précédemment ainsi que des vérifications dans



calcul par MINEQL+ à partir des concentrations en ions majeurs mesurés dans les échantillons moyens de chaque événement pluvieux

Figure 38 : Calcul de la spéciation chimique du cuivre dans les eaux prélevées sur les parcelles viticoles (sol carbonaté et sol acide), comparé à la spéciation chimique du cuivre dans les milieux utilisés pour les biotests.

des matrices inorganiques reconstitués (représentatives de la composition moyenne des eaux de ruissellement), ont montré par comparaison que les ligands organiques jouent un grand rôle dans la complexation du cuivre.

Les analyses effectuées lors de la période d'étude ont simplement permis de montrer que les concentrations en cuivre labile sont très faibles. D'autres études sont en cours et permettront de répondre plus précisément sur le rôle de la matière organique dans la complexation du cuivre sur la base d'études existantes utilisant la DPASV en présence de matière organique en eau douce (Deaver and Rodgers, 1996 ; Witter *et al.*, 1998 ; Venkata Mohan *et al.*, 2000).

4.3.5.c Concentrations en cuivre colloïdal

Les concentrations en cuivre dans les eaux de ruissellement de la parcelle sur sol carbonaté filtrées (<1µm) et ultracentrifugées (<20 nm) sont présentées en figure 39.

Le fractionnement par taille montre que 12 à 15% du cuivre est présent dans les colloïdes supérieurs à 20 nm, avec un maximum pour la crue de plus forte intensité, la crue du 2 août 1999.

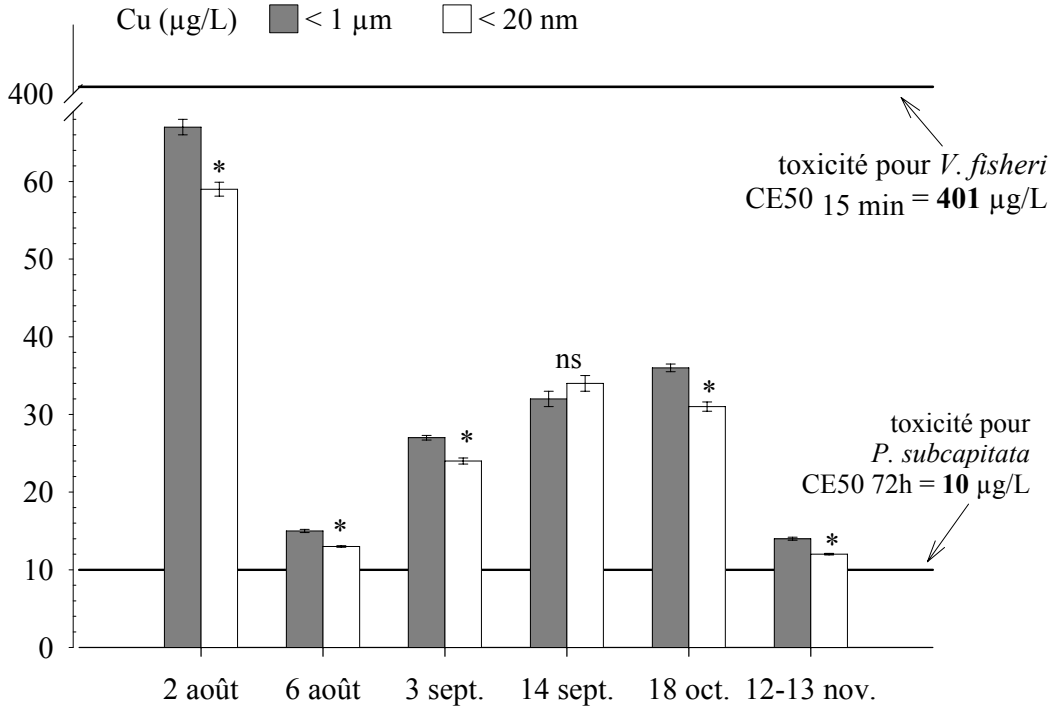


Figure 39 : Concentrations en cuivre dans la fraction total dissoute (<1 µm) et ultracentrifugée (<20 nm) pour les crues d'été et automne 1999.

Le comportement du cuivre lors des crues analysées ainsi que le calcul par MINEQL+, les analyses préliminaires par DPASV et la séparation des colloïdes confirment que le cuivre est majoritairement associé à des ligands organiques de petite taille (infèrieure à 20 nm).

Les résultats sont en accord avec le comportement du cuivre généralement admis dans les eaux naturelles (Björklund and Morrison, 1997 ; Denney et al., 1999 ; Eyrolle and Benaim, 1999 ; Jensen et al., 1999 ; Eriksen et al., 2001).
La toxicité a été testée sur les eaux de ruissellement dans l'objectif de déterminer l'effet des contaminants transportés. A la lumière de l'ensemble des caractérisations effectuées, il n'est pas attendu que le cuivre seul induise une forte toxicité. Il est nécessaire de prendre en compte l'ensemble des contaminants présents, notamment l'arsenic et les herbicides lors des premières crues de printemps.

4.3.6 Toxicité dans la fraction dissoute

La toxicité des eaux de ruissellement prélevées, filtrées (< 1 µm), a été testée pour l'algue et la bactérie. Aucune toxicité n'a été observée pour la bactérie, et la toxicité pour l'algue est présentée au tableau 20.

La toxicité (CE_{50} en % de dilution) est très variable selon les crues (de l'absence de toxicité à des CE_{50} de 2% pour les tests chroniques). Elle est aussi variable pour les deux parcelles puisque lors de l'année 2000, les résultats de toxicité comparées sur les deux parcelles étudiées n'ont pas montré d'effet sur la parcelle acide, contrairement à la parcelle carbonatée.

Enfin, la comparaison des différents indicateurs d'effet pour les crues de l'année 2000 sur la parcelle à sol carbonaté montrent des évolutions parallèles, avec la sensibilité la plus forte pour le test de croissance, puis d'inhibition de la chlorophylle. Le test d'inhibition de l'activité estérasique n'a montré une toxicité que pour la crue du 7 mai 2000, et l'intégrité membranaire jamais altérée.

Pour les crues non toxiques, des ajouts de cuivre ont été effectués dans le but de déterminer la capacité tampon des échantillons. Les résultats sont interprétés ci-dessous en terme de biodisponibilité du cuivre.

4.3.6.a Relation entre le cuivre et la toxicité

La figure 40 présente la relation existant entre la toxicité des eaux de ruissellement et leur concentration en cuivre. La démarche pose comme *a priori* provisoire que le cuivre est l'unique contaminant toxique. Tout d'abord, il est important de remarquer que la concentration en cuivre total dissous dans les échantillons est systématiquement supérieure au niveau de toxicité du cuivre observé en laboratoire, où la CE_{50} du cuivre dans le milieu de référence AAP_{m+Fe} est de 9.8 ± 1 µg/L. Cependant, deux cas de figure se présentent : (■) les crues qui contiennent des contaminants inhibiteurs de la croissance de l'algue en concentrations suffisantes pour occasionner un effet – la toxicité est exprimée en concentration de cuivre correspondant à la dilution nécessaire pour obtenir la CE_{50}, et (●) les crues pour lesquelles aucun effet toxique n'a pu être observé dans les conditions de

déroulement des tests effectués – la toxicité est exprimée en concentration de cuivre, somme du cuivre présent dans l'échantillon et du cuivre ajouté, nécessaire pour obtenir la CE_{50}.

Pour les eaux toxiques en elles-mêmes, les CE_{50} sont situées de part et d'autre de la CE_{50} du cuivre dans le milieu de référence AAP_{m+Fe} (9.8 ± 1 µg/L). Certaines crues, comme celle du 26 mai 2000, ont une CE_{50} supérieure (20 µg/L de cuivre), ce qui pourrait être interprété par l'interaction du cuivre avec les ligands présents dans l'échantillon et une compétition avec les ions majeurs, entraînant par conséquent une diminution de la biodisponibilité du cuivre. D'autre part, certaines crues ont une CE_{50} bien inférieure à la CE_{50} de référence, allant jusqu'à 1 µg/L pour la crue du 16 avril 2000, ce qui tendrait à montrer que le cuivre est en présence d'autres contaminants toxiques (addition de toxicité, synergie et/ou présence de formes plus facilement biodisponibles que l'ion libre comme les CLM). Dans un cas comme dans l'autre, les résultats ne permettent pas d'identifier l'origine de la toxicité des échantillons : cuivre libre, autres espèces du cuivre (CLM), autres contaminants (autres métaux, contaminants organiques). Néanmoins, dans un contexte d'utilisation multiple de produits phytosanitaires susceptibles de rejoindre les eaux de ruissellement, il est fort probable que d'autres contaminants que le cuivre soient aussi responsable de la toxicité.

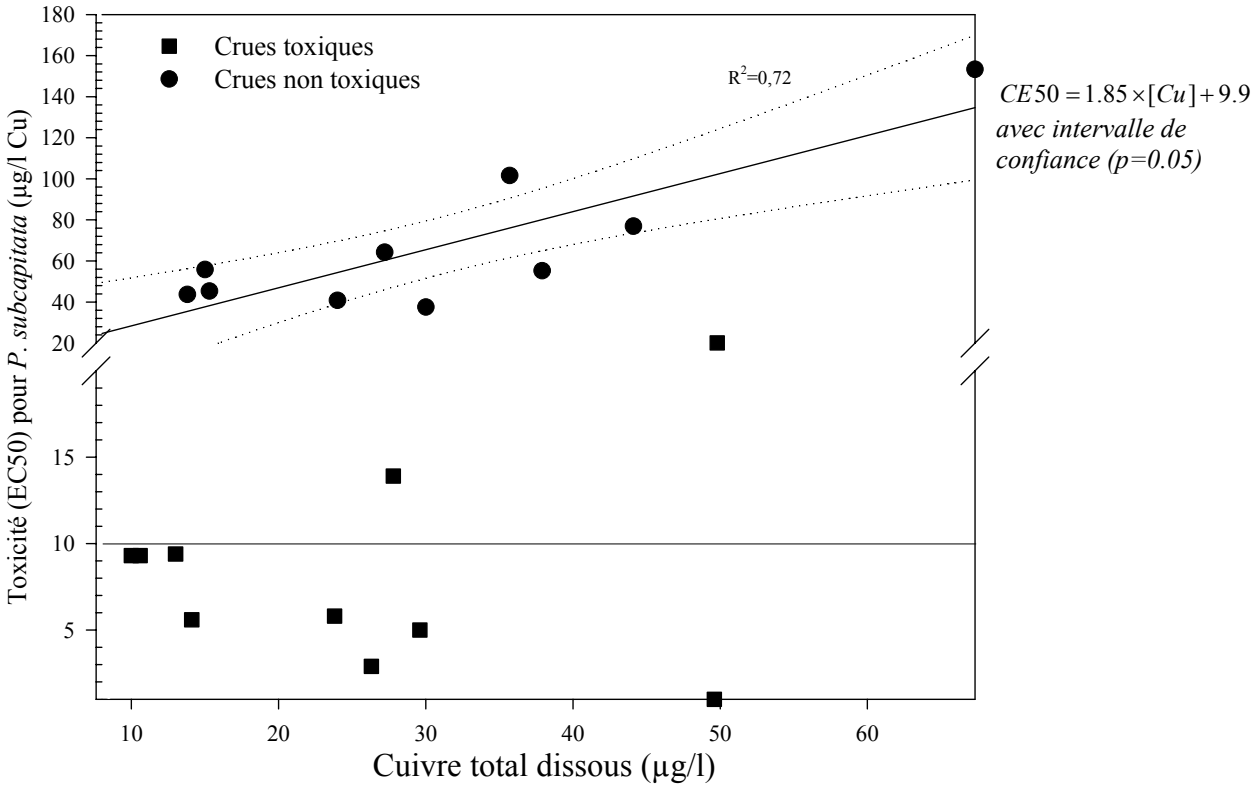


Figure 40 : Relation entre la toxicité (toxicité intrinsèque et toxicité du cuivre ajouté dans les échantillons non toxiques – CE_{50} pour *Pseudokirchneriella subcapitata*, test d'inhibition de la croissance en 72h) et la concentration en cuivre total dissous des eaux de ruissellement de la parcelle carbonatée.

Sol carbonaté (1999)		
	Croissance	
Date	**%**	**µg/L Cu**
04/01/99	NT	40.8 (38.8-42.8)
21/04/99	50% (48-53)	~13.9
26/04/99	72% (68-76)	~9.4
03/05/99	93% (89-98)	~9.3
17/05/99	NT	37.5 (35.6-39.4)
02/08/99	NT	153.3 (145.6-160.9)
06/08/99	NT	55.8 (53-58.6)
03/09/99	NT	64.2 (61-67.4)
14/09/99	NT	76.9 (73-80.7)
18/10/99	NT	101.6 (96.5-106.6)
12/11/99	NT	43.7 (41.5-45.9)
13/11/99	NT	45.3 (43-47.6)

	Sol carbonaté (2000)							Sol acide	
	Croissance		Chlorophylle		Estérase		IM (*)	Croissance	
Date	**%**	**µg/L Cu**	**%**	**µg/L Cu**	**%**	**µg/L Cu**	**µg/L Cu**	**%**	**µg/L Cu**
14/01/00	88% (84-92)	~9.3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
16/04/00	2% (1.9-2.1)	~1	nd	nd	nd	nd	nd	NT	110 (105-116)
27/04/00	17% (16-18)	~5	nd	nd	nd	nd	nd	NT	80 (76-84)
07/05/00	11% (10-12)	~2.9	17% (16-17)	~4.4	12% (10-13)	~3,1	>15 000	NT	140 (133-147)
09/05/00	24% (23-28)	~5.8	49% (47-53)	~11.8	NT	171 (145-254)	>15 000	NT	170 (162-179)
10/05/00	40% (38-45)	~5.6	75% (72-84)	~10.6	NT	82 (59-118)	>15 000	NT	135 (128-142)
26/05/00	40% (37-44)	~20.1	89% (82-105)	~44.3	NT	417 (200-593)	>15 000	NT	846 (803-888)
14/06/00	NT	55.2 (52.4-57.9)	NT	54.9 (53.9-56)	NT	1107 (856-1678)	>15 000	NT	1194 (1135-1254)

(*) intégrité membranaire

Pour les échantillons toxiques, la CE_{50} est exprimée en % de l'échantillon (avec intervalle de confiance, P=0.05) et concentration en cuivre correspondante (~). Pour les échantillons non toxiques (NT), l'effet du cuivre est exprimée en µg/L de cuivre nécessaire pour atteindre la CE_{50} (avec intervalle de confiance, P=0.05).

Tableau 20 : Toxicité des eaux de ruissellement pour l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata.*

Concernant les crues non toxiques, on peut observer que des concentrations de cuivre parfois importantes, de 41 µg/L à 153 µg/L de cuivre dans les eaux, sont nécessaire pour atteindre la CE_{50} dans les eaux prélevées le 4 janvier 1999 et le 2 août 2000, respectivement. Ceci est une illustration de la capacité de complexation du cuivre sous des formes non biodisponibles, de l'effet protecteur des ions majeurs (Ca^{++} et Mg^{++}) en compétition avec les sites d'assimilation du cuivre à la surface des algues ainsi que de l'ensemble des facteurs protecteurs de la toxicité du cuivre dans les échantillons considérés.

De plus, l'ajout de cuivre nécessaire pour atteindre la CE_{50} est directement proportionnel au cuivre déjà présent dans l'échantillon : en d'autres termes, plus l'échantillon est contaminé en cuivre, plus sa capacité de complexation et de protection contre la toxicité du cuivre est importante. La régression linéaire obtenue ($r^2 = 0.72$, $n = 10$) est du type :

Équation 7 : Relation entre la concentration en cuivre et la CE_{50} du cuivre(en µg/L) ajouté dans les eaux de ruissellement non toxiques de la parcelle sur sol carbonaté.

$$CE50 = 1.85 \times [Cu] + 9.9$$

L'ordonnée à l'origine correspond à la toxicité du cuivre dans le milieu AAP_{m+Fe} de référence. La pente signifie qu'il est *quasi* nécessaire de doubler la concentration en cuivre déjà présent dans l'échantillon pour obtenir une toxicité. Ainsi, si l'on interprète cette relation uniquement en termes de complexation, on peut penser que le cuivre présent dans les échantillons est totalement complexé, et que celui-ci occupe approximativement la moitié des sites de complexation disponibles (ceux qui ont l'affinité la plus forte pour le cuivre).

Par le calcul de spéciation effectué précédemment, il est possible d'évaluer si la matrice inorganique peut permettre d'expliquer la spéciation. Or, ce n'est pas le cas puisque le calcul estime des concentrations en ion libre bien au-dessus de la limite de sensibilité de l'algue (6 nmol/L), avec des concentrations entre 21 et 300 nmol/L aussi bien pour les crues toxiques que non toxiques.

Par conséquent, pour les crues toxiques, même si le cuivre peu jouer une part dans la toxicité, il est très probable que les autres contaminants exercent une toxicité (arsenic, Diuron…). Pour les crues non toxiques, la surestimation de l'ion libre par MINEQL+ est une indication de la présence d'autres ligands, comme la matière organique ou les hydroxydes de fer, sous forme dissoute et colloïdale.

4.3.6.b Influence des colloïdes sur l'effet du cuivre

Nous avons vu précédemment que les colloïdes de grande taille (20 nm - 1 µm) contiennent peu de cuivre. Les résultats d'ajout de cuivre dans les échantillons filtrés et ultracentrifugés (Figure 41) montrent que les colloïdes de taille supérieure à 20 nm interagissent peu avec la

toxicité du cuivre pour la bactérie, sauf pour la crue du 2 août 1999. Pour l'algue, la toxicité chronique n'est jamais significativement différente entre les deux fractions. Cette expérience confirme que les colloïdes de taille supérieurs à 20 nm, de nature principalement inorganique, protègent peu de la toxicité du cuivre.

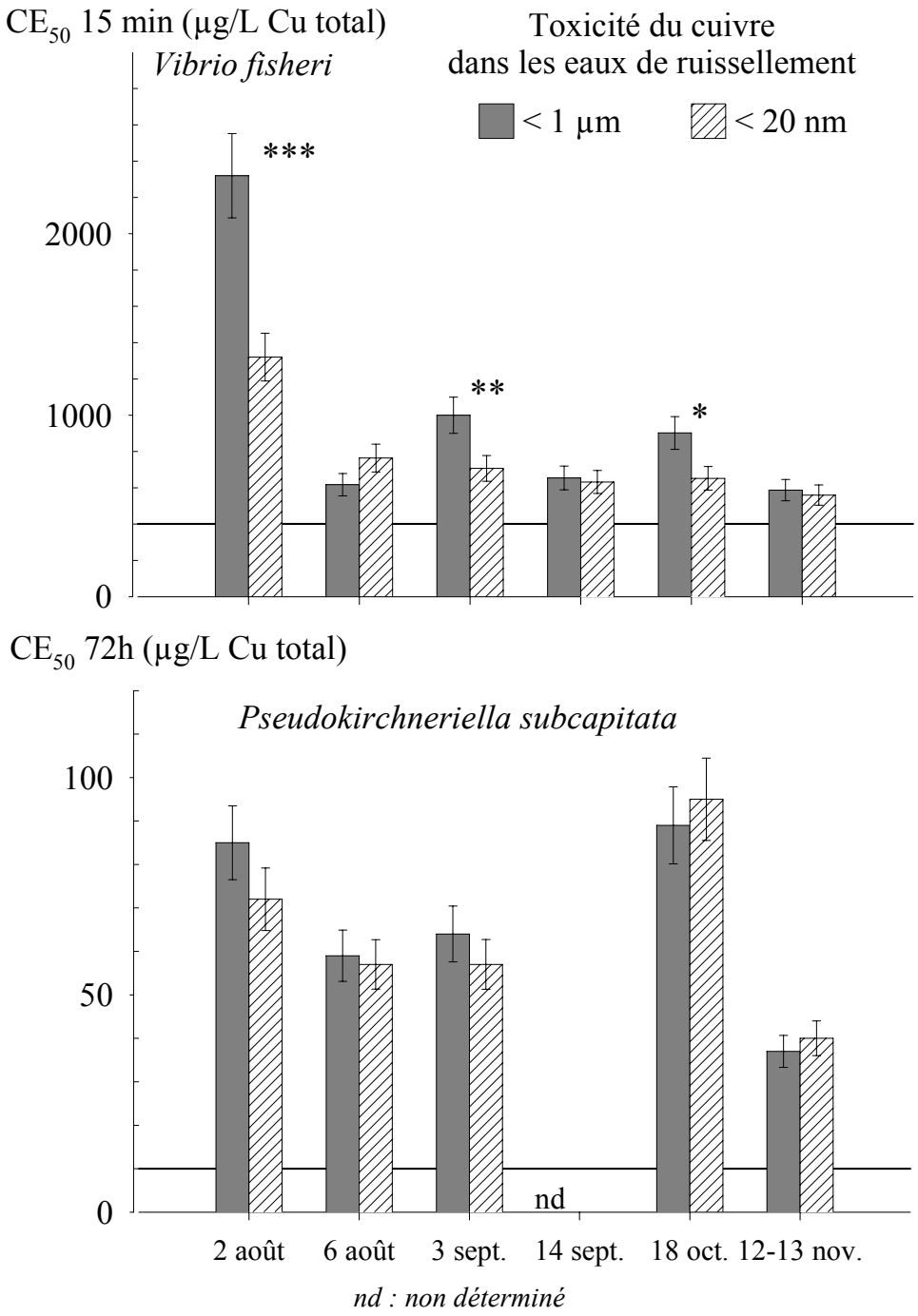


Figure 41 : Toxicité du cuivre ajouté dans 6 crues non toxiques en 1999. Influence de la présence (<1 µm) ou de l'absence (<20 nm) de colloïdes.

L'ultracentrifugation ne permet pas d'étudier l'influence des petits colloïdes organiques. Et, au vu des volumes importants nécessaires pour procéder à une ultrafiltration, il n'a pas été possible d'appliquer cette technique sur les échantillons d'eau de ruissellement prélevés. Nous avons pu par ailleurs illustrer l'intérêt de la technique d'ultrafiltration sur un autre milieu soumis à une pollution métallique : la haute Vistule, en Pologne (Guéguen *et al.*, 2001a). Cette étude nous a permis de montrer par la même approche qu'à Roujan - couplage entre la séparation par taille, la mesure de toxicité des échantillons obtenus et calcul de la spéciation chimique - l'influence des petits colloïdes organiques. Dans l'exemple de la Vistule, plusieurs cas ont pu être observés :

- aucune toxicité dans les fractions filtrées (< 1µm) et ultrafiltrées (< 1kDa), malgré des concentrations élevées en métaux et des concentrations en métal libre calculées potentiellement toxiques, due à la présence de ligands dissous ;
- une toxicité identique dans les fractions filtrées et ultrafiltrées, due à la présence d'éléments toxiques dissous (< 1kDa) ;
- pas de toxicité dans la fraction filtrée, mais apparition d'un effet après ultrafiltration. Ces résultats ont été interprétés en termes d'effet protecteur des colloïdes par formation d'une couche protectrice de colloïdes adsorbés à la surface des organismes, comme certaines études en ont avancé l'hypothèse (Campbell *et al.*, 1997 ; Pempkowiak and Kosakowska, 1998).

La séparation à un seuil de coupure de 20 nm ne nous a pas permis d'isoler des colloïdes ayant une forte interaction avec le cuivre. Cependant, l'étude effectuée sur la Vistule montre que, même avec un seuil de coupure plus bas (1 kDa), des ligands peuvent encore être présent dans la fraction « vrai dissoute », et aussi que les colloïdes peuvent avoir un effet non seulement sur la spéciation des métaux, mais aussi sur la sensibilité des organismes. par interaction de la matière organique à la surface des algues.

Les colloïdes ont donc une influence sur la spéciation du cuivre et sa biodisponibilité, qui dépend de leur taille (Eyrolle and Benaim, 1999) et aussi de leur nature (Muller, 1996 ; Karthikeyan and Elliott, 1999 ; Hyun et al., 2000).

4.3.6.c Relation entre la toxicité et les autres contaminants

Les résultats de spéciation chimique du cuivre et de toxicité ont montré que la place du cuivre est limitée dans l'exposition des organismes aquatiques aux produits phytosanitaires exportés dans les eaux de ruissellement viticoles. D'autres éléments toxiques sont donc responsables au moins en partie de la toxicité.

Une analyse en composantes principales basée sur les variables *a priori* explicatives de la toxicité (métaux traces, arsenic, Diuron et Simazine) n'a pas permis de faire ressortir clairement des classes discriminées selon la toxicité. D'autre part, l'analyse discriminante sur

deux classes (toxique / non toxique, par rapport à la réponse du test chronique sur l'algue) n'a pas donné de résultats.

Cependant, une relation existe entre, d'une part la toxicité des eaux et les produits phytosanitaires (arsenic, Diuron), et d'autre part, l'effet protecteur des ligands libérés par l'intensité de la pluie et l'effet de dilution provoqué par la pluviométrie. Pour illustrer ce point, la figure 42 permet de conclure sur la connexion des caractéristiques de pluie, des apports de produits phytosanitaires et de la toxicité des eaux de ruissellement (<1 µm) :

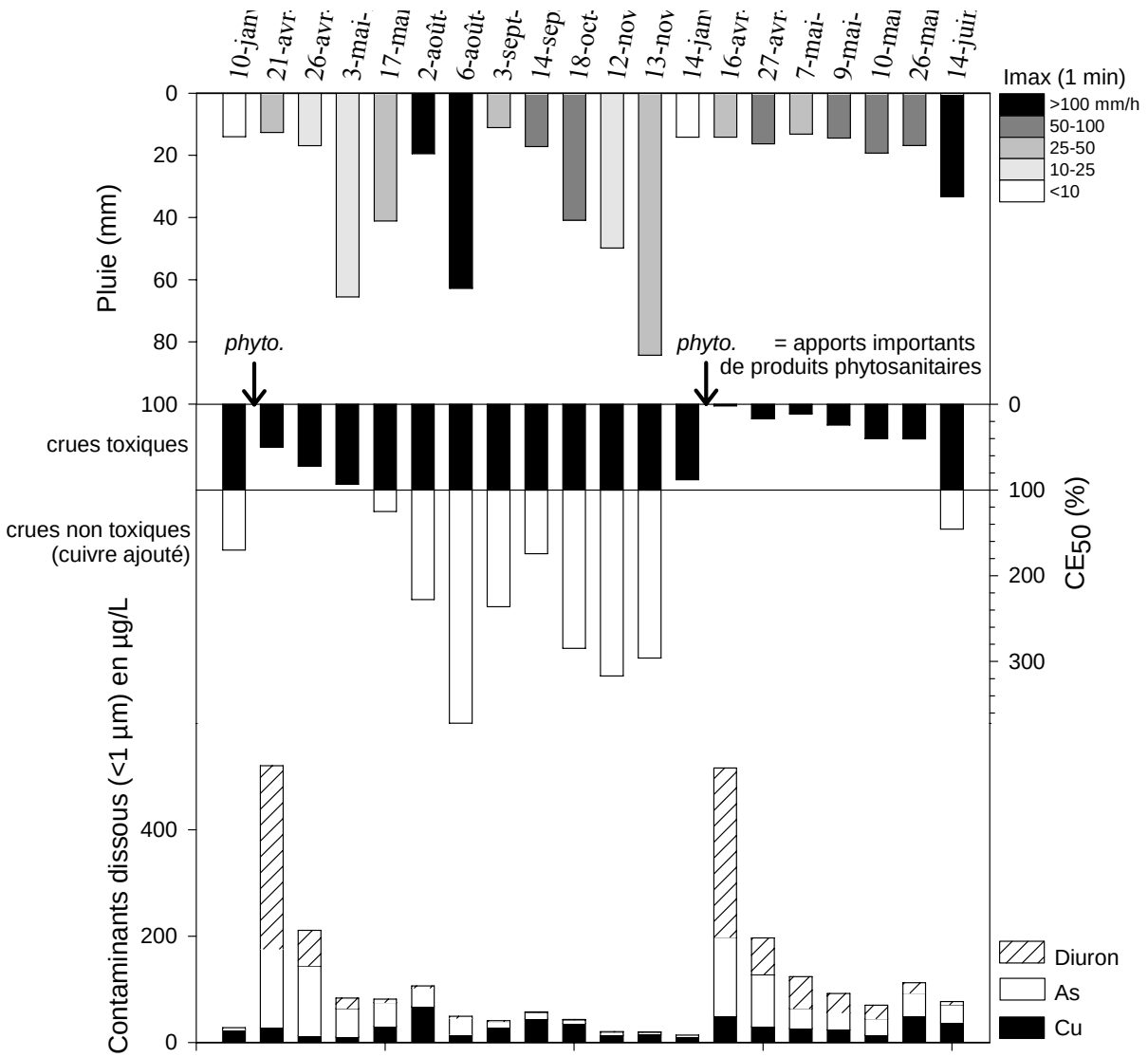


Figure 42 : Influence de la présence des produits phytosanitaires dissous et des caractéristiques de la pluie sur les résultats de toxicité sur l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata.*

4.4 Conclusions générales du chapitre

Cette étude des eaux de ruissellement viticoles avait pour objectif de mettre en évidence les paramètres déterminant la contamination des eaux de ruissellement en cuivre (caractéristiques de la pluie, traitements phytosanitaires, type de sol…), et d'évaluer ses effets potentiels sur les organismes aquatiques en étudiant les facteurs contrôlant sa biodisponibilité (caractéristiques générales des eaux, ligands dissous, matières en suspension, colloïdes) en comparaison des autres contaminants présents dans les échantillons.

Les transferts de produits phytosanitaires vers les écosystèmes aquatiques sont souvent mis en cause dans la pollution et la perturbation des écosystèmes aquatiques (Schulz and Liess, 1999), en particulier en milieu méditerranéen (Hunt *et al.*, 1999). Ces résultats constituent une première évaluation de l'impact des pollutions diffuses d'origine viticole en milieu méditerranéen, et fournit des éléments de réflexion quant à la gestion de l'eau dans ce contexte particulier et le développement d'une agriculture raisonnée.

Plusieurs points ont été mis en évidence à partir de l'exploitation des résultats obtenus lors du suivi des eaux de ruissellement. Même si le nombre d'observation est limité, et nécessiterait d'être poursuivi par un suivi sur une plus longue période (Zhu *et al.*, 1995), le traitement statistique des résultats a permis de faire ressortir quelques points clairs :

- *Influence du type de sol*

Les résultats ont permis d'identifier des différences significatives entre les ruissellements sur sol acide (plus de fer, d'aluminium et pH neutre) et sur sol carbonaté (plus de calcium, d'alcalinité et pH autour de 8). Les analyses en composantes principales ont par ailleurs permis de montrer que la composition des eaux évolue en parallèle au cours du temps. Il est connu que le type de sol et son état influent sur le bilan hydrique au niveau des parcelles viticoles (Leonard and Andrieux, 1998). Le sol est la source des éléments majeurs qui sont susceptibles de se charger dans les eaux de ruissellement, ainsi que de ligands organiques qui peuvent influencer la mobilité des métaux (Obrador *et al.*, 1997 ; Onyatta and Huang, 1999).

- *Dynamique des MES*

Les quantités de MES exportées sont directement liées à l'intensité de la pluie. Même si des différences ont été notées, la composition des MES pour les éléments majeurs et les métaux est relativement stable comparée aux variations de concentration dans la fraction dissoute.

La prise en compte des MES est principalement déterminante en terme d'érosion et de flux de transport des polluants qui y sont associés (Ramireddygari *et al.*, 1996), en particulier en ce qui concerne le cuivre (Wauchope, 1987 ; Grassi *et al.*, 1997). L'exposition à court terme des micro-organismes aquatiques aux produits phytosanitaires transportés par les MES est limitée. Mais dans les sédiments des milieux récepteurs et pour les organismes aquatiques supérieurs, l'exposition et les effets à long terme devront être pris en compte (Schulz and Liess, 2001).

♦ *Dynamique des éléments dissous*

L'ensemble des éléments dissous (cations et anions majeurs) sont corrélés, et ont une évolution parallèle. Concernant les contaminants, deux types de comportements ont été identifiés :

1- le cuivre, qui est corrélé au carbone organique dissous et ne comporte pas d'évolution temporelle nette. Le stock dans les sols est important, et les apports nouveaux sur la parcelle se confondent avec le cuivre déjà présent. Sa dynamique est fortement liée aux ligands dissous et colloïdaux qui le transportent (Muller, 1996 ; Karthikeyan and Elliott, 1999).

2- l'arsenic et les herbicides (Diuron, Simazine), qui sont corrélés à la conductivité. Leur dynamique est liée à une forte solubilité, avec un épuisement du stock au cours de la saison.

♦ *Toxicité*

Les résultats de toxicité ont permis d'identifier que les produits phytosanitaires peuvent avoir un effet important. La bibliographie évalue classiquement les pertes d'herbicides par ruissellement à 2 % de la quantité appliquée (Lennartz *et al.*, 1997), principalement entraînés sous forme dissoute. Cependant, en milieu méditerranéen, plusieurs facteurs spécifiques peuvent avoir une grande influence : les étés chaud et secs sont propices à la persistance des molécules à la surface des sols (peu d'activité microbienne), les événements pluvieux intenses propices à l'érosion, et la dominance de la viticulture et de l'oléiculture caractérisées par une faible couverture végétale. Les études effectuées sur le bassin versant de Roujan ont permis de montrer l'influence des pratiques culturales sur les parcelles viticoles : parcelle travaillée (application moindre d'herbicides et un ruissellement limité) et parcelle non travaillée (pertes en eau et produits phytosanitaires plus importantes). Nous avons pu montrer des différences entre une parcelle sur sol carbonaté et une autre sur sol acide dans la composition des ions majeurs des eaux, mais la toxicité est principalement due aux produits phytosanitaires appliqués.

Les résultats ont aussi montré que le premier épisode pluvieux après l'application (avril) est le plus concentré en produits phytosanitaires et le plus toxique. En termes quantitatifs, il constitue une grande part des pertes annuelles en arsenic, Diuron et Simazine. Une étude plus spécifique sur les produits organiques appliqués a montré par ailleurs que, même espacée de plus de 4 mois de l'application, les concentrations du premier épisode pluvieux sont importantes : la persistance des herbicides est expliquée par une inhibition de l'activité des micro-organismes due à la sécheresse estivale (Lennartz *et al.*, 1997).

Le premier épisode pluvieux, surtout s'il est conséquent en termes de volume et d'intensité, est donc susceptible de transporter des quantités de produits phytosanitaires importantes qui pourraient perturber les organismes aquatiques à une période de croissance et de reproduction pendant laquelle ils sont particulièrement sensibles. Ce point est cependant à nuancer par un effet de dilution et d'échelle que nous n'avons pas considéré dans cette étude. Ce phénomène est en partie observé au niveau de la parcelle, où nous avons observé que les crues

représentant un volume important sont généralement moins toxiques que les crues de plus petit volume.

On observe après ce premier événement pluvieux une baisse exponentielle progressive de la concentration moyenne dans les eaux de ruissellement. Elle est en partie expliquée par une augmentation de l'adsorption au sol avec le temps, mais ce point est à nuancer selon les propriétés de complexation et d'adsorption des produits phytosanitaires considérés.

Les résultats obtenus confirment que le cuivre utilisé en agriculture est fortement retenu sur les particules du sol. C'est un comportement général du cuivre dans l'environnement (Flemming and Trevors, 1989). Mais même si une faible part est entraîné dans les eaux de ruissellement, les niveaux de contamination sont tels que les quantités de cuivre exportés sur les MES peuvent être très importantes. D'autre part, nous avons montré que les contaminants sur la phase particulaire sont peu mobiles et biodisponibles pour les écosystèmes aquatiques, contrairement à la fraction dissoute.

Il est donc essentiel de coupler les informations hydrologiques (caractéristiques des crues), agronomiques (type et état du sol, apports de produits phytosanitaires) et chimiques (caractérisation de la matrice physico-chimique) pour avoir une idée claire de l'état sous lequel est présent un contaminant comme le cuivre. Les résultats de spéciation chimique comme les résultats de toxicité ont mis en évidence que la biodisponibilité du cuivre est faible à court terme. Il n'est cependant pas possible, avec le mode opératoire choisi pour cette étude, d'avoir des informations sur les effets à long terme du cuivre dans les milieux aquatiques récepteurs.

Les résultats de toxicité à court terme ont par ailleurs confirmé que le test bactérien est peu sensible à des contaminations modérées. Les tests effectués sur les algues ont permis d'identifier des eaux de ruissellement très toxiques (les premières crues, au printemps, après application de produits phytosanitaires sur les parcelles). La corrélation de la toxicité avec l'arsenic et les herbicides montre que ce type de produits phytosanitaires peut avoir un impact non négligeable sur les producteurs primaires.

CHAPITRE 5
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les principaux objectifs de ce travail étaient de proposer une approche de la **mesure de la toxicité des métaux à l'aide de bioessais, en relation avec la spéciation chimique** et de l'appliquer à **l'étude de la biodisponibilité du cuivre dans des eaux de ruissellement de parcelles viticoles** en relation avec l'exposition de l'ensemble des produits phytosanitaires de la vigne.

Par une étude méthodologique en laboratoire (Chapitre 3) nous avons pu déterminer la réponse des bioessais dans le cadre du modèle admis de biodisponibilité des métaux (modèle de l'ion libre, FIAM) avec la prise en compte de l'influence des milieux utilisés pour effectuer les tests. Différents indicateurs d'effet chez l'algue ont été validés et testés pour leur sensibilité vis à vis du cuivre. Enfin, la formation de complexes lipophiles des métaux avec l'oxine et le DDC a permis de donner un exemple d'exception au modèle de biodisponibilité de l'ion libre.

5.1 Utilisation de bioessais pour identifier la toxicité des métaux en milieux multicontaminés

Nous avons montré que la croissance algale était l'indicateur le plus sensible, tant au laboratoire pour la toxicité du cuivre que pour les eaux de ruissellement. La fluorescence permet une mesure rapide et sensible de la densité algale. D'autres possibilités seraient envisageables pour mieux identifier l'effet du cuivre, avec d'autres indicateurs plus spécifiques comme la peroxydase (Wong *et al.*, 2001) ou des biotests avec des organismes modifiés comme le test *MetPlate* (Jung *et al.*, 1996 ; Bitton and Morel, 1997 ; Huang *et al.*, 1999).

Sur les MES, d'autres extractions que de simples extractions aqueuses ou au DMSO devraient être envisagées. Les extractions au méthanol pourraient être plus efficaces pour caractériser la toxicité des polluants organiques associés aux particules (Jauzein *et al.*, 1999). Cependant, l'utilisation de bioessais avec des organismes benthiques directement en contact avec les sédiments serait plus pertinente pour l'étude de la toxicité des MES et sédiments.

Notre tentative de relier la toxicité observée avec la spéciation dans le milieu a montré à la fois l'intérêt et les limites des outils utilisés. Pour les bioessais, les résultats on montré que la simplification des tests avait ses limites si l'on veut rester réaliste par rapport aux conditions environnementales. D'autre part, la modélisation par MINEQL+ n'a pas toujours permis de relier la toxicité avec les concentrations calculées en ion libre, même quand l'ensemble des ligands présents pouvait être pris en considération (milieux artificiels). La mesure de l'ion labile en milieu naturel pose par ailleurs des problèmes analytiques qui ne sont pas encore complètement résolus (les mesures par DPASV effectuées en sont un exemple). Cependant, afin d'apporter des réponses sur la biodisponibilité des métaux, il est indispensable de mener cette double approche. On peut espérer que les développements dans les domaines de la chimie analytique, de la modélisation de la spéciation ainsi que de la mesure des effets biologiques permettront petit à petit d'apporter des informations plus fiables et utilisables *in situ*.

5.2 Détection des complexes lipophiles dans l'environnement

Nous avons observé par des expériences en laboratoire l'effet potentiel des complexes lipophiles des métaux (CLM), dont l'intérêt est d'illustrer les exceptions possibles au modèle de biodisponibilité de l'ion libre. Il est désormais nécessaire de vérifier sur le terrain la présence des CLM. A ce propos, plusieurs techniques seraient envisageables pour la séparation de la fraction lipophile des métaux. Des utilisations de cartouches SPE-C18 pour la séparation des CLM n'ont jusqu'à présent pas donné de résultats satisfaisants, comme nous l'avons constaté lors d'une campagne préliminaire sur 5 rivières en Suisse et quelques essais sur les eaux de ruissellement viticoles. Ceci peut être expliqué par le fait qu'un grand nombre de complexes organiques des métaux, en particulier pour le cuivre, est retenu par ce type d'extraction, comme l'ont montré en conditions marines Yoon *et al.* (1999). D'autre part, certains complexes organiques ne sont pas retenus par ce type d'extraction.

D'autre part, des extractions liquide/liquide par solvant organique seraient envisageable. Cependant, il serait nécessaire de vérifier au préalable que les CLM ne soient pas altérés lors du changement de phase.

Un effort méthodologique et analytique reste donc à fournir avant de pouvoir se prononcer plus précisément sur la présence des CLM dans l'environnement et de leur origine (MON ou molécules d'origine anthropiques).

5.3 Identification des mécanismes de biodisponibilité

La méthodologie que nous avons adopté n'avait pas pour but de donner des informations détaillées sur les mécanismes de biodisponibilité du cuivre pour les micro-organismes. Mais il apparaît à la lecture des résultats que des lacunes persistent dans la validation des effets observés par le calcul de la spéciation par modélisation chimique, surtout pour ce qui est des études d'échantillons complexes. Un moyen d'observer par exemple la biodisponibilité du cuivre sous forme d'ion libre, de complexe lipophile ou colloïdale serait d'utiliser des méthodes telles que la RPE (résonance paramagnétique électronique), qui permet d'obtenir des information précises sur l'évolution de la coordination des espèces chimiques en solution, à la surface puis dans les organismes. Quelques études prometteuses sur des levures ont déjà montré des résultats intéressant concernant la connaissance de l'interaction du cuivre avec des ligands organiques (Debongnie *et al.*, 1987 ; Debongnie *et al.*, 1991 ; François *et al.*, 1997).

5.4 Cuivre et produits phytosanitaires en viticulture

Les études de laboratoire et les caractérisations effectuées sur le terrain mettent en lumière qu'une utilisation de multiples produits phytosanitaires (plus de 16 molécules pendant la période d'étude, avec des changements d'une année sur l'autre) a pour conséquence de rendre très complexe l'évaluation de l'exposition aux produits phytosanitaires : chaque molécule nécessiterait en effet une évaluation précise de ses effets et de son devenir. Avec l'exemple du cuivre, nous avons observé que son transport dans les eaux et sa biodisponibilité est à la fois déterminé par les facteurs liés à la nature des sols (ligands organiques, inorganiques…) et par les paramètres hydrologiques. Si l'observation d'événement pluvieux particulièrement intenses est spécifique aux zones méditerranéennes, des résultats similaires ont été observés dans d'autres contextes (Xue *et al.*, 2000).

D'autre part, par l'interaction du cuivre avec l'ensemble des produits phytosanitaires apportés, ces derniers peuvent potentiellement augmenter la biodisponibilité du cuivre, comme nous l'avons observé avec les complexes lipophiles des métaux. Peu d'études de terrain existent à ce sujet (Phinney and Bruland, 1997a ; Phinney and Bruland, 1997b) et il serait intéressant d'étudier les interactions cuivre/pesticides organiques dans les eaux de ruissellement des parcelles viticoles du bassin versant de Roujan.

Dans ce cadre, des études *in situ* sur la biodiversité et la sensibilité des espèces autochtones (algues et bactéries périphytiques, par exemple), ainsi que des analyses de spéciation chimique intégratrices (ex. : DGT) pourraient permettre d'évaluer plus précisément l'exposition des écosystèmes aquatiques au cuivre (Denney *et al.*, 1999).

Enfin, concernant les solutions éventuelles à apporter, certaines études envisagent de mettre en place des systèmes de rétention des particules avant qu'elles ne rejoignent les milieux naturels, comme dans le cas des ruissellement d'origine minière (Nriagu *et al.*, 1998). Mais si cela est envisageable pour des cultures comme la tomate (Gallagher *et al.*, 2001), il est difficilement envisageable d'équiper des bassins versants viticoles entiers, en particulier en zone méditerranéenne où des volumes d'eau et de MES très importants seraient à traiter lors des quelques crues majeures. La solution la plus évidente pour limiter les apports de produits phytosanitaires vers les écosystèmes aquatiques par ruissellement reste la mise en place d'une agriculture raisonnée.

COMMUNICATIONS ISSUES DE LA THESE

Les expérimentations et travaux de terrain ont été soutenu par deux programmes scientifiques nationaux, dont sont issus plusieurs rapports d'avancement intermédiaires et finaux :

Programme PNETOX 1999-2001 (Programme National de Recherche en Écotoxicologie en France) « Spéciation, biodisponibilité et toxicité du cuivre dans les sols et les sédiments d'un bassin versant viticole en Languedoc-Roussillon », sous la coordination de M. Philippe Hinsinger (Chargé de recherche à l'INRA, UFR de Science du Sol, Montpellier).

Projet FNSRS 1999-2001 (Fonds National de Recherche Scientifique en Suisse) n° 2000-057189 *« Partition of trace metals and their bioavailability in continental surface water »*, sous la coordination de M. Janusz Dominik (Professeur à l'Institut Forel, Université de Genève).

Une partie des résultats obtenus sont ont été publiés ou sont soumis pour une publication dans des revues scientifiques à comité de lecture :

Gilbin R., Guéguen C., Pardos M., Gomez E., Persin F., Casellas C. (2001). Bioavailability of Lipophilic Metal Complexes to *Vibrio fischeri* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, submitted.

Guéguen C., Gilbin R., Pardos M., Dominik J. (2001). Use of microbiotests to assess the metal toxicity in a polluted river : the Upper Vistula River (Poland). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, submitted.

D'autre part, ce travail a fait l'objet de plusieurs communications orales et par poster à des congrès scientifiques internationaux (*personne ayant présenté la communication en gras*) :

Gilbin R., Casellas C., Andrieux P., Hinsinger P., Pardos M., Wildi W. (1999). Copper speciation, bioavailability and toxicity for continental aquatic ecosystems. Example of a wine-growing mediterranean catchment (Southern France). *Proc. EURESCO Conference on Natural Waters and Water Technology « Chemical Speciation of Metals and Bioavailability »*, 15-20 oct. 1999, Castelvecchio Pascoli, Italie. Poster.

Gilbin R., Casellas C., Gomez E., Balaguer P., Pardos M., Wildi W. (2000). Copper Speciation and Bioavailability in Agricultural Watersheds. *Proc. 3rd SETAC World Congress*, 21-25 mai 2000, Brighton, UK. Poster.

Gilbin R., Guéguen C., Pardos M., Dominik J. (2000). Trace Metal Bioavailability in a Polluted River : The Upper Vistula River (Southern Poland). *Proc. ASLO Aquatic Sciences Meeting « Research Across Boundaries »*, 5-9 juin 2000, Copenhagen, Danmark. Poster.

Guéguen C., Loizeau J.-L., Gilbin R., Arpagaus P., Pardos M., **Dominik J.** (2000). Separation and characterisation of colloidal material in natural waters using tangential flow ultrafiltration : example of the Upper Vistula River. *Proc. 4th International Conference and 16th National Conference « Water Supply and Water Quality »*, 11-13 Sept. 2000, Krakow, Poland. Poster.

Gilbin R., Pardos M., Andrieux P., Gomez E., Devez A., Casellas C. (2000). Coupling Speciation and Bioassays for Copper Bioavailability Assessment in Runoff Waters. *Proc.8th European Conference on Analytical Chemistry, 8th Workshop on Progress in Analytical Methodologies for Trace Metal Speciation*, 5 sept. 2000, Lisboa, Portugal. Poster.

Guéguen C., Gilbin R., **Dominik J.**, Pardos M. (2000) Role of the colloidal fraction in metal distribution in the Vistula River, Poland. *Proc. 5th International Symposium & Exhibition on Environmental Contamination in Central & Eastern Europe*, 12-14 Sept. 2000, Prague, Czech Republic. Poster.

Gilbin R., Pardos M., Andrieux P., Gomez E., Devez A., Casellas C. (2000). Bioavailability of copper in runoff water of a wine-growing Mediterranean catchment (Southern France). *Proc. 7'th FECSConference on Chemistry and the Environment « Metal Speciation in the Aquatic Environment »*, August 27-30, 2000, Porto, Portugal. *Environmental Sciences and Pollution Research*, Special Issue 1, p26. Oral communication.

Devez A., **Gilbin R.**, Gomez E., Andrieux P., Persin F., Casellas C. (2001) Bioavailability of copper, zinc and arsenic species in runoff waters from contrasted fields in a Mediterranean vineyard catchment. *Proc. 11th SETAC Europe Annual Meeting*, May 6-10, 2001, Madrid, Spain. Poster.

Gilbin R., Guéguen C., Gomez E., Pardos M., Casellas C. (2001). Bioavailability of Lipophilic Metal Complexes to *Vibrio fisheri* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Proc. 11th SETAC Europe Annual Meeting*, May 6-10, 2001, Madrid, Spain. Oral communication.

BIBLIOGRAPHIE

A

1. AFNOR (1977a). Détermination de la résistivité ou de la conductivité électrique. *Norme AFNOR* **NFT90-031**.
2. AFNOR (1977b). Détermination de l'alcalinité (titre alcalimétrique et titre alcalimétrique complet). *Norme AFNOR* **NFT90-036**.
3. AFNOR (1985). Guide pour la détermination du carbone organique total. *Norme AFNOR* **NFT90-102**.
4. Allen H. and Hansen D. (1996). The importance of trace metal speciation to water quality criteria. *Water Environment Research* **68**(1):42-54.
5. Andreae M. (1977). Determination of As species in natural waters. *Anal. Chem.* **49**(6):820-823.
6. Andrieux P., Bouzigues R., Joseph C. *et al.* (1993). Le bassin versant de Roujan - Caractéristiques générales du milieu. *Rapport* **INRA Montpellier - UFR Sciences du Sol**.
7. Andrieux P., Louchart X. and Voltz M. (1998). Effect of agricultural practices on runoff and erosion in vineyard fields in a mediterranean climate. *Annales Geophysicae* **Suppl 2**(XXIIIe EGS General Assembly, Nice, 20-24/04/1998).
8. Ankley G., Peterson G. and Amato J. (1990). Evaluation of Sucrose as an Alternative to Sodium Chloride in the Microtox Assay : Comparison to Fish and Cladoceran Tests with Freshwater Effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry* **9**(10):1305.
9. APHA, *Ed.* (1985). Standard Methods for the examination of water and wastewater. Washington, APHA, 16th edition. 1268 pp.
10. Apte S. and Batley G. (1995). Trace metal modelling of labile chemical species in natural waters: Non-Electrochemical approaches. In: « *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems* ». Tessier A. and Turner D.R. *Eds*. Chichester, John Wiley and Sons. p 259-306.
11. Astruc M., Lecomte J. and Mericam P. (1981). Evaluation of methods for speciation of heavy metals in water. *Environmental Technology* **2**:1-8.
12. AVC (2001). La protection raisonnée du vignoble en Champagne. *Association Viticole Champenoise* **http://www.avc.net/**.
13. Azenha M., Vasconcelos M. and Cabral J. (1995). Organic ligands reduce copper toxicity in *Pseudomonas syringae*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14:**369-373.

B

14. Baker J., Laflen J. and Johnson H. (1978). Effect of tillage systems on runoff losses of pesticides, a rainfall simulation study. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* **21:**886-892.
15. Barata C., Baird D. and Markich S. (1999). Comparing metal toxicity among *Daphnia magna* clones: An approach using concentration-time-response surfaces. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **37**(3):326-331.

16. Besnard E. (1999). Influence d'amendements organiques sur la rétention du cuivre dans les sols du vignoble de Champagne : conséquences environnementales. Thèse de doctorat, UFR Sciences exactes et Naturelles, Université de Reims Champagne-Ardennes. 102 pp.

17. BIPM (1998). Le Système international d'unités (SI). Bureau international des poids et mesures, Paris, Organisation intergouvernementale de la Convention du Mètre. 79pp.

18. Bitton G. and Morel J. (1997). Microbial enzyme assay for the detection of heavy metal toxicity. In: « *Microscale Testing in Aquatic Toxicol. Advances, Techniques, and Practice* ». Wells P., Lee K. and Blaise C. *Eds*. Boca Raton, CRC Press. p 143-152.

19. Björklund L. and Morrison G. (1997). Determination of copper speciation in freshwater samples through SPE-spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta* **343**:259-266.

20. Blaise C., Férard J. and Vasseur P. (1998). Microplate toxicity tests with microalgae: A review. In: « *Microscale Testing in Aquatic Toxicol. Advances, Techniques, and Practice* ». Wells P., Lee K. and Blaise C. *Eds*. Boca Raton, CRC Press. p 269-288.

21. Blaise C., Forghani R., Legault R. *et al.* (1994). A bacterial toxicity assay performed with microplates, microluminometry and Microtox reagent. *Biotechniques* **16**(5):932-937.

22. Block M. and Glynn A. (1992). Influence of xanthanates on the uptake of ^{109}Cd by Eurasian dace (*Phoxinus phoxinus*) and Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **11**:873.

23. Block M., Glynn A. and Pärt P. (1991). Xanthate effects of cadmium uptake and intracellular distribution in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. *Aquatic Toxicology* **20**(4):267-284.

24. Block M. and Pärt P. (1986). Increased availability of cadmium to perfused rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) gills in the presence of the complexing agents diethyldithiocarbamate, ethyl xanthate and isopropylxanthate. *Aquatic Toxicology* **8**:295-302.

25. Bonnemain H. and Dive D. (1990). Studies on synergistic toxic effects of copper and dithiocarbamate pesticides with the ciliate protozoan *Colpidium campylum* (Stokes). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **19**:320-326.

26. Borgman U. and Ralph K. (1983). Complexation and toxicity of copper and the free metal bioassay technique. *Water Research* **17**(11):1697-1703.

27. Branch S., Corns W., Ebdon L. *et al.* (1991). Determination of As by hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry using a tubular membrane gas-liquid separator. *Journal of Analytical Atomic Spectroscopy* **6**:155-158.

28. Brun L. (1998). Etude de l'accumulation, de la biodisponibilite et de la phytotoxicite du cuivre dans les sols viticoles de l'Hérault. Thèse de doctorat, Biologie de l'évolution et écologie, ENSA Montpellier. 212 pp.

29. Buffle J. (1988). Complexation reactions in aquatic systems: An analytical approach. New York, Ellis Horwood, John Wiley and Sons. 692 pp.

30. Burkitt M., Bishop H., Milne L. *et al.* (1998). Dithiocarbamate Toxicity toward Thymocytes Involves Their Copper-Catalyzed Conversion to Thiuram Disulfides, Which Oxidize Glutathione in a Redox Cycle without the Release of Reactive Oxygen Species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **353**(1):73-83.

31. Butcher S., Charlson R., Orians G. *et al.*, *Eds.* (1992). Global Biogeochemical Cycles. International Geophysics Series. London, Academic Press. 347 pp.

C

32. Cairns J. and Pratt J. (1989). The scientific basis of bioassays. In: « *Environmental Bio-assay Techniques and their Application* ». Munawar M., Dixon G., Mayfield C. *et al. Eds*. Dordrecht, Kluwer Academic Pubs. p 5-20.

33. Campbell P. (1995). Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. In: « *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems* ». Tessier A. and Turner D.R. *Eds*. Chichester, John Wiley and Sons. p 45-102.

34. Campbell P., Twiss M. and Wilkinson K. (1997). Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**:2543-2554.

35. Canna-Michaelidou S., Nicolaou A., Neopfytou E. *et al.* (2000). The use of a battery of microbiotests as a tool for integrated pollution control: evaluation and perspectives in Cyprus. In: « *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring 1-Reviews on Toxicity Tests Contribution 4* ». Persoone G.J., C De Coen, W *Ed.* New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers. p 27-38.

36. Carlson-Ekvall C. and Morrison G. (1995a). Contact Toxicity of Metals in Sewage Sludge: Evaluation of Alternatives to Sodium Chloride in the Microtox Assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**(1):17.

37. Carlson-Ekvall C. and Morrison G. (1995b). Toxicity of the copper in the presence of organic substances in sewage sludge. *Environmental Technology* **16**(3):243-251.

38. Castillo G., Vila I. and Neild E. (2000). Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. *Environmental Toxicology* **15**(5):370-375.

39. CCMRE (2001). Recommandations canadiennes pour la qualité des eaux : protection de la vie aquatique — tableau sommaire mis à jour, ISBN 1-896997-36-8, Conseil canadien des ministres de l'environnement, Extrait de la publication no 1300.

40. Chapman P. and Caldwell R. (1996). A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use (Letter to the editor). *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(2):77-79.

41. Cheng J. and Chakrabarti C. (1994). Chemical speciation of Cu, Zn, Pb and Cd in rain water. *Analytica Chimica Acta* **288**:141-156.

42. Cooper C. (2001). Use of Microtox for Assessing Heavy Metal Complex Formation With the Organic Solvents Acetontrile and Dimethyl Sulphoxide: A Preliminary Study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **67**(4):526-534.

43. Coulouma G. (1998). Erosion hydrique à l'échelle de la parcelle de vigne en milieu méditerranéen. Rapport de maîtrise, Géographie physique, INRA Montpellier - Université d'Avignon. 47 pp.

44. Croot P., Karlson B., Van E., J *et al.* (1999a). Uptake of Cu-64-oxine by marine phytoplankton. *Environmental Science and Technology* **33**(20):3613-3619.

45. Croot P., Moffett J. and Luther G. (1999b). Polarographic determination of half-wave potentials for copper-organic complexes in seawater. *Marine Chemistry* **67**(3-4):219-232.

D

46. Deaver E. and Rodgers J.H.J. (1996). Measuring bioavailable copper using anodic stripping voltammetry. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(11):1925-1930.
47. Debongnie P., Mestdagh M., Domard A. *et al.* (1991). Interactions between pectins and multivalent cations. *Food Hydrocolloids* **5**(1/2):109-111.
48. Debongnie P., Mestdagh M. and Rinaudo M. (1987). An E.P.R. potentiometric study of the complexation of copper ions by galacturonic acid and galacturonans. *Carbohydrate Research* **170**:137-149.
49. Denney S., Sherwood J. and Leyden J. (1999). In situ measurements of labile Cu, Cd and Mn in river waters using DGT. *The Science of the Total Environment* **239**(1-3):71-80.
50. Devez A. (2000). Spéciation physico-chimique du cuivre dans les eaux de ruissellement de parcelles viticoles : Apport de la voltampérométrie (DPASV). Rapport de DEA, Sciences de l'eau dans l'environnement continental, Université Montpellier 1 / ENGREF. 52 pp.
51. Di Toro D., Allen H., Bergman H. *et al.* (1999). A Biotic Ligand Model of the acute toxicity of metals. I. Technical basis., EPA 822-E-99-001, Washington, US Environmental Protection Agency.
52. Di Toro D., Allen H., Bergman H. *et al.* (2001). Biotic Ligand Model of acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(10):2383–2396.
53. Dombroski E., Gaudet I. and Florence L. (1996). A Comparison of Techniques Used to Extract Solid Samples Prior to Acute Toxicity Analysis Using the Microtox Test. *Environmental Toxicology and Water Quality* **11**(2):121-128.
54. Domek M., LeChevallier M., Cameron S. *et al.* (1984). Evidence for the role of copper in the injury process of coliform bacteria in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* **48**(2):289-293.
55. Duursma E. and Carroll J., *Eds.* (1996). Environmental Compartments - Equilibria and assessment of Processes between Air, Water, Sediment and Biota. Berlin, Springer-Verlag. 277 pp.

E

56. Efron B. (1981). Non parametric estimates of standard error: the jack-knife, the bootstrap and other methods. *Biometrika* **68**:589-599.
57. Elbaz-Poulichet F. (1988). Apports fluviatiles et estuariens de plomb, cadmium er cuivre aux océans, Comparaison avec l'apport atmosphérique. Thèse de doctorat, Sciences Naturelles, Université Paris VI. 288 pp.
58. Environment-Canada (1992). Biological test method: growth inhibition test using the freshwater alga Selenastrum capricornutum, EPS 1/RM/25, Ottawa, Environment Canada.
59. Eriksen R., Mackey D., van Dam R. *et al.* (2001). Copper speciation and toxicity in Macquarie Harbour, Tasmania: an investigation using a copper ion selective electrode. *Marine Chemistry* **74**:99–113.

60. Errecalde O., Seidl M. and Campbell P. (1998). Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*: An exception to the free-ion model. *Water Research* **32**(1998):419-429.

61. Eyrolle F. and Benaim J.-Y. (1999). Metal available sites on colloidal organic compounds in surface waters (Brazil). *Water Research* **33**(4):995-1004.

F

62. Flemming C. and Trevors T. (1989). Copper toxicity and chemistry in the environment: A review. *Water Air and Soil Pollution* **44**:143-158.

63. Florence T. (1982a). Development of physico-chemical speciation procedures to investigate the toxicity of copper, lead, cadmium and zinc towards aquatic biota. *Analytica Chimica Acta* **141**:73-94.

64. Florence T. (1982b). The speciation of trace elements in waters. *Talanta* **29**:345-364.

65. Florence T., Lumsden B. and Fardy J. (1983). Evaluation of some physico-chemical techniques for the determination of the fraction of dissolved copper toxic to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Analytica Chimica Acta* **151**:281-295.

66. Florence T., Powell H., Stauber J. *et al.* (1992). Toxicity of lipid-soluble copper(II) complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*: amelioration by humic substances. *Water Research* **26**(9):1187-1193.

67. Florence T.M. and Stauber J.L. (1986). Toxicity of copper complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Aquatic Toxicology* **8**(1):11-26.

68. Flores-Rodriguez J. (1992). Les métaux toxiques dans les eaux pluviales en milieu urbain: Caractéristiques physico-chimiques. Thèse de doctorat, Sciences et techniques de l'environnement, Université Paris XII. 229 pp.

69. Flores-Rodriguez J., Bussy A. and Thévenot D. (1994). Toxic metals in urban runoff: Physico-chemical mobility assessment using speciation schemes. *Water Science and Technology* **29**(1-2):83-93.

70. Fochtman P., Raszka A. and Nierzedska E. (2000). The use of conventional bioassays, microbiotests, and some rapid methods in the selection of an optimal test battery for the assessment of pesticides toxicity. *Environmental Toxicology* **15**:376-384.

71. François J., Heitz C. and Mestdagh M. (1997). Spectroscopic study (UV-visible and electron paramagnetic resonance) of the interactions between synthetic polycarboxylates and copper ions. *Polymer* **38**(21):5321-5332.

72. Franklin N., Stauber J. and Lim R. (2001). Development of floy cytometry-based algal bioassay for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(1):160–170.

73. Froehner K., Backhaus T. and Grimme L.H. (2000). Bioassays with *Vibrio fisheri* for the assessment of delayed toxicity. *Chemosphere* **40**(8):821-828.

74. Fukushima M., Taga M. and Nakamura H. (1994). Interaction between humic acids and copper(II) oxinate. *Analytica Chimica Acta* **289**(2):223-230.

G

75. Gagné F., Blaise C., VanAggelen G. *et al.* (1999). Intercalibration study in the evaluation of toxicity with rainbow trout hepatocytes. *Environmental Toxicology* **14**(4):429-437.

76. Gallagher D., Johnston K. and Dietrich A. (2001). Fate and Transport of Copper-based Crop Protectants in Plasticulture Runoff and the Impact of Sedimentation as a Best Management Practice. *Water Research* **35**(12):2984-2994.

77. Garay F. and Solis V. (1999). Square wave stripping voltametry of Cd-oxine complexes; surface redox reactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **476**:165-170.

78. Garay F., Solis V. and Lovric M. (1999). Cathodic stripping square wave voltametry of Cu(II)-oxine complexes. A mechanistic study. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **478**:17-24.

79. Garric J., Migeon B. and Vindimian E. (1990). Lethal effects of draining on brown trout. A predictive model based on field and laboratory studies. *Water Research* **24**:59-65.

80. Geis S., Reynolds L., Karner D. *et al.* (2000). Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**(1):36–41.

81. Gellert G. (2000). Sensitivity and significance of luminescent bacteria in chronic toxicity testing based on growth and bioluminescence. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **45**(1):87-91.

82. Gellert G. and Stommel A. (1999). Influence of microplate material on the sensitivity of growth inhibition tests with bacteria assessing toxic organic substances in water and waste water. *Environmental Toxicology* **14**(4):424 - 428.

83. Giesy J. (1983). Metal binding capacity of soft organic-rich waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* **6**:203 –224.

84. Giesy J., Leversee G. and Williams D. (1977). Effects of naturally occurring aquatic organic fractions on cadmium toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Daphnidae) and *Gambusia affinis* (Poeciliidae). *Water Research* **11**:1013-1020.

85. Grassi M.T., Shi B. and Allen H.E. (1997). Sorption of copper by suspended particulate matter. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **120**(1-3):199-203.

86. Guéguen C. (2001). Le rôle des colloïdes dans la répartition des métaux trace en milieu aquatiques contrastés. Thèse de doctorat, Sciences, Interdisciplinaire, Université de Genève. 293 pp.

87. Guéguen C. and Dominik J. (2001). Partitioning of trace metals between particulate, colloidal and truly dissolved fractions in a polluted river: the Upper Vistula River (Poland). *Applied Geochemistry* (submitted).

88. Guéguen C., Gilbin R., Pardos M. *et al.* (2001a). Water toxicity and metal contamination assessment in a polluted river: the Upper Vistula River (Poland). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (submitted).

89. Guéguen C., Koukal B., Dominik J. *et al.* (2001b). Complexation of Cd and Zn with standard humic substances and the green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry* (submitted).

90. Guy R. and Kean A. (1980). Algae as a chemical speciation monitor. I- A comparison of algal growth and computer calculated speciation. *Water Research* **14**:891-899.

H

91. Haley M., Johnson D., Hart G. *et al.* (1986). The toxicity of brass dust to the microalgae Ankistrodesmus falcatus and *Selenastrum capricornutum*. *Journal of Applied Toxicology* **6**(4):281-285.

92. Hall L., Scott M. and Killen W. (1998). Ecological risk assessment of copper and cadmium in surface waters of Chespeake Bay watershed. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**(6):1172-1189.

93. Harkey G. and Young T. (2000). Effect of Soil Contaminant Extraction Method in Determining Toxicity Using the Microtox Assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**(2):276–282.

94. Harwood M. (1994). Evaluation de la spectrophotométrie comme technique d'estimation de la densité cellulaire lors des essais de toxicité avec *Selenastrum capricornutum*. Rapport Scientifique et Technique, ST-9, Montréal, Environnement Canada - région du Québec, Conservation de l'environnement, Centre Saint-Laurent.

95. Haughey M., Anderson M., Whitney R. *et al.* (2000). Forms and fate of Cu in a source drinking water reservoir following CuSO4 treatment. *Water Research* **34**(13):3440-3452.

96. He M., Wang Z. and Tang H. (2001). Modeling the ecological impact of heavy metals on aquatic ecosystems: a framework for the development of an ecological model. *The Science of the Total Environment* **266**(1-3):291-298.

97. Hering J., Sunda W., Ferguson R. *et al.* (1987). A field comparison of two methods for the determination of copper complexation: bacterial bioassay and fixed potential amperometry. *Marine Chemistry* **20**:299-312.

98. Hill A. (1910). The possible effects of aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *Journal of Physiology (London)* **40**:IV-VII.

99. Huang F., Bitton G. and Kong I. (1999). Determination of the heavy metal binding capacity of aquatic samples using MetPLATE(TM): A preliminary study. *The Science of the Total Environment* **234**(1-3): 139-145.

100. Huber A., Bach M. and Frede H. (1998). Modeling pesticide losses with surface runoff in Germany. *The Science of the Total Environment* **223**(2-3):177-191.

101. Hudson R. (1998). Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota? Observations and predictions of non-equilibrium effects. *The Science of the Total Environment* **219**:95-115.

102. Hunt J., Andersona B., Phillipsa B. *et al.* (1999). Patterns of aquatic toxicity in an agriculturally dominated coastal watershed in California. *Agriculture, Ecosystem and Environment* **75**(1-2):75-91.

103. Hyun S., Cho Y., Kim S. *et al.* (2000). Cu(II) Sorption Mechanism on Montmorillonite: An Electron Paramagnetic Resonance Study. *Journal of Colloid and Interface Science* **222**(2):254-261.

I

104. ICA (1995). The biological importance of copper, a litterature review. Document Internet, http://environment.copper.org/e_review.htm, Lewis A.G. *Ed.*, International Copper Association.

105. IFEN (1998). Les pesticides dans les eaux - Usages, origines et pertinence du suivi. Rapport 1997, Paris, Institut Français de l'Environnement.

106. INERIS (2001). Fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Fiches (http://www.ineris.fr/recherches/fiches/fiches1.htm), Paris, INERIS-DRC.

107. Iqbal M. (1992). Copper speciation in River Rhine water. MSc thesis, Environmental sciences, Delft University. 214 pp.

108. Isnard P., Flammarion P., Roman G. *et al.* (2001). Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. *Chemosphere* **45**(4-5):659-669.

109. ISO (1989). Qualité de l'eau - Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec *Scenedesmus subcapitatus* ou *Selenastrum capricornutum*. Norme, ISO8692:1989(F), Genève, International Standard Organisation.

J

110. Jauzein M., Jourdain M.-J., Bispo A. *et al.* (1999). Ecotoxicité des sols et des déchets : extraction des polluants. Données et Références, Paris, ADEME.

111. Jennings L., Rayner-Brandes M. and Bird D. (2001). Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*Vibrio fischeri*): a comparison of three commercial systems. *Water Research* **35**(14):3448-3456.

112. Jensen D., Ledin A. and Christensen T. (1999). Speciation of heavy metals in landfill-leachate polluted groundwater. *Water Research* **33**(11):2642-2650.

113. Jouany J. (1995). Etablissement d'une liste de substances phytosanitaires utilisées en agriculture à surveiller dans le bassin Lémanique : Méthodologie. Rapport de Campagne (1994), Genève, Commission Internationale pour la Protection des Eaux du Léman Contre la Pollution.

114. Jung K., Bitton G. and Koopman B. (1996). Selective assay for heavy metal toxicity using fluorogenic substrate. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(5):711–714.

K

115. Kaiser K. (1998). Correlations of *Vibrio fisheri* bacteria test data with bioassay data for other organisms. *Environ Health Perspectives* **106**(Supp2):583-591.

116. Karthikeyan K. and Elliott H. (1999). Surface Complexation Modeling of Copper Sorption by Hydrous Oxides of Iron and Aluminum. *Journal Colloid and Interface Sciences* **220**(1):88-95.

117. Kim S. (1999). Effectis of complexation kinetics on bioavailability of copper to *Ceridaphnia dubia*. PhD thesis, Civil and Environmental Engineering, University of Deleware. 202 pp.

118. Kim S., Ma H., Allen H. *et al.* (1999). Influence of dissolved organic matter on the toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*: Effect of complexation kinetics. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**(11):2433-2437.

L

119. Lage O., Soares H., Vasconcelos M. *et al.* (1996). Toxic effects of copper(II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium caterae* - Influence on metal speciation. *European Journal of Phycology* **31**:341-348.

120. Lara-Cazenave M., Levy V., Castetbon A. *et al.* (1994). Pollution d'eaux de ruissellement par les métaux lourds en zone urbaine. II- Spéciation. *Environmental Technology* **15**:1149-1159.

121. Lau S. and Chu L. (1999). Contaminant release from sediment in a coastal wetland. *Water Research* **33**(4):909-918.

122. Laxen D. and Harrison R. (1981). A scheme for the physico-chemical speciation of trace metals in freshwater samples. *The Science of the Total Environment* **19**:59-82.

123. Lennartz B., Louchart X., Voltz M. *et al.* (1997). Diuron and Simarzine losses to runoff water in mediterranean vineyards. *Journal of Environmental Qualality* **26**(6):1493-1502.

124. Leonard J. and Andrieux P. (1998). Infiltration characteristics of soils in Mediterranean vineyards in Southern France. *Catena* **32**(3-4):209-223.

125. Leonard R. (1990). Movement of pesticides into surface waters. In: « *Pesticides in the soil environment* ». Madison, Soil Science Society of America. p 303-348.

126. Loehr R., Haith D. and Walter M. (1978). Best Management Practice in Agriculture and Silviculture. Proc. 10th Cornell Agric. Waste Manage. Conf. Cornell Agric. Waste Manage. Conf., West Chester, Ann Arbor Sci.

127. Louchart X., Causeret F., Dejean C. *et al.* (1997). Première évaluation des risques et origines de la pollution diffuse des eaux de surface par les pesticides en zone viticole languedocienne. Rapport interne, Montpellier, INRA - UMR Sciences du Sol.

128. Lukavski J. (1992). The evaluation of algal growth potential (AGP) and toxicity of water by miniaturized growth bioassay. *Water Research* **26**(10):1409-1414.

M

129. Ma H., Kim S., Cha D. *et al.* (1999). Effect of kinetics of complexation by humic acid on toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**(5):828-837.

130. Marquardt D. (1963). An algorithm for the least squares estimation of non-linear parameters. *J. Soc. Indus. Appl. Math.* **11**:431-441.

131. Marsalek B. and Rojickova-Padrtova R. (2000). Selection of a battery of microbiotests for various purposes - The Czech experience. In: « *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring 2- Toxicity Testing for Regulatory Purposes Contribution 8* ». Persoone G., Janssen C. and De Coen W. *Eds.* New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers. p 95-101.

132. Martell A. (1964). Stability constants of metal-ion complexes. Section II: Organic Ligands. London, The Chemical Society. 687 pp.

133. Maxam G., Rila J.-P., Dott W. *et al.* (2000). Use of Bioassays for Assessment of Water-Extractable Ecotoxic Potential of Soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **45**(3):240-246.

134. Mayer P., Cuhel R. and Nyholm N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* **31**(10):2525-2531.

135. Mayfield C. (2001). Microorganisms and their Application to Bioassay Testing. Rapport internet (http://bordeaux.uwaterloo.ca/biol446/ecochap.htm), Waterloo, Dept. of Biology, University of Waterloo.

136. McKnight D. (1981). Chemical and biological process controlling the response of a freshwater ecosystem to copper stress: a field study of CuSO4 treatment of Mill Pond Reservoir, Burlington, Massachusetts. *Limnology and Oceanography* **23**:268-282.

137. Microbics-Corporation (1992). Microtox® manual. A toxicity testing handbook. Rapport technique, Carlsbaad, Microbics Corporation.

138. Miller J. and Miller J. (1988). Statistics for Analytical Chemistry - 2nd Ed. Chichester, Ellis Horwaad Ltd. 227 pp.

139. Miquel G. (2001). Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Rapport parlementaire, N° 2979 / N° 261, Paris, Assemblée Nationale / Sénat, Office partementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques.

140. Moffett J. (1997). Cu speciation and cyanobacterial distribution in harbors subject to anthropogenic Cu inputs. *Limnology and Oceanography* **42**(5):789-799.

141. Moffett J. and Brand L. (1996). Production of strong, extracellular Cu chelators by marine cyanobacteria in response to Cu stress. *Limnology and Oceanography* **41**(3):388-395.

142. Morel F. (1983). Principles of Aquatic Chemistry. New York, Wiley-Interscience. 301 pp.

143. Morel J., Bitton G. and Koopman B. (1988). Use of Microtox® for assessing copper complexation with organic compounds. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **17**:493-496.

144. Morrison G. (1987). Bioavailable metal uptake rate determination in polluted waters by dialysis with receiving resins. *Environmental Technology* **8**:393-402.

145. Morrison G. and Revitt D. (1987). Assessment of metal species bioavailability and geochemical mobility in polluted waters. *Environmental Technology* **8**:361-372.

146. Mota A. and Correira dos Santos M. (1995). Trace metal speciation of labile chemical species in natural waters: Electrochemical methods. In: « *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems* ». Tessier A. and Turner D.R. *Eds*. Chichester, John Wiley and Sons. p 205-258.

147. Muller F. (1996). Interactions of copper, lead and cadmium with the dissolved, colloidal and particulate components of estuarine and coastal waters. *Marine Chemistry* **52**:245-268.

148. Munkittrick K., Power E. and Sergy G. (1991). The relative sensitivity of Microtox, daphnid, rainbow trout, and fathead minnow acute lethality tests. *Environmental Toxicology and Water Quality* **6**(1):35-62.

N

149. Newman M. and Jagoe C. (1994). Ligands and the bioavailability of metals in aquatic environments. In: « *Bioavailability - Physical, Chemical, and biological interactions* ». Hamelin J.L.L., P.F. Bergman, H.L. Benson, W.H. *Ed.* USA, Lewis Pub. Inc. p 39-61.

150. Nirel P. and Morel F. (1990). Pitfalls of sequential extractions. *Water Research* **28**(8):1055-1056.

151. Nriagu J., Wong H., Lawson G. *et al.* (1998). Saturation of ecosystems with toxic metals in Sudbury basin, Ontario, Canada. *The Science of the Total Environment* **223**(2-3):99-117.

O

152. Obrador A., Rico M., Mingot J. *et al.* (1997). Metal mobility and potential bioavailability in organic matter-rich soil-sludge mixtures: Effect of soil type and contact time. *The Science of the Total Environment* **206**(2-3):117-126.

153. Obst U., Wessler A. and Wiegand-Rosinus M. (1997). Enzyme inhibition for examination of toxic effects in aquatic systems. In: « *Microscale Testing in Aquatic Toxicol. Advances, Techniques, and Practice* ». Wells P., Lee K. and Blaise C. *Eds*. Boca Raton, CRC Press. p 77-94.

154. OCDE (1984). Algues, essai d'inhibition de la croissance - Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Ligne directrice n°201, Organisation pour la Coopération et le Développement Economique.

155. OCDE (1999). Données OCDE sur l'environnement. Compendium de données (1999), Paris, Organisation pour la Coopération et le Développement Economique.

156. O'Donnel J., Kaplan B. and Allen H. (1985). Bioavailability of trace metals in natural waters. 7th Symposium: *Aquatic Toxicology and Hazard assessment*, Philadelphia, ASTM.

157. Onyatta J. and Huang P. (1999). Chemical speciation and bioavailability index of cadmium for selected tropical soils in Kenya. *Geoderma* **91**(1-2):87-101.

P

158. Pardos C., Benninghoff C., Thomas R. *et al.* (1999). Confirmation of elemental sulfur toxicity in the Microtox® assay during organic extracts assessment of freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**(2):188–193.

159. Pardos M. (1996). Tests écotoxicologiques avec la monoculture algale *Raphidocelis subspicata*, le nanoplancton indigène du Léman et la bactérie *Vibrio fisheri*: développements et exemples d'applications pour la gestion des milieux aquatiques. Thèse de doctorat, Sciences de la Terre, Université de Genève. 139 pp.

160. Pardos M., Benninghoff C., Guéguen C. *et al.* (2000a). Suspended matter water-elutriate toxicity from water and waste water in Cracow (poland) evaluated with Microtox(R) and *Selenastrum capricornutum* assays. *Lakes and Reservoirs: Research and Management* **5**:67-73.

161. Pardos M., Benninghoff C., Guéguen C. *et al.* (2000b). Water ecotoxicity studies in Cracow (Poland) using *Hydra attenuata*, *Selenastrum capricornutum*, and Microtox(R) toxicity tests. *Lakes and Reservoirs: Research and Management* **5**:75-81.

162. Parent L., Twiss M. and Campbell P. (1996). Influences of natural dissolved matter on the interaction of aluminium with the microalga *Chlorella*: A test of free-ion model of trace metal toxicity. *Environmental Science and Technology* **30**:1713-1720.

163. Pempkowiak J. and Kosakowska A. (1998). Accumulation of cadmium by green algae *Chlorella vulgaris* in the presence of marine humic substances. *Environment International* **24**:5-6.

164. Persoone G., Janssen C. and De Coen W. (2000). New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers. 550 pp.

165. Phinney J. and Bruland K. (1994). Uptake of lipophilic organic Cu, Cd, and Pb complexes in the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environmental Science and Technology* **28**(11):1781-1790.

166. Phinney J. and Bruland K. (1997a). Effects of dithiocarbamate and 8-hydroxyquinoline additions on algal uptake of ambient copper and nickel in south San Francisco bay water. *Estuaries* **20**(1):66-76.

167. Phinney J. and Bruland K. (1997b). Trace metal exchange in solution by the fungicides Ziram and Maneb (dithiocarbamates) and subsequent uptake of lipophilic organic zinc, copper and lead complexes into phytoplankton cells. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**(10):2046-2053.

168. Poldoski J. (1979). Cadmium bio-accumulation assays-their relationship to various ionic equilibria in Lake Superior water. *Environmental Science and Technology* **13**:701-706.

169. Powell H. and Town R. (1991). Interaction of humic substances with hydrophobic metal complexes: A study by anodic stripping voltammetry and spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta* **248**(1):95-102.

170. Procopio R., Viana O. and Henandez H. (1997). Microcolumn ion-exchange method for kinetic speciation of copper and lead in natural waters. *Environmental Science and Technology* **31**:3081-3085.

R

171. Ramade F. (1992). Précis d'écotoxicologie. Paris, Masson. 224 pp.

172. Ramade F. (1993). Environmental and ecotoxicological problems in the Mediterranean countries. *The Science of the Total Environment* **Suppl. 1**:97-107.

173. Ramireddygari S., Govindaraju R. and Erickson L. (1996). Modeling of heavy metal transport and soil erosion in surface runoff. Proceedings the HSRC/WERC Joint Conference on the Environ, Albuquerque, New Mexico, USA, Great Plains/Rocky Mountain Hazardous Substance Research Center; Waste-management Education & Research Consortium.

174. Ribolzi O. (1996). Etude des mécanismes de genèse des crues par le traçage naturel (chimique et isotopique) sur un bassin versant méditerranéen (Roujan, Hérault, France).

Thèse de doctorat, Sciences de la Terre (Hydrogéochimie), Université de droit des sciences et d'économie d'Aix-Marseille III. 191 pp.

175. Ribolzi O., Andrieux P., Valles V. *et al.* (2000). Contribution of groundwater and overland flows to storm flow generation in a cultivated Mediterranean catchment. Quantification by natural chemical tracing. *Journal of Hydrology* **233**(1-4)*:*241-257.

176. Riisgard H., Norgard-Nielsen K. and Sogaard-Jensen B. (1980). Further studies on volume regulation and effects of copper in relation to pH and EDTA in the naked marine flagellate *Dunaliella marina*. *Marine Biology* **56***:*267-276.

177. Riley J. and Taylor D. (1968). Chelating resins for the concentration of trace elements from sea water and their analytical use in conjunction with atomic absorption spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta* **40***:*479-485.

178. Ronnpagel K., Liss W. and Ahlf W. (1995). Microbial bioassays to assess the toxicity of solid-associated contaminants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **31**(2)*:*99-103.

S

179. Salomons W. and Förstner U. (1980). Trace metal analysis on polluted sediments. II-Evaluation of environmental impact. *Environmental Technology* **1***:*506-517.

180. Samson G., Morissette J. and Popovic R. (1988). Copper quenching of the variable fluorescence in *Dunaliella tertiolecta*. New evidence for a copper inhibition effect on PSII photochemistry. *Photochemistry and Photobiology* **48***:*329-332.

181. Schecher W. and McAvoy D. (1994). MINEQL+ User's Manual. Technical report, Hallowell, Environmental Research Software.

182. Schulz R. and Liess M. (1999). A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. *Aquatic Toxicology* **46**(3-4)*:*155-176.

183. Schulz R. and Liess M. (2001). Acute and chronic effects of particle-associated fenvalerate on stream macroinvertebrates: a runoff simulation study using outdoor microcosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **40**(4):481-488.

184. Sekkat N., Le D., A, Jouany J. *et al.* (1992). Study of the interactions between copper, cadmium and ferbam using the protozoan *Colpidium campylum* bioassay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **24**:294-300.

185. Shioi Y., Tamai H. and Sasa T. (1978). Effect of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **19**:203-209.

186. Shoja M., Gershon H., Bray D. *et al.* (1998). Crystal structures of copper(II) complexes of some 2-methyl-8-quinolinols and implications for their antifungal activity. *Monatshefte für Chemie* **129**(8-9):843-853.

187. Sleytr U. and Beveridge T. (1999). Bacterial S-layers. *Trends in Microbiology* **7**(6):253-260.

188. Sleytr U., Messner P., Pum D. *et al.* (1999). Crystalline bacterial cell Surface Layers (S Layers): From supramolecular cell structure to biomimetics and nanotechnology. *Angewandte Chemie* **38**:1034-1054.

189. Srna R., Garrett K., Miller S. *et al.* (1980). Copper complexation capacity of marine water samples from Southern California. *Environmental Science and Technology* **14**:1482-1486.

190. Stauber J. and Davies C. (2000). Use and limitations of microbial bioassays for assessing copper bioavailability in the aquatic environment. *Environmental Reviews* **8**:255-301.

191. Stauber J.L. and Florence T.M. (1987). Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Marine Biology* **94**(4):511-519.

192. Stumm W. and Morgan J. (1996). Aquatic Chemistry - Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters - Third Ed. New York, John Wiley and Sons. 1022 pp.

193. Sunda W. and Ferguson R. (1983). Sensitivity of natural bacterial communities to additions of copper and to cupric ion activity: a bioassay of copper complexation in seawater. In: « *Trace metals in Sea Water* ». Wong C., Boyle E., Bruland K. *et al. Eds*. New York, Plenum Press. p 871-891.

194. Sunda W. and Huntsman S. (1995). Regulation of copper concentration in the oceanic nutricline by phytoplankton uptake and regeneration cycles. *Limnology and Oceanography* **40**(1):132-137.

195. Sunda W. and Huntsman S. (1996). Antagonisms between cadmium and zinc toxicity and manganese limitations in a coastal diatom. *Limnology and Oceanography* **41**(3):373-387.

196. Sutter G., *Ed.* (1993). Ecological Risk Assessment. Boca raton, Lewis Pubs. 538 pp.

T

197. Tebo L. (1985). Technical considerations related to the regulatory use of multispecies toxicity tests. In: « *Multispecies Toxicity Testing* ». Cairns J. *Ed.* New York, Pergamon Press. p 19-26.

198. Templeton D., Ariese F., Cornelis R. *et al.* (2000). IUPAC guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements: Definitions, structural aspects and methodological approaches. *Pure and Applied Chemistry* **72**(1453-1470).

199. Tessier A., Campbell P. and Bisson M. (1979). Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry* **51**(7):844-851.

200. Tessier A. and Turner D. (1995). Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. Chichester, John Wiley and Sons. 696 pp.

201. Tjalve H. and Gottofrey J. (1991). Effects of lipophilic complex formation on the uptake and distribution of some metals in fish. *Pharmacology and Toxicology* **68**(6):430-439.

202. Town R. and Filella M. (2000). A comprehensive systematic compilation of complexation parameters reported for trace metals in natural waters. *Aquatic Sciences* **62**(3):252-295.

203. Tubbing D., Admiraal W., Cleven R. *et al.* (1994). The contribution of complexed copper to the metabolic inhibition of algae and bacteria in synthetic media and river water. *Water Research* **28**(1):37-44.

204. Turner D. (1984). Relationship between biological availability and chemical measurements. In: « *Metal ions in biological systems* ». Sigel H. *Ed.* New York, Marcel Dekker. p 137.

205. Twiss M., Errécalde O., Fortin C. *et al.* (2000). Guidelines for studies of metal bioavailability and toxicity. Why metal speciation should be considered and how! Rapport internet (http://www.uoguelph.ca/cntc/files/metals_v6.pdf), Canadian Network of Toxicology Centres (CNTC), Metal Speciation Theme Team.

U

206. USEPA (1989). Green algae, Selenastrum capricornutum, Growth Test. Test Method 1003.0, EPA/600/4-91/002 « Short-Term methods for estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving waters to Freshwater Organisms », Cincinnati, USEPA, Environ: Monitoring System Lab. p147-174.

207. USEPA (1994). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Test method, EPA/600/4-91/002, Cincinnati, USEPA.

208. USEPA (1998). National Recommended Water Quality Criteria. Notice Federal Register Republication, FRL-OW-6186-a, Vol 63, N° 237, p 68354-64, Cincinnati, USEPA.

V

209. Van der Berg C., Luca D. and Rebello A. (1986). Organic-copper interactions in Guanabara Bay, Brazil. An electrochemical study of copper complexation by dissolved organic material in a tropical bay. The *Science of the Total Environment* **58**:37-45.

210. Van der Berg C., Wong P. and Chau Y. (1979). Measurements of complexing materials excreted from algae and their ability to ameliorate copper toxicity. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 901-905.

211. Van der Heever J. and Grobbelaar J. (1996). Evaluation of a short-incubation-time small-volume radiocarbon-uptake algal toxicity test. *Journal of Applied Phycology* **8**:65-71.

212. Van Ginneken L. and Blust R. (2000). Determination of conditional stability constants of cadmium-humic acid complexes in freshwater by use of a competitive ligand equilibration-solvent extraction technique. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**(2):283-292.

213. Vasconcelos M., Azenha M. and Cabral J. (1997). Comparison of avalability of copper (II) complexes with organic ligands to bacterial cells and to chitin. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**(10):2029-2039.

214. Vasconcelos M. and Gomes C. (1997). Complexation properties of natural and synthetic polymers of environmental and biological interest in the presence of Cu(II) at neutral pH. *European Polymer Journal* 631-639.

215. Vasconcelos M., Leal M. and Soares H. (1996). Influence of the ratio copper(II) to ligand concentration and the nature of entering and leaving ligands on the lability of copper complexes. *Analytica Chimica Acta* **330**:273-281.

216. Vasseur P., Dive D., Sokar Z. *et al.* (1988). Interactions between copper and some carbamates used in phytosanitary treatments. *Chemosphere* **17**:767-782.

217. Venkata Mohan S., Krishna Mohan S. and Jayarama Reddy S. (2000). Determination of organic matter in water using organo-metal complexes. *Water Research* **34**(15):3761-3764.

218. Versteeg D. (1990). Comparison of Short- and Long-Term Toxicity Test Results for the Green Alga, *Selenastrum capricornutum*. In: « *Plants for Toxicity Assessment* ». Wang W., Gorsuch J. and Lower W. *Eds*. Philadelphia, ASTM STP 1091. p 40-48.

219. Vignault B., Percot A., Lafleur M. *et al.* (2000). Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances. *Environmental Science and Technology* **34**:3907-3913.

220. Villaescusa I., Marti S., Matas C. *et al.* (1997). Chromium(VI) toxicity to luminescent bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**(5):871-874.

221. Vindimian E., Robaut C. and Fillion G. (1983). A method for co-operative and non co-operative binding studies using non-linear regression analysis on a microcomputer. *Journal of Applied Biochemistry* **5**:261-268.

222. Voltz M., Andrieux P., Bouzigues R. *et al.* (1997). Main hydrological processes in a farmed catchment of the mediterranean area. 6th ERB Conference, Strasbourg, 24-26/09/1996, IHP-V Technical documents in Hydrology n°14, p111-115, UNSECO, Paris.

W

223. Warren L. and Zimmerman A. (1994). Suspended particulate oxides and organic matter interactions in trace metal sorption reactions in a small urban river. *Biogechemistry* 21-34.

224. Waters (1996). Operator's manual. Water Capillary Ion Analysis - Revised version 3, USA, Waters, Inc.

225. Wauchope R. (1978). The pesticide content of surface water draining from agricultural fields. a review. *Journal of Environmental Quality* **7**:459-472.

226. Wauchope R. (1987). Tilted-bed simulation of erosion and chemical runoff from agricultural fields: I. Runoff of sediment and sediment-associated copper and zinc. *Journal of Environmental Quality* **16**(3):206-211.

227. Wells P., Lee K. and Blaise C., *Eds.* (1997). Microscale Testing in Aquatic Toxicology. Advances, Techniques, and Practice. Boca Raton, CRC Press. 679 pp.

228. Welte B., Bles N. and Monteil A. (1983). Études des dufférentes méthodes de spéciation des métaux lourds dans les sédiments. I- Étude bibliographique. *Environmental Technology* 79-88.

229. Winner R. (1985). Bioaccumulation and toxicity of copper as affected by interactions between humic acid ans water hardness. *Water Research* **19**(4):449-455.

230. Witter A., Mabury S. and Jones A. (1998). Copper(II) complexation in northern California rice field waters: An investigation using differential pulse anodic and cathodic stripping voltametry. *The Science of the Total Environment* **212**(1):21-37.

231. Wong M., Sauser K., Chung K. *et al.* (2001). Response of the Ascorbate-Peroxidase of *Selenastrum capricornutum* to Copper and Lead in Stormwaters. *Environmental Monitoring and Assessment* **67**(3):361-378.

232. Wu T., Correll D. and Remenapp H. (1983). Herbicide runoff from experimental watersheds. *Journal of Environmental Quality* **12**:330-336.

X

233. Xue H., Sigg L. and Gachter R. (2000). Transport of Cu, Zn and Cd in a small agricultural catchment. *Water Research* **34**(9):2558-2568.

Y

234. Yoon Y., Martin J. and Cotte M. (1999). Dissolved trace metals in the western Mediterranean Sea: total concentration and fraction isolated by C18 Sep-Pak technique. *Marine Chemistry* **66**(3-4):129-148.

235. Yruela I., Alfonso M., Oritiz de Zarate I. *et al.* (1993). Precise location of the copper-inhibitory binding site in higher plant and bacterial photosynthetic reaction centers as probed by light-induced absorption changes. *Journal of Biological Chemistry* **268**:1684-1689.

Z

236. Zevenhuizen L., Dolfing J., Eshuis E. *et al.* (1979). Inhibitory effect of copper on bacteria related to the free ion concentration. *Microbiological Ecology* **5**:139-146.

237. Zhang Y., Danielsson L. and Becze Z. (1998). Partition of copper and cadmium between n-octanol and aqueous phases using segmented flow extraction. *Water Research* **32**(7):2073-2080.

238. Zhu T., Cai Q. and Zeng B. (1995). Runoff generation on a semi-arid agricultural catchment: field and experimental studies. *Journal of Hydrology* **196**(1-4):99-118.

ANNEXES

Annexe 1 : Diagrammes de spéciation de l'oxine et du DDC avec les métaux en fonction du pH dans l'eau pure et les milieux utilisés pour les biotests 155

Annexe 2 : Prélèvements d'eaux de ruissellement effectués sur l'ensemble de la période d'étude 158

Annexe 3 : Caractéristiques de la pluie, du ruissellement et paramètres globaux de la fraction dissoute du ruissellement à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté 159

Annexe 4 : Eléments majeurs dans la fraction dissoute du ruissellement à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté 160

Annexe 5 : Contaminants dans la fraction dissoute du ruissellement à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté 161

Annexe 6 : Caractéristiques générales de la fraction particulaire du ruissellement à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté 162

Annexe 7 : Contaminants dans la fraction particulaire du ruissellement à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté 163

Annexe 8 : Description des produits phytosanitaires et nombre d'applications en 1999 et 2000 sur la parcelle à sol carbonaté (enquête auprès de l'agriculteur – P. Andrieux, INRA Montpellier) 164

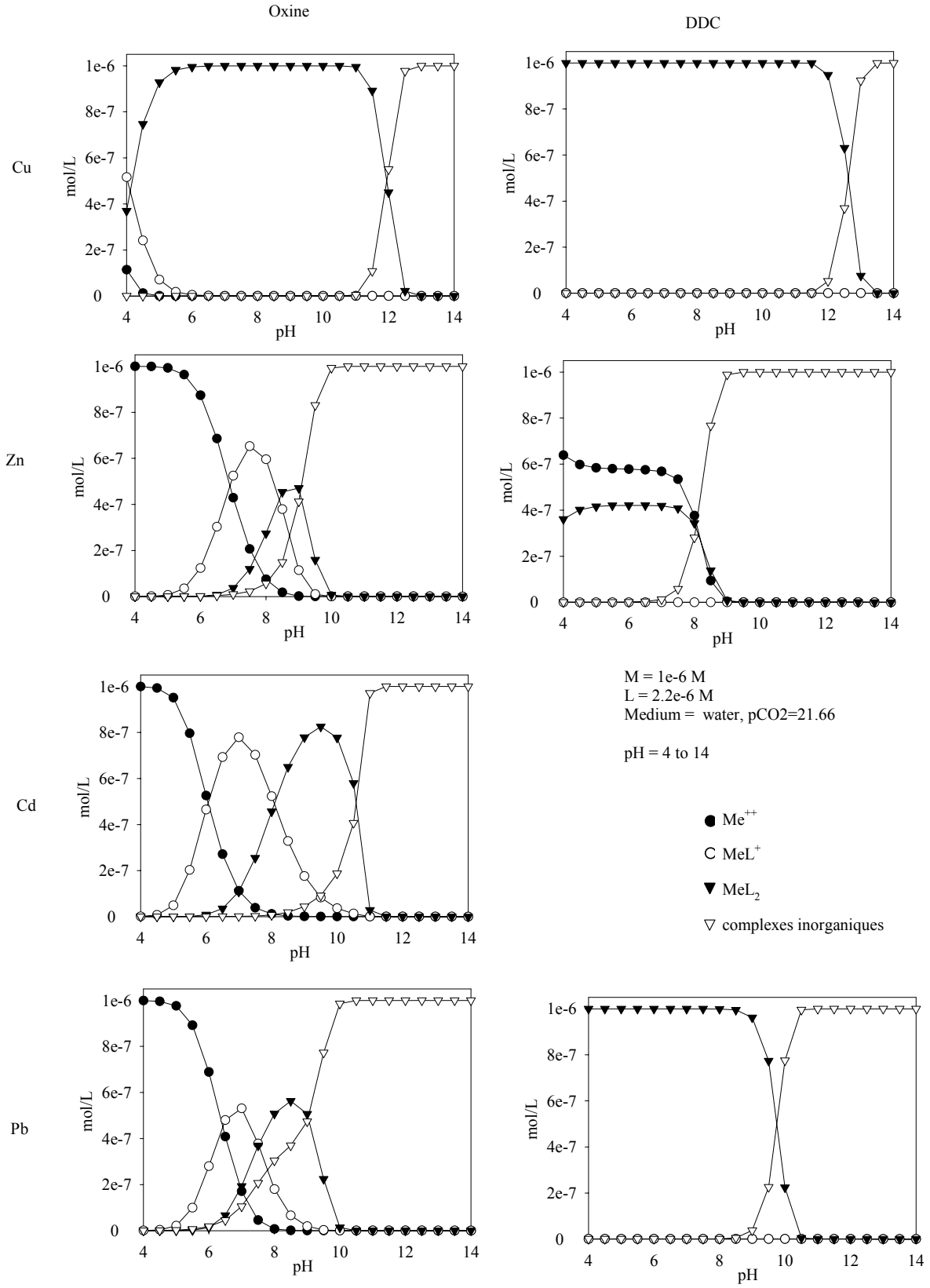
Annexe 9 : Caractéristiques des eaux de ruissellement de la parcelle à sol acide 165

Annexe 10 : Analyse en composantes principales à partir des analyses physico-chimiques des eaux de ruissellement des deux parcelles étudiées 166

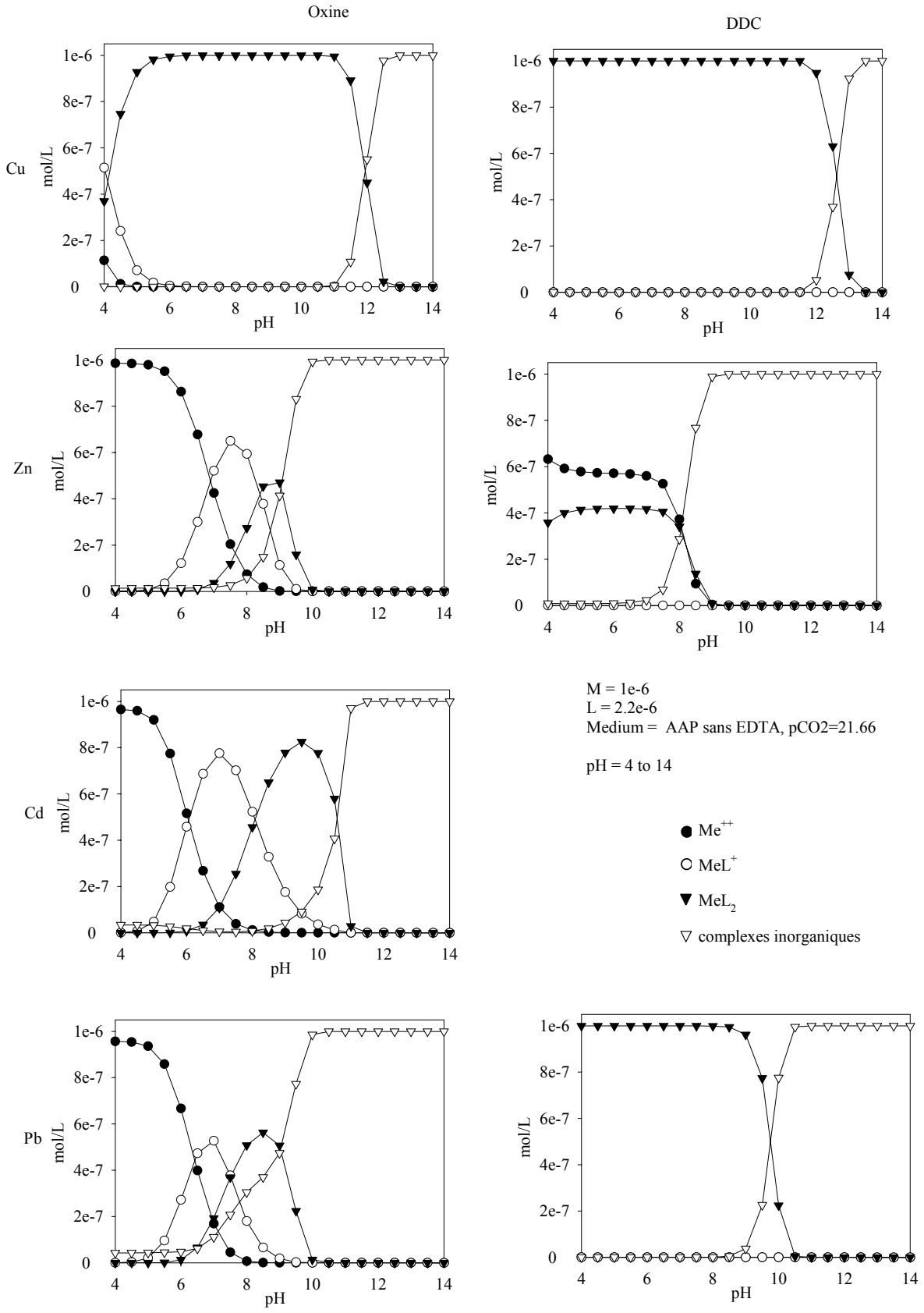
Annexe 11 : Annalyses détaillées des eaux de ruissellement d'avril à juin 2000 prélevés à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté 167

Annexe 1 : Diagrammes de spéciation de l'oxine et du DDC avec les métaux en fonction du pH dans l'eau pure et les milieux utilisés pour les biotests

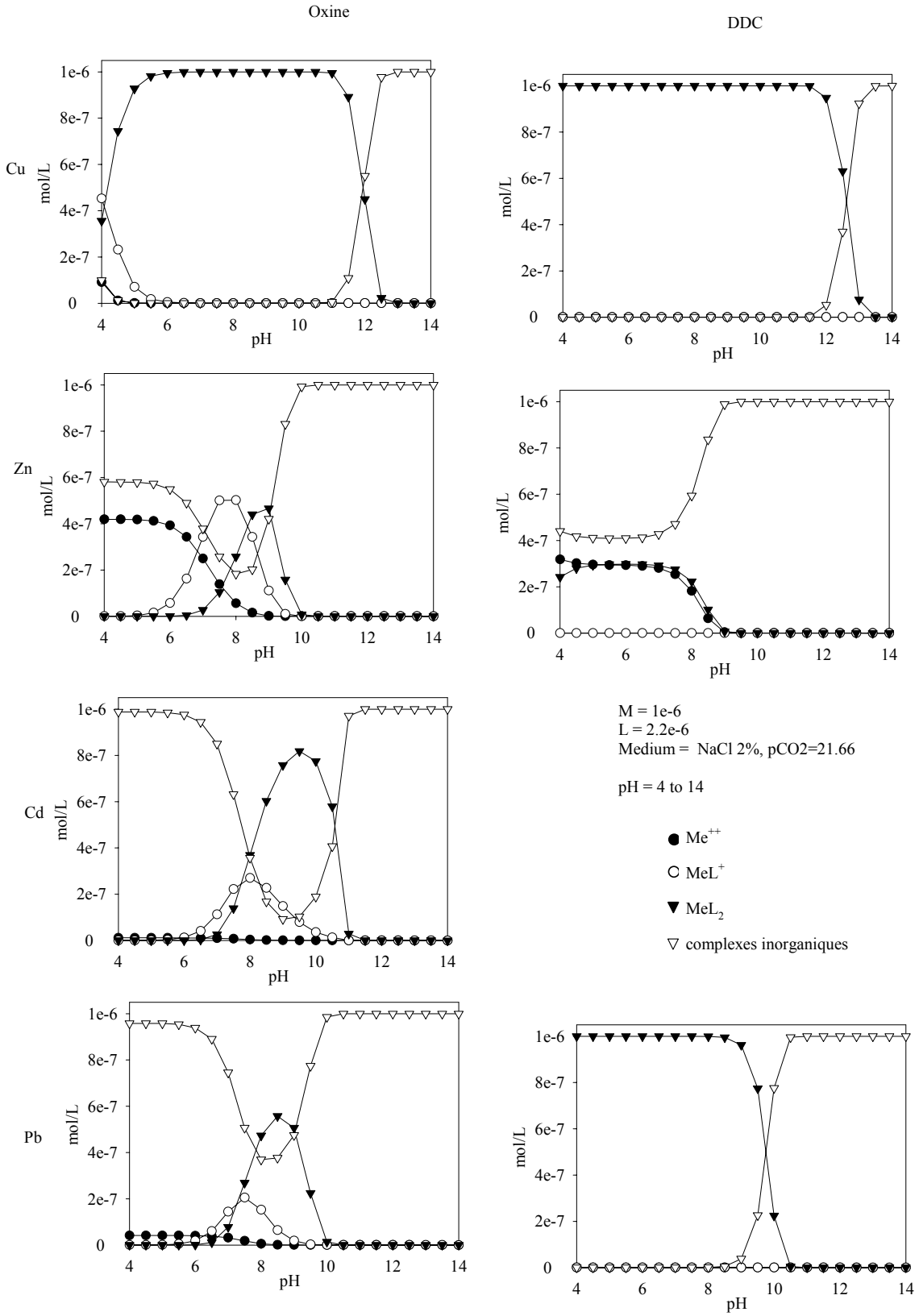
Diagrammes de spéciation de l'oxine et du DDC avec les métaux en fonction du pH dans l'eau pure



Diagrammes de spéciation de l'oxine et du DDC avec les métaux en fonction du pH dans le milieu AAP



Diagrammes de spéciation de l'oxine et du DDC avec les métaux en fonction du pH dans le milieu NaCl 20g/l



Annexe 2 : Prélèvements d'eaux de ruissellement effectués sur l'ensemble de la période d'étude

	Sol carbonaté				Sol
	Eau (<1µm)	MES	colloïdes	détail	acide
10-janv-99	x				
18-janv-99			Pluie <10mm		
21-avr-99	x				
26-avr-99	x				
3-mai-99	x				
8-mai-99			Pluie <10mm		
17-mai-99	x	x			
2-août-99	x		x		
5-août-99			Pluie <10mm		
6-août-99	x	x	x		
7-août-99					
3-sept-99	x	x	x		
6-sept-99			Non prélevé		
14-sept-99	x		x		
15-sept-99					
18-oct-99	x	x	x		
20-oct-99			Pluie <10mm		
12-nov-99	x	x	x		
13-nov-99	x				
14-nov-99			Préleveurs saturés		
14-janv-00	x				
16-avr-00	x	x		x	x
23-avr-00			Pluie <10mm		
27-avr-00	x	x		x	x
5-mai-00			Pluie <10mm		
6-mai-00			Pluie <10mm		
7-mai-00	x	x		x	x
8-mai-00			Pluie <10mm		
9-mai-00	x	x		x	x
10-mai-00	x	x		x	x
26-mai-00	x	x		x	x
27-mai-00			Pluie <10mm		
5-juin-00			Pluie <10mm		
10-juin-00			Non prélevé		
11-juin-00			Pluie <10mm		
13-juin-00			Pluie <10mm		
14-juin-00	x	x		x	x

Les prélèvements effectués concernent la période de janvier 1999 à juin 2000 pendant laquelle 37 jours de pluie ont été répertoriés, dont 25 jours de pluie conséquente (>10 mm). En 1999, parmi les 16 ruissellements conséquents observés, 12 échantillons moyens d'eau de ruissellement sur la parcelle à sol carbonaté (dont 5 pour la caractérisation des MES) ont été caractérisé. En 2000, sur 9 ruissellements conséquents, 8 échantillons moyens d'eau de ruissellement ont été caractérisé sur la parcelle à sol carbonaté. Parmi ces 8 échantillons, 7 ont fait l'objet de prélèvements moyens et automatiques (en continu) à l'exutoire de la parcelle de la parcelle à sol carbonaté, ainsi que de prélèvements sur la parcelle à sol acide.

Annexe 3 : Caractéristiques de la pluie, du ruissellement et paramètres globaux de la fraction dissoute du ruissellement à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté

Date début ruissellement (*en italique* = pas de prélèvement)	Caractéristiques de la pluie (évènements > 4mm)				Ruissellement					Paramètres globaux de la phase dissoute (<1µm)					
	Pluie (mm)	Imax (mm/h)	Imax1 (mm/h)	Imax5 (mm/h)	Ruiss[1] (mm)	Qmax (L/s)	Qmax (mm/h)	Durée (min)	CR (%)	pH	Conductivité (µS/cm)	Corg (mg/L C) Partit.	Corg (mg/L C) Moy Prélev.	Alcalinité totale (meq/L) Partit.	Alcalinité totale (meq/L) Moy Prélev.
10.01.99	13.99	8.57	8.57	7.78	6.51	1.40	4.20	197.00	46.53	7.37	93	2.2	-	0.8	-
18.01.99	7.98	4.15	4.15	4.15	0.46	0.18	0.54	109.00	5.78	-	-	-	-	-	-
21.04.99	12.65	36.00	33.44	26.25	2.93	4.11	12.34	40.00	23.18	8.00	285	9.9	35.0	1.0	-
26.04.99	16.90	15.00	15.00	14.12	5.92	3.45	10.34	79.00	35.03	7.85	92	4.3	11.5	0.4	-
03.05.99	65.51	11.18	11.18	10.40	24.34	2.06	6.19	934.00	37.16	8.10	110	4.6	23.3	0.9	-
08.05.99	4.0	94.7	73.1	15.9	1.8	11.7	35.0	11.0	45.0	-	-	-	75.7	-	-
17.05.99	41.11	41.86	41.07	28.79	22.19	9.76	29.27	379.00	53.97	8.14	110	9.2	15.8	0.4	-
02.08.99	19.46	138.50	126.30	88.21	9.77	30.89	92.67	29.00	50.23	7.91	260	12.7	27.3	0.7	-
05.08.99	4.74	24.00	23.29	11.01	0.50	2.25	6.75	38.00	10.54	-	-	-	13.5	-	-
06.08.99	62.83	257.10	190.30	157.30	45.59	44.34	133.02	51.00	72.56	8.07	136	3.5	45.9	0.7	-
07.08.99	20.37	150.00	123.00	99.54	13.96	30.89	92.67	19.00	68.53	-	-	-	-	-	-
03.09.99	11.12	34.62	33.33	25.35	2.43	4.61	13.82	30.00	21.88	7.82	90	4.5	18.2	0.5	-
06.09.99	66.1	163.6	141.7	94.0	49.0	37.1	111.3	197.0	74.2	-	-	-	24.6	-	-
14.09.99	17.20	105.90	89.24	53.89	6.23	19.69	59.07	19.00	36.24	8.15	147	15.0	24.4	1.1	-
15.09.99	15.4	9.0	9.0	8.0	4.3	1.6	4.9	140.0	27.8	-	-	-	12.0	-	-
18.10.99	40.85	120.00	93.12	63.61	37.49	35.60	106.80	103.00	91.78	7.86	175	10.6	15.1	1.3	-
20.10.99	3.99	3.24	3.24	3.24	0.06	0.06	0.19	39.00	1.57	-	-	-	-	-	-
12.11.99	49.82	10.65	10.65	7.67	23.46	2.25	6.75	590.00	47.08	8.03	98	3.0	15.0	0.8	-
13.11.99	84.31	47.37	40.35	28.21	73.51	17.67	53.01	1016.00	87.19	7.90	210	0.6	-	0.9	-
14.11.99	66.48	112.50	87.13	53.74	68.04	24.61	73.83	441.00	102.30	-	-	-	-	-	-
14.01.00	14.16	7.35	7.35	6.16	1.91	0.77	2.32	105.00	13.50	7.80	109	0.5	-	1.0	-
16.04.00	14.19	58.06	47.82	37.42	7.06	11.86	35.58	42.00	49.74	8.17	401	7.8	-	1.5	-
23.04.00	7.58	4.62	4.62	4.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-	-	-	3.71	-	1.1
27.04.00	16.33	72.00	54.34	28.98	4.22	5.71	17.14	89.00	25.82	7.90	369	5.5	5.19	1.1	1.3
05.05.00	1.57	2.93	2.93	2.93	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
06.05.00	3.65	3.29	3.29	3.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
07.05.00	13.17	43.90	42.18	34.06	5.37	11.50	34.50	90.00	40.76	7.90	191	0.9	4.06	0.9	0.9
08.05.00	1.95	0.70	0.70	0.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
09.05.00	14.46	52.94	51.18	39.84	8.63	13.35	40.05	38.00	59.65	7.70	134	3.0	2.91	0.9	0.7
10.05.00	19.28	54.55	51.99	34.92	10.65	11.86	35.58	148.00	55.23	7.70	97	0.4	-	0.3	0.9
26.05.00	16.89	75.00	69.88	46.93	5.94	12.23	36.69	63.00	35.14	7.80	256	1.0	-	0.8	-
27.05.00	5.69	11.46	11.46	4.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
05.06.00	0.55	6.10	3.44	3.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
10.06.00	15.76	40.00	32.75	16.91	1.25	2.36	7.07	107.00	7.90	-	-	-	-	-	-
11.06.00	5.81	4.58	4.58	4.37	0.07	0.14	0.42	19.00	1.19	-	-	-	-	-	1.3
13.06.00	2.45	12.00	12.00	9.95	0.05	0.14	0.42	13.00	1.98	-	-	-	-	-	-
14.06.00	33.24	150.00	126.90	107.50	27.67	42.66	127.98	67.00	83.24	8.05	133	6.3	-	1.0	-

Annexe 4 : Eléments majeurs dans la fraction dissoute du ruissellement à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté

Date début ruissellement (*en italique* = pas de prélèvement)	Elements majeurs de la phase dissoute (<1µm)													
	Ca (mg/L)		Mg (mg/L)		Na (mg/L)		K (mg/L)		Cl (mg/L)		SO4 (mg/L)		NO3 (mg/L)	
	Partit.	Moy Prélev.	Partit.	Moy Prélev.	Partit.	Moy Prélev.	Partit.	Moy Prélev.	Partit.	Moy Prélev.	Partit.	Moy Prélev.	Partit.	Moy Prélev.
10.01.99	18.3	-	1.3	-	1.0	-	2.0	-	2.2	-	2.8	-	2.7	-
18.01.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21.04.99	36.8	-	1.3	-	2.6	-	11.5	-	5.4	-	68.4	-	3.4	-
26.04.99	7.5	-	0.3	-	0.9	-	1.2	-	3.7	-	8.7	-	2.1	-
03.05.99	14.2	-	0.5	-	0.6	-	1.9	-	1.4	-	6.2	-	1.2	-
08.05.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17.05.99	9.5	-	0.7	-	0.8	-	2.8	-	5.1	-	10.0	-	2.0	-
02.08.99	35.4	-	1.2	-	0.9	-	6.1	-	7.4	-	42.0	-	4.0	-
05.08.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06.08.99	16.0	-	0.3	-	0.8	-	4.5	-	1.4	-	16.1	-	5.0	-
07.08.99														
03.09.99	12.8	-	1.0	-	1.0	-	4.9	-	1.5	-	12.7	-	14.2	-
06.09.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.09.99	21.4	-	0.9	-	3.0	-	9.4	-	6.2	-	18.3	-	1.6	-
15.09.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.10.99	30.2	-	3.0	-	1.6	-	11.5	-	8.8	-	10.5	-	1.6	-
20.10.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.11.99	16.0	-	1.2	-	2.9	-	5.8	-	4.3	-	2.3	-	1.8	-
13.11.99	16.0	-	1.2	-	2.9	-	5.8	-	4.3	-	2.3	-	1.8	-
14.11.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.01.00	21.3	-	0.7	-	0.6	-	1.1	-	1.2	-	1.5	-	1.5	-
16.04.00	45.5	-	1.6	-	4.2	-	35.2	-	3.4	-	86.1	-	1.2	-
23.04.00	-	47.7	-	2.4	-	3.4	-	34.2	-	1.4	-	116.1	-	0.4
27.04.00	56.1	56.9	1.8	2.0	2.6	2.5	21.7	18.6	5.1	5.3	101.9	104.5	44.1	8.1
05.05.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
06.05.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
07.05.00	34.0	35.3	1.5	0.9	4.2	1.3	23.0	13.1	2.4	1.3	49.5	55.6	87.1	10.5
08.05.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
09.05.00	15.2	28.2	0.6	1.5	1.8	2.5	22.2	11.5	1.4	1.6	14.7	23.5	34.5	43.4
10.05.00	17.4	22.6	0.6	1.7	0.6	1.9	9.5	9.4	0.5	1.0	-	19.8	53.3	16.0
26.05.00	18.0	-	1.0	-	1.1	-	10.5	-	2.5	-	33.9	-	1.7	-
27.05.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
05.06.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
10.06.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11.06.00	-	59.4	-	3.6	-	1.3	-	16.2	-	5.1	-	100.9	-	13.6
13.06.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.06.00	14.8	18.8	1.9	1.1	0.9	1.4	6.1	7.6	0.4	0.4	0.7	13.4	1.0	9.0

Annexe 5 : Contaminants dans la fraction dissoute du ruissellement à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté

Date début ruissellement (*en italique* = pas de prélèvement)	Métaux dissous (<1µm)																		Pesticides dissous (<1µm)	
	Al (µg/L)	Fe (µg/L)	Mn (µg/L)	Cu (µg/L)		Zn (µg/L)		As (µg/L)					Ag (µg/L)		Cd (µg/L)		Pb (µg/L)		Diuron (µg/L)	Simazine (µg/L)
				Partit.	Moy Prélev	Partit.	Moy Prélev	Partit.	Moy Prélev	As total	As(III)	As(V)	Partit.	Moy Prélev	Partit.	Moy Prélev	Partit.	Moy Prélev		
10.01.99	7	39	1	24.0	-	5.5	-	-	26.4	-	-	-	0.00	-	0.00	-	0.2	-	0.0	0.0
18.01.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21.04.99	9	43	2	27.8	41.8	3.0	22.2	-	184.2	-	-	-	0.00	-	0.00	-	0.8	-	344.7	580.6
26.04.99	7	54	218	13.0	30.0	25.0	22.0	130.6	133.6	126.4	0.02	123.73	0.00	-	0.00	-	0.2	-	67.3	61.0
03.05.99	9	39	240	10.0	16.6	2.3	28.3	53.8	41.4	-	-	-	0.00	-	0.00	-	0.0	-	19.6	7.3
08.05.99	-	-	-	-	39.0	-	21.0	-	93.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17.05.99	6	54	123	30.0	16.6	6.2	24.3	-	35.4	-	-	-	0.00	-	0.00	-	0.7	-	6.2	2.6
02.08.99	4	92	464	67.3	83.5	15.7	28.6	-	40.3	-	-	-	0.00	-	0.00	-	0.2	-	4.0	0.3
05.08.99	-	-	-	-	44.8	-	19.6	-	35.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06.08.99	16	66	286	15.0	33.8	6.9	24.6	30.5	35.8	23.2	0.08	23.11	0.00	-	0.00	-	0.4	-	3.6	0.1
07.08.99																			-	-
03.09.99	4	27	6	27.2	42.0	6.4	20.3	12.5	15.3	10.0	0.02	9.93	0.00	-	0.00	-	0.0	-	1.4	0.0
06.09.99	-	-	-	-	16.2	-	16.5	8.2	7.7	6.6	0.01	6.60	-	-	-	-	-	-	-	-
14.09.99	7	57	55	44.1	32.8	1.8	30.4	12.1	8.7	9.6	0.03	9.58	0.00	-	0.00	-	0.0	-	1.2	0.0
15.09.99	-	-	-	-	20.2	-	18.7	-	6.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.10.99	54	185	3	35.7	29.1	9.0	43.2	6.6	7.2	5.5	0.04	5.43	0.00	-	0.00	-	1.0	-	0.8	0.8
20.10.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.11.99	31	125	2	13.8	15.4	4.6	9.2	5.8	4.8	4.4	0.02	4.42	0.00	-	0.00	-	0.5	-	0.9	0.3
13.11.99	26	64	1	15.3	-	4.8	-	-	5.8	-	-	-	0.00	-	0.00	-	0.0	-	0.5	0.2
14.11.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.01.00	8	44	2	10.6	15.1	46.5	11.1	3.4	2.4	3.4	0.01	3.38	0.00	-	0.00	-	2.5	-	0.0	0.0
16.04.00	21	109	103	49.6	-	109.3	-	148.5	-	137.0	0.08	136.92	0.00	-	0.00	-	0.0	-	318.3	0.0
23.04.00	-	-	-	-	41.8	-	37.5	-	135.2	-	-	-	-	0.05	-	0.18	-	0.4	-	-
27.04.00	7	105	18	29.6	40.0	16.6	47.0	97.6	95.1	90.7	0.10	90.59	0.00	0.00	0.00	0.05	0.0	0.4	69.4	0.0
05.05.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
06.05.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
07.05.00	18	69	3	26.3	38.5	37.3	40.7	37.8	62.5	-	-	-	0.00	0.01	0.00	0.05	0.0	0.5	59.7	0.0
08.05.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
09.05.00	16	29	1	23.8	30.4	25.3	46.6	32.0	50.8	-	-	-	0.00	0.01	0.00	0.13	0.0	0.5	36.4	0.0
10.05.00	15	34	1	14.1	22.8	4.1	36.2	30.4	40.7	-	-	-	0.00	0.01	0.00	0.08	0.0	0.6	25.4	0.0
26.05.00	17	63	46	49.8	-	14.2	-	43.1	-	-	-	-	0.00	-	0.31	-	0.5	-	19.5	0.0
27.05.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
05.06.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
10.06.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11.06.00	-	-	-	-	61.2	-	15.2	-	51.3	-	-	-	-	0.01	-	0.12	-	0.2	-	-
13.06.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.06.00	22	55	126	37.9	68.3	15.3	20.7	33.0	42.7	-	-	-	0.00	0.03	0.20	0.27	0.0	0.3	6.1	0.0

Annexe 6 : Caractéristiques générales de la fraction particulaire du ruissellement à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté

Date début ruissellement (*en italique* = pas de prélèvement)	MES : caractéristiques générales											
	MES (g/L)		Ca (g/kg)		Mg (g/kg)		Al (g/kg)		Fe (g/kg)		Mn (g/kg)	
	Partit.	Moy Prélev.	Partit.	Moy Prélev.	Partit.	Moy Prélev.	Partit.	Moy Prélev.	Partit.	Moy Prélev.	Partit.	Moy Prélev.
10.01.99	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.01.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21.04.99	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26.04.99	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
03.05.99	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
08.05.99	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17.05.99	8.3	-	67.6	-	7.4	-	13.8	-	25.8	-	0.6	-
02.08.99	36.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
05.08.99	10.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06.08.99	47.0	-	35.6	-	4.6	-	2.6	-	19.0	-	0.5	-
07.08.99												
03.09.99	10.4	-	37.9	-	5.6	-	4.0	-	21.9	-	0.6	-
06.09.99	52.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.09.99	11.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15.09.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.10.99	2.5	-	38.8	-	4.5	-	5.4	-	29.7	-	0.7	-
20.10.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.11.99	2.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13.11.99	1.7	-	12.2	-	1.8	-	15.2	-	59.9	-	1.1	-
14.11.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.01.00	10.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16.04.00	7.2	-	21.0	-	2.6	-	1.8	-	28.8	-	0.6	-
23.04.00	-	13.4	-	207.6	-	18.2	-	30.4	-	53.0	-	1.1
27.04.00	2.4	7.8	53.1	104.2	5.9	11.2	21.1	21.6	34.4	32.2	0.7	0.6
05.05.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
06.05.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
07.05.00	2.9	11.8	39.9	110.9	4.8	10.6	18.3	16.3	41.3	28.8	0.8	0.6
08.05.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
09.05.00	9.9	14.8	44.0	134.6	4.1	12.0	5.5	16.9	33.4	32.1	0.7	0.7
10.05.00	5.8	15.9	37.6	112.7	4.1	11.7	3.1	23.4	34.0	29.6	0.7	0.6
26.05.00	7.7	-	34.6	-	3.5	-	11.8	-	37.3	-	0.7	-
27.05.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
05.06.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
10.06.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11.06.00	-	25.5	-	137.6	-	12.7	-	15.1	-	25.7	-	0.6
13.06.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.06.00	11.4	13.9	22.4	122.0	3.2	12.8	1.3	25.9	28.1	31.4	0.7	0.6

Annexe 7 : Contaminants dans la fraction particulaire du ruissellement à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté

Date début ruissellement (*en italique* = pas de prélèvement)	MES : micropolluants												
	Cu (mg/Kg)		Zn (mg/Kg)		As (mg/Kg)		Ag (mg/Kg)		Cd (mg/Kg)		Pb (mg/Kg)		Simazine (mg/kg)
	Partit.	Moy Prélev.	Partit.	Moy Prélev.	Partit.	Moy Prélev.	Partit.	Moy Prélev.	Partit.	Moy Prélev.	Partit.	Moy Prélev.	
10.01.99	142	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.01.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21.04.99	180	182.8	100	109.3	-	47.4	-	-	-	-	-	-	-
26.04.99	220	213.3	320	154.8	-	45.2	-	-	-	-	-	-	-
03.05.99	180	182.5	110	119.0	-	28.1	-	-	-	-	-	-	895.5
08.05.99	-	120.2	-	72.5	-	23.7	-	-	-	-	-	-	-
17.05.99	137	194.0	112	87.0	21	28	<0.1	-	<0.1	-	21.2	-	383.0
02.08.99	-	150.0	-	69.0	-	20.1	-	-	-	-	-	-	88.0
05.08.99	-	197.0	-	91.5	-	27.1	-	-	-	-	-	-	-
06.08.99	122	125.3	110	63.2	17	19.9	<0.1	-	<0.1	-	19.6	-	26.2
07.08.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
03.09.99	175	126.0	127	66.1	17	19.4	<0.1	-	<0.1	-	20.7	-	-
06.09.99	-	138.0	-	62.8	-	21.9	-	-	-	-	-	-	-
14.09.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15.09.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.10.99	193	155.0	149	82.0	24	24.9	<0.1	-	<0.1	-	28.4	-	-
20.10.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.11.99		151.0	-	78.0	-	21.4	-	-	-	-	-	-	-
13.11.99	285	-	290	-	47	-	0.1	-	<0.1	-	52.0	-	-
14.11.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.01.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16.04.00	178	-	94	-	30	-	<0.1	-	<0.1	-	24.1	-	-
23.04.00	-	314	-	136	-	46	-	<0.1	-	0.1	-	56.57	-
27.04.00	187	211	179	93	34	25	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	28.9	11.0	-
05.05.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
06.05.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
07.05.00	230	187	185	78	41	19	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	37.2	19.2	-
08.05.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
09.05.00	181	204	136	86	29	20	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	29.1	24.6	-
10.05.00	179	179	125	76	24	17	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	25.4	16.5	-
26.05.00	205	-	158	-	35	-	0.1	-	<0.1	-	33.8	-	-
27.05.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
05.06.00	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
10.06.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11.06.00	-	178	-	67	-	13	-	<0.1	-	<0.1	-	21.10	-
13.06.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.06.00	212	240	111	85	22	18	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	23.3	21.5	-

Annexe 8 : Description des produits phytosanitaires et nombre d'applications en 1999 et 2000 sur la parcelle à sol carbonaté (enquête auprès de l'agriculteur – P. Andrieux, INRA Montpellier)

Molécule		Classement du produit phytosanitaire					Usage homologué pour la vigne				traitements	
substances actives	CAS number	catégorie	famille	nom commercial	Société	Risque (UE)	concentration	dose	partie	action	1999	2000
arsenite de Na	07784-46-5	FONGICIDES	ARSENICAUX	PYRALESCARS	Rhone Poulenc Agro France		330 g/L	2.5 L/Ha	parties aériennes	excoriose	1	
cuivre	1332-14-5	FONGICIDES		MANOCURE REMILTINE Cu	Proval Sandoz Agro	XN - XI - AQUA	10% 30.0%		parties aériennes	Mildiou, Black-rot, Excoriose, Rougeot	1 -	- 1
cymoxanil	57966-95-7	FONGICIDES	AMIDES	REMILTINE Cu	Sandoz Agro	XN - XI - AQUA	4.0%	?	parties aériennes	Mildiou, Black-rot, Excoriose, Rougeot	-	1
dinocap	39300-45-3	FONGICIDES	COMPOSES PHENOLIQUES	KARATHANE POUDRE VIGNE	Rohm and Haas France	XI - AQUA	0.5%	sans dose	parties aériennes	oidium	1	1
diquat	85-00-7	HERBICIDES	DIPYRIDYLES	GRAMOXONE PLUS	Sopra	T - AQUA	50g/L	1-6 L/Ha	sol	désherbage	1 (p)	1 (p)
diuron	330-54-1	HERBICIDES	DERIVES DE DE L'UREE	FENICAN VEGEPRON	Novartis Agro SA	XN - AQUA	285.7g/L 165 g/L	5 L/Ha	sol	désherbage	1	1
DNOC	534-52-1	HERBICIDES INSECTICIDES	COMPOSES PHENOLIQUES	VERALINE		XN	102 g/L	?	?		1	-
folpel	133-07-3	FONGICIDES	PHTALIMIDES	ACYLON WP60	Ciba Geigy	XN	51%	2.5 Kg/Ha	parties aériennes	mildion	4	4
glyphosate	1071-83-6	HERBICIDES		ROUND-UP	Monsanto Agriculture France S.A.S	XN	360 g/L	3-12 L/Ha	sol	désherbage	1 (p)	1 (p)
mancozebe	8018-01-7	FONGICIDES	DITHIOCARBAMATES	REMILTINE Cu	Sandoz Agro	XN - XI - AQUA	13.3%		parties aériennes	Mildiou, Black-rot, Excoriose, Rougeot	-	1
manebe	12427-38-2	FONGICIDES	DITHIO-CARBAMATE	MANOCURE	Proval		17%				1	-
metalaxyl	57837-19-1	FONGICIDES	ACYLALANINES	ACYLON WP60	Ciba Geigy	XN	9%	2.5 Kg/Ha	parties aériennes	mildiou	4	4
paraquat	4685-14-7	HERBICIDES	DIPYRIDYLES	GRAMOXONE PLUS	Sopra	T - AQUA	40g/L	1-6 L/Ha	sol	désherbage	1 (p)	1 (p)
penconazole	66246-88-6	FONGICIDES	TRIAZOLES	TOPAZE	Novartis Agro SA	XN	100 g/L	0.25 L/Ha	parties aériennes	oidium		
simazine	122-34-9	HERBICIDES	TRIAZINES	VEGEPRON	Elf Atochem Agri	XN NOCIF	80 g/L		sol	désherbage	1	1
terbuthylazine	5915-41-3	HERBICIDES	TRIAZINES	FENICAN	Novartis Agro SA	XN - AQUA	285.7 g/L	5 L/Ha	sol	désherbage	1	1
zirame	137-30-4	FONGICIDES	DITHIO-CARBAMATE	PYRALESCARS	Rhone Poulenc Agro France	T	250 g/L	5 L/Ha	parties aériennes	esca	1	

Annexe 9 : Caractéristiques des eaux de ruissellement de la parcelle à sol acide

Paramétre globaux et ions majeurs dissous (<1µm).

Date	pH	Cond. (µS/cm)	Dureté (mmol/L)	C org (mg/L)	TAC (meq/L)	Ca (mg/L)	Mg (mg/L)	Na (mg/L)	K (mg/L)	Cl (mg/L)	SO4 (mg/L)	NO3 (mg/L)
16/04/00	*7,1*	*142*	*0,2*	*5,6*	*<0,1*	*4,4*	*1,1*	*0,0*	*2,4*	*11,6*	*4,4*	*2,8*
27/04/00	*7,1*	*121*	*0,4*	*12,0*	*0,1*	*9,7*	*1,7*	*8,4*	*15,6*	*17,1*	*15,2*	*28,3*
07/05/00	*7,0*	*110*	*0,2*	*10,4*	*<0,1*	*2,2*	*0,5*	*2,0*	*12,7*	*9,6*	*7,1*	*22,4*
09/05/00	*6,8*	*92*	*0,1*	*9,1*	*<0,1*	*6,0*	*0,2*	*2,5*	*10,1*	*4,5*	*3,6*	*34,0*
10/05/00	*6,9*	*52*	*0,1*	*8,3*	*0,2*	*3,4*	*0,5*	*1,2*	*4,9*	*0,7*	*1,5*	*9,4*
26/05/00	*7,0*	*118*	*0,2*	*17,0*	*0,0*	*3,7*	*0,5*	*1,4*	*14,6*	*9,6*	*7,1*	*13,8*
14/06/00	*7,0*	*50*	*0,1*	*10,7*	*0,2*	*2,6*	*0,5*	*1,1*	*6,8*	*0,3*	*3,0*	*2,1*

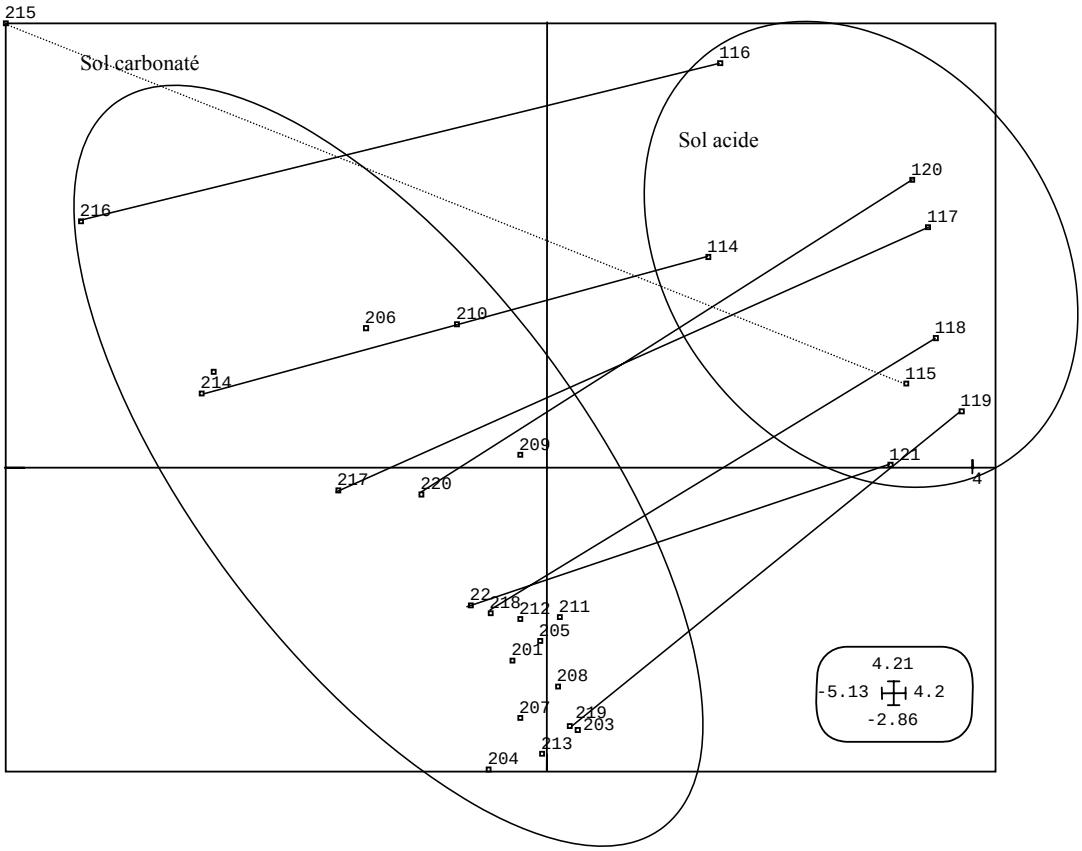
Métaux dans la phase dissoute (<1µm)

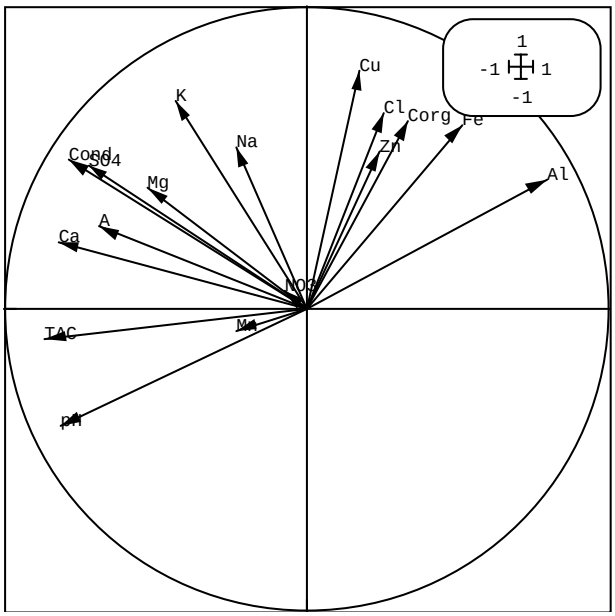
Date	Al (µg/L)	Fe (µg/L)	Mn (µg/L)	Cu (µg/L)	Zn (µg/L)	As (µg/L)	Ag (µg/L)	Cd (µg/L)	Pb (µg/L)
16/04/00	*348*	*176*	*10*	*35,2*	*37,3*	*13*	*<0.01*	*<0.03*	*1,57*
27/04/00	*179*	*123*	*8*	*63,0*	*25,2*	*23*	*<0.01*	*0,14*	*6,18*
07/05/00	*311*	*162*	*9*	*47,9*	*117,2*	*16*	*<0.01*	*0,05*	*3,16*
09/05/00	*323*	*178*	*21*	*37,2*	*69,7*	*10*	*<0.01*	*0,18*	*0,60*
10/05/00	*349*	*198*	*4*	*36,5*	*82,7*	*13*	*<0.01*	*0,00*	*0,57*
26/05/00	*285*	*165*	*29*	*75,3*	*29,8*	*19*	*<0.01*	*0,17*	*8,85*
14/06/00	*231*	*146*	*18*	*36,3*	*61,3*	*9*	*<0.01*	*0,00*	*3,48*

Métaux dans la phase particulaires (>1µm)

Date	MES (g/L)	Mg (g/kg)	Al (g/kg)	Ca (g/kg)	Mn (g/kg)	Fe (g/kg)	Cu (mg/kg)	Zn (mg/kg)	As (mg/kg)	Pb (mg/kg)
16/04/00	*0,566*	*0,076*	*31,06*	*2,4*	*0,24*	*45,689*	*293*	*408*	*92*	*16*
27/04/00	*0,120*	*0,204*	*34,02*	*1,8*	*0,853*	*72,15*	*434*	*907*	*174*	*59*
07/05/00	*0,260*	*0,166*	*60,72*	*2,8*	*0,316*	*56,958*	*349*	*609*	*118*	*23*
09/05/00	*0,500*	*0,086*	*40,72*	*1,4*	*0,24*	*53,08*	*344*	*401*	*104*	*75*
10/05/00	*0,982*	*0,044*	*8,78*	*0,5*	*0,167*	*48,31*	*316*	*207*	*92*	*76*
26/05/00	*1,192*	*0,265*	*15,94*	*0,9*	*0,164*	*45,638*	*354*	*178*	*83*	*77*
14/06/00	*1,138*	*0,047*	*7,53*	*0,6*	*0,141*	*40,462*	*315*	*435*	*81*	*63*

Annexe 10 : Analyse en composantes principales à partir des analyses physico-chimiques des eaux de ruissellement des deux parcelles étudiées.

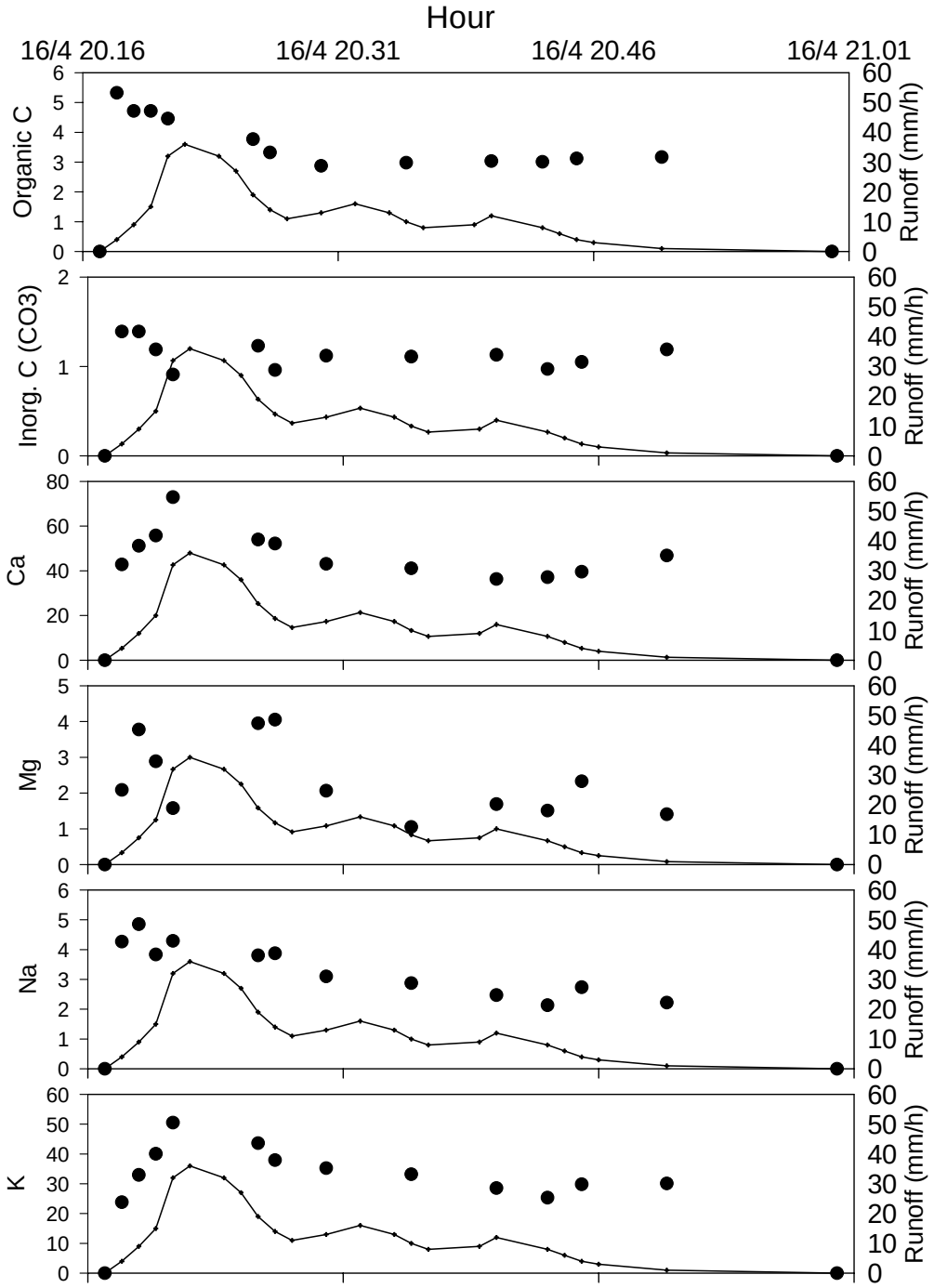




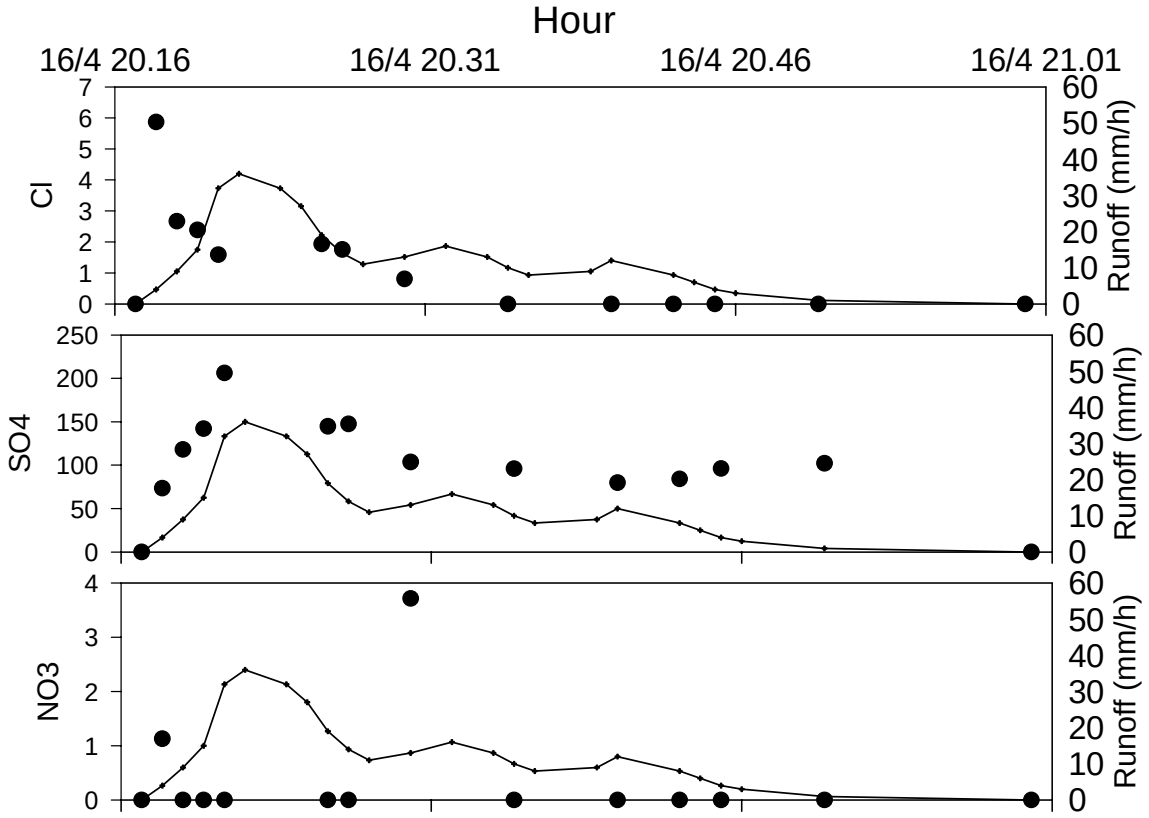
Axe 1 : 32:4%
Axe 1+2: 57.6%

Annexe 11 : Annalyses détaillées des eaux de ruissellement d'avril à juin 2000 prélevés à l'exutoire de la parcelle à sol carbonaté

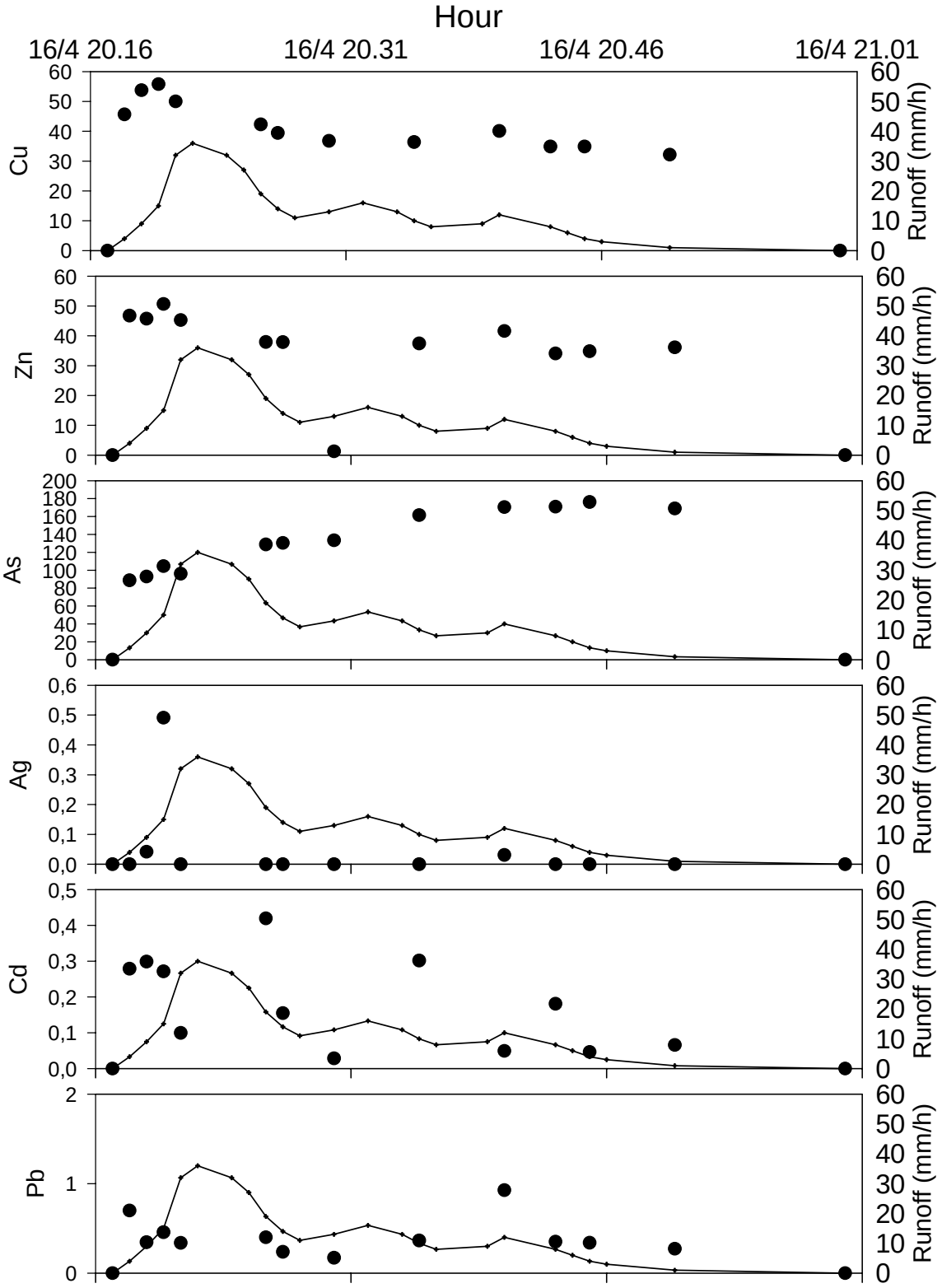
Crue du 16 avril 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments dissous (< 1µm) en mg/L



Crue du 16 avril 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments dissous (< 1µm) en mg/L



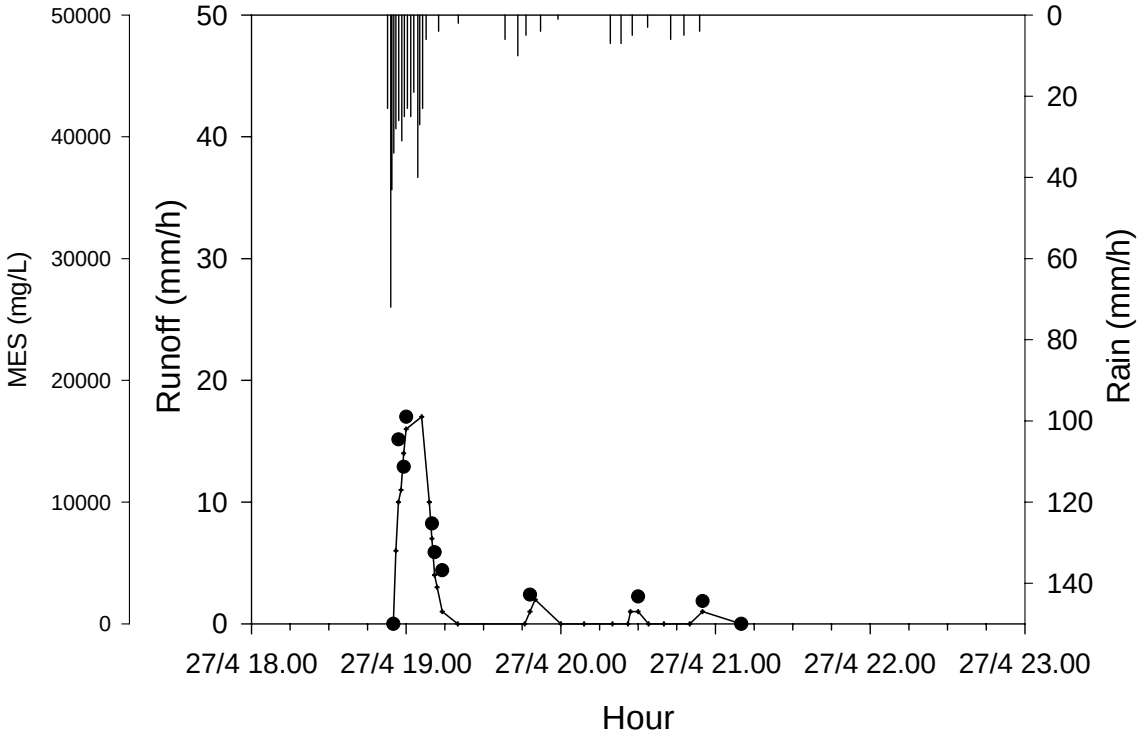
Crue du 16 avril 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments traces dissous (< 1µm) en µg/L



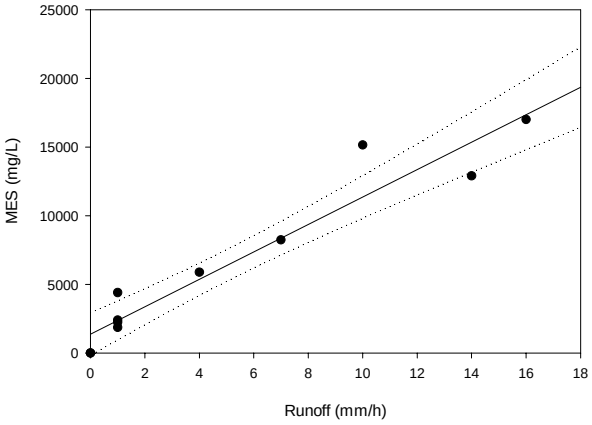
Crue du 27 avril 2000 - parcelle AW6 Roujan

Pluie : Imax (mm/h)= 72
P (mm) = 17

Ruissellement : Imax(mm/h) = 17
Conductivité (µS/cm) = 369
pH = 7,90



Corrélation MES / Débit



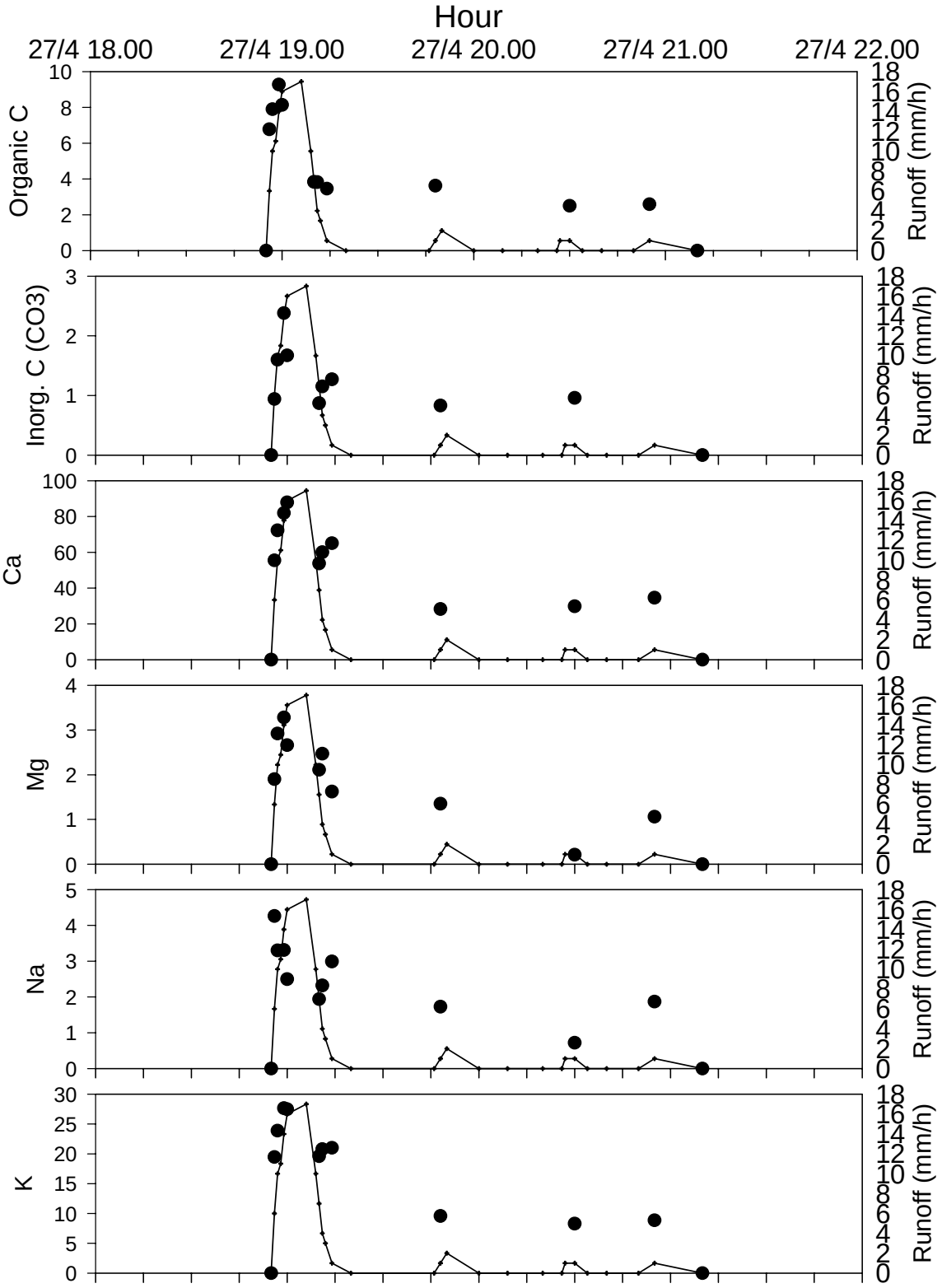
Y=b[0]X+b[1]

b[0]=1372

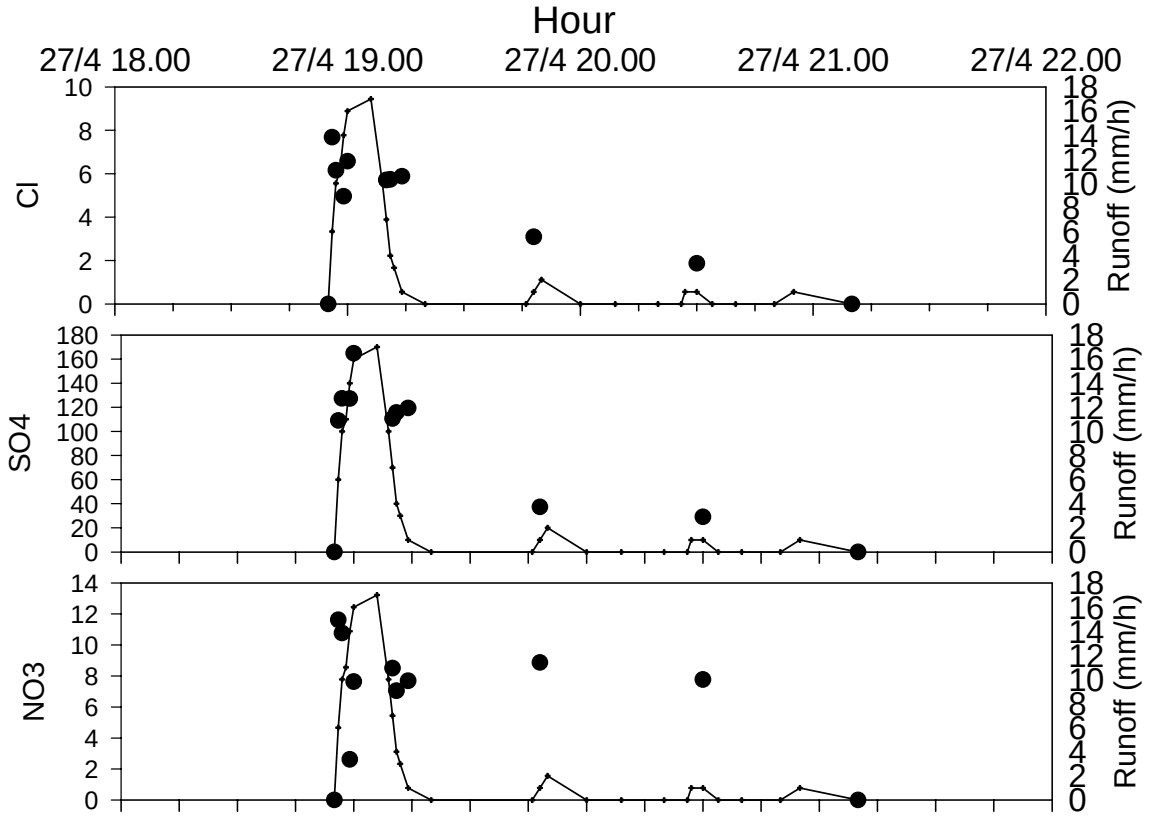
b[1]=999

r ²=0,9227

Crue du 27 avril 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments dissous (< 1µm) en mg/L



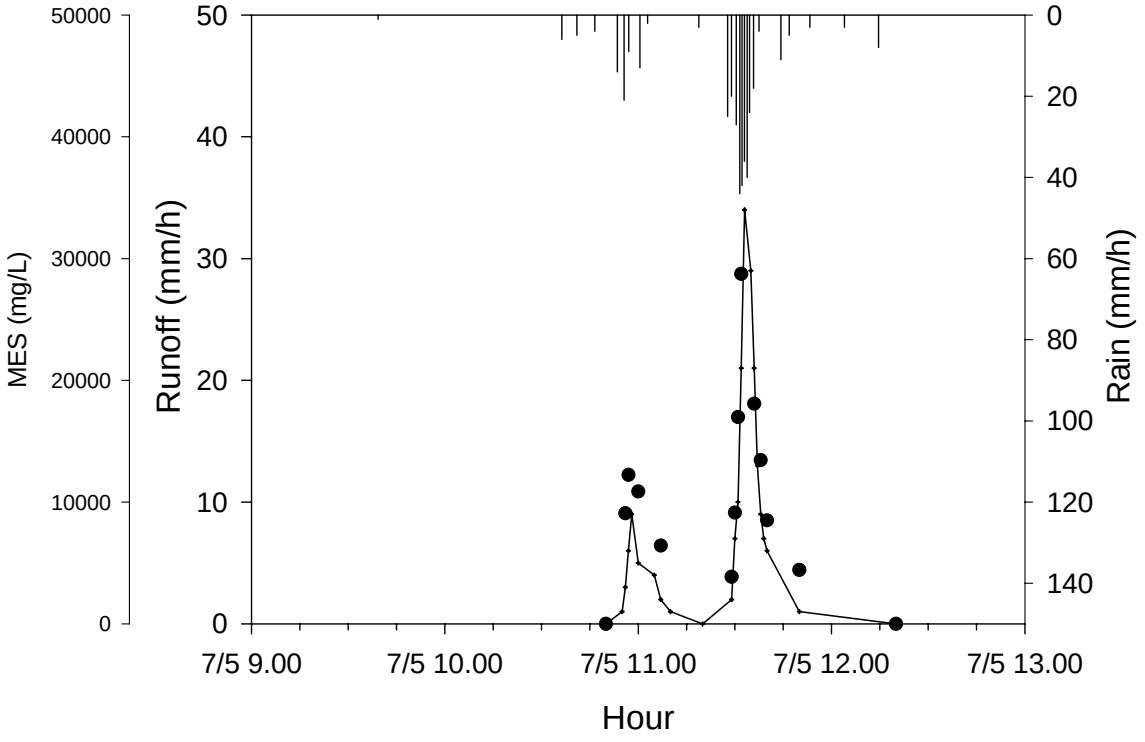
Crue du 27 avril 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments dissous (< 1µm) en mg/L



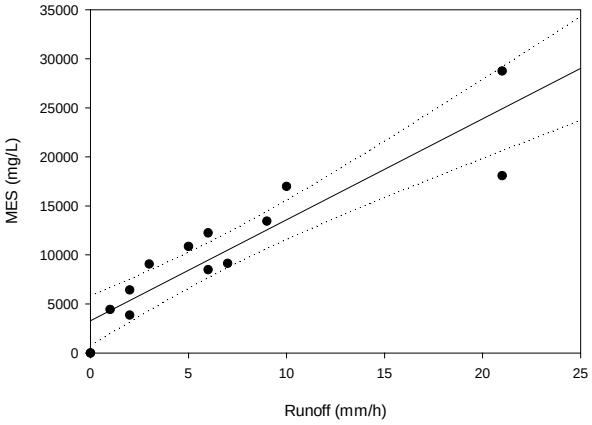
Crue du 7 mai 2000 - parcelle AW6 Roujan

Pluie : Imax (mm/h)= 44
P (mm) = 17

Ruissellement : Imax(mm/h) = 34
Conductivité (µS/cm) = 191
pH = 7,90



Corrélation MES / Débit



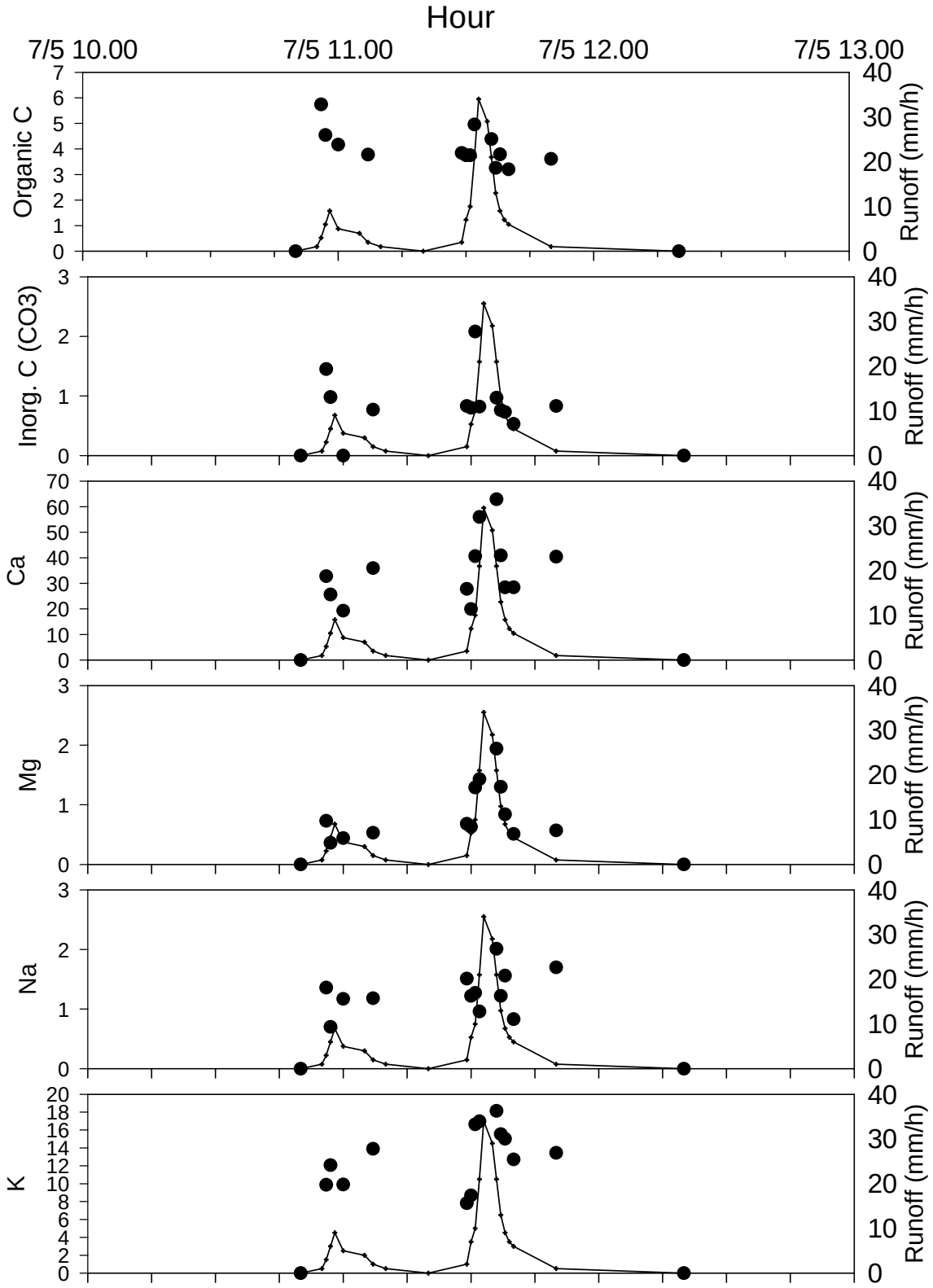
Y=b[0]X+b[1]

b[0]=3286

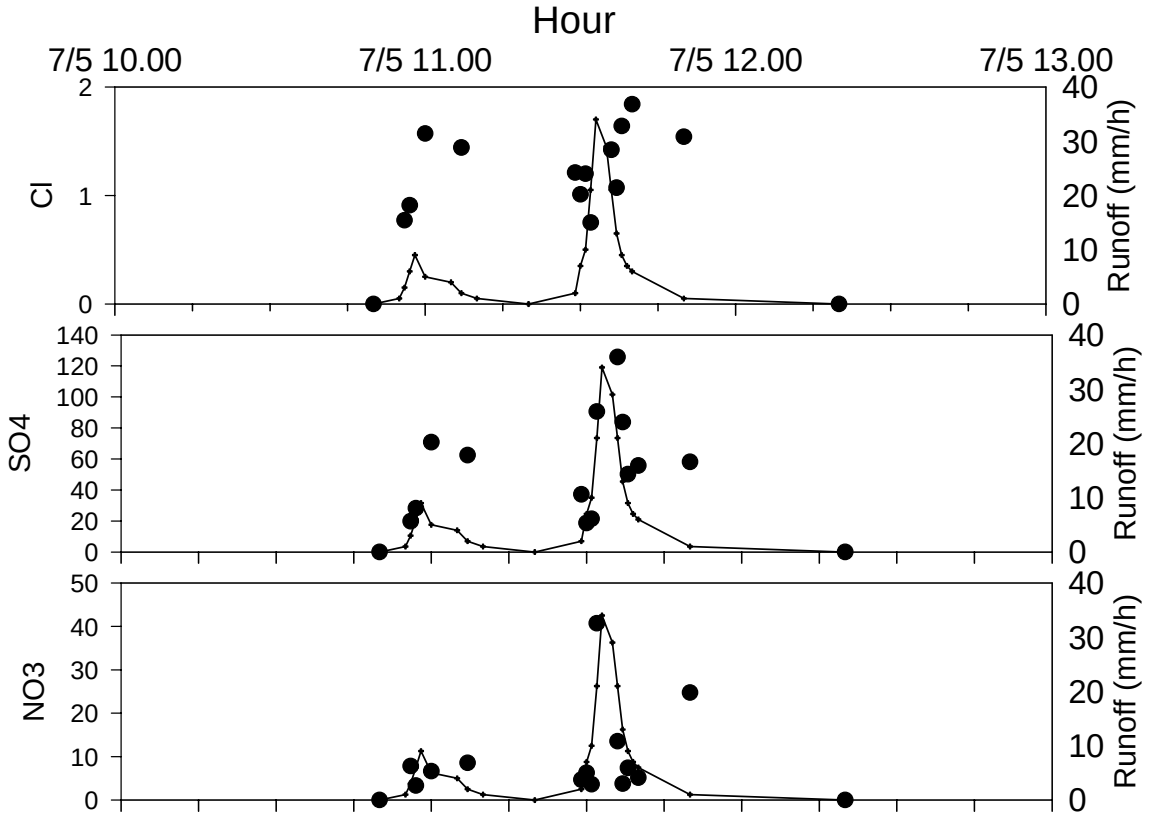
b[1]=1029

r ²=0,8405

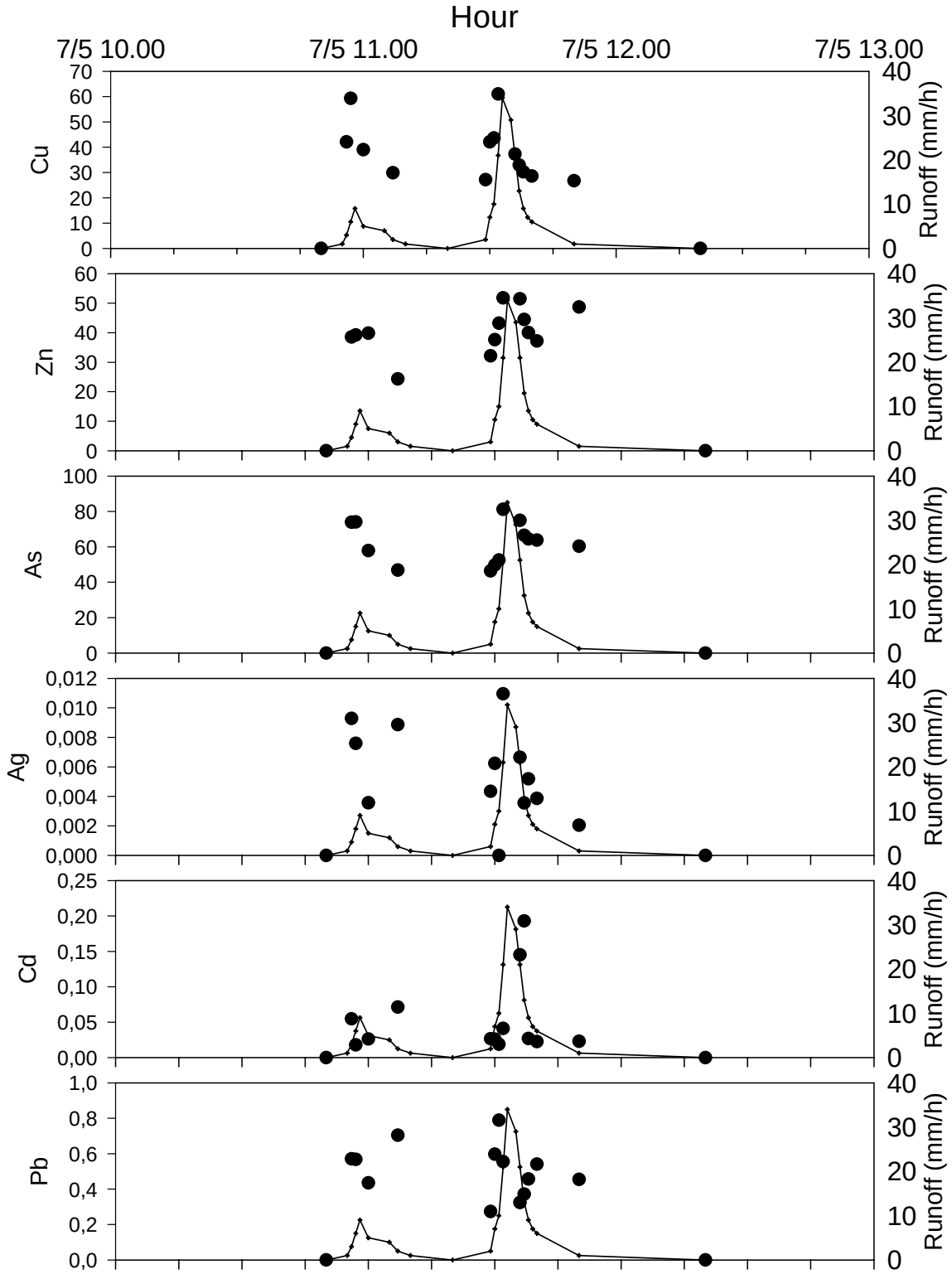
Crue du 7 mai 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments dissous (< 1µm) en mg/L



Crue du 7 mai 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments dissous (< 1µm) en mg/L



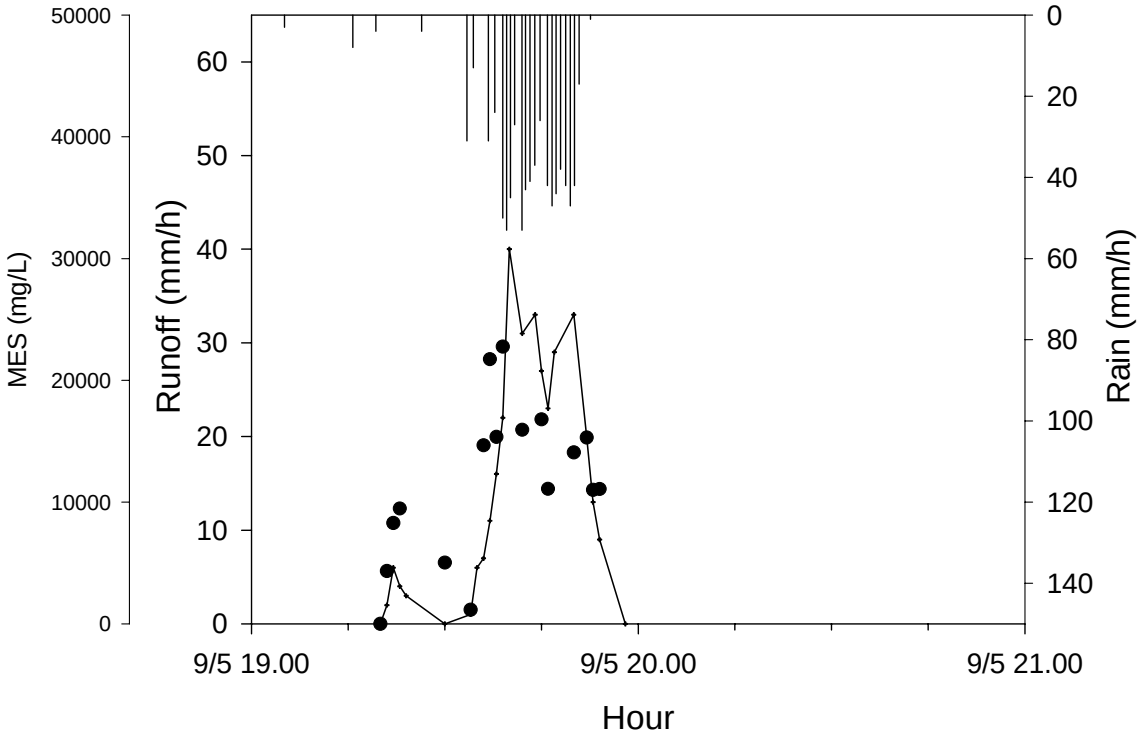
Crue du 7 mai 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments traces dissous (< 1µm) en µg/L



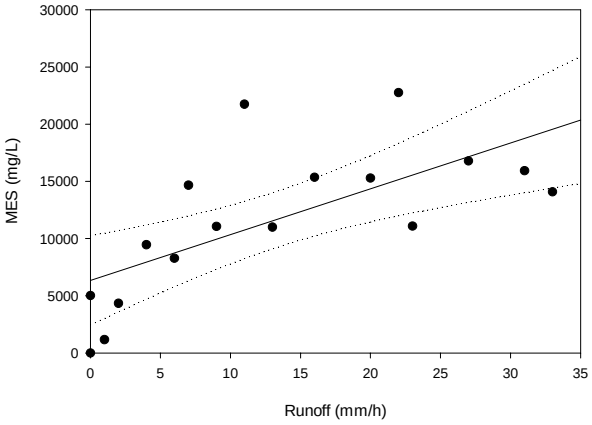
Crue du 9 mai 2000 - parcelle AW6 Roujan

Pluie : Imax (mm/h)= 53
P (mm) = 17

Ruissellement : Imax(mm/h) = 40
Conductivité (µS/cm) = 134
pH = 7,70



Corrélation MES / Débit



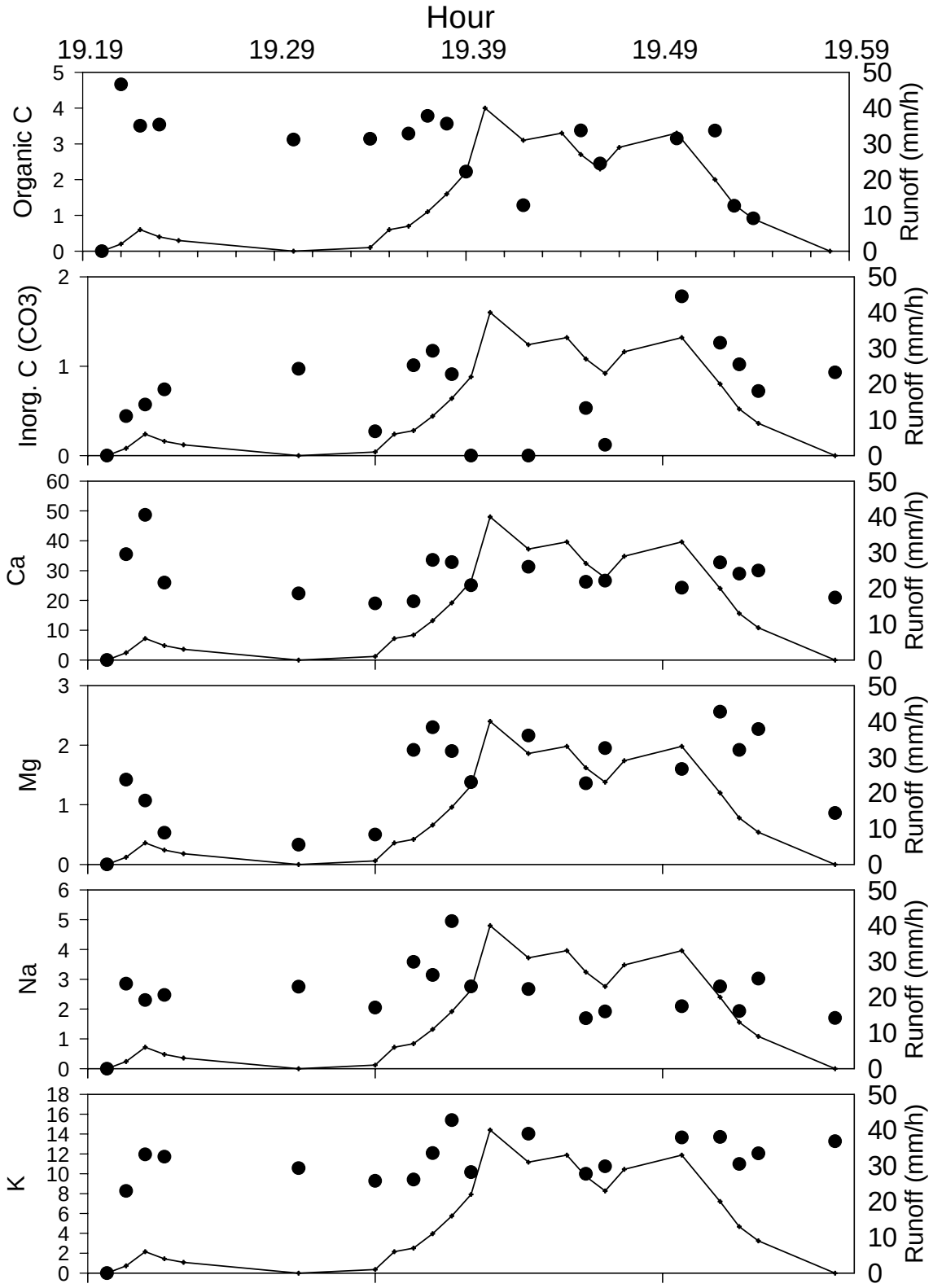
Y=b[0]X+b[1]

b[0]=6345

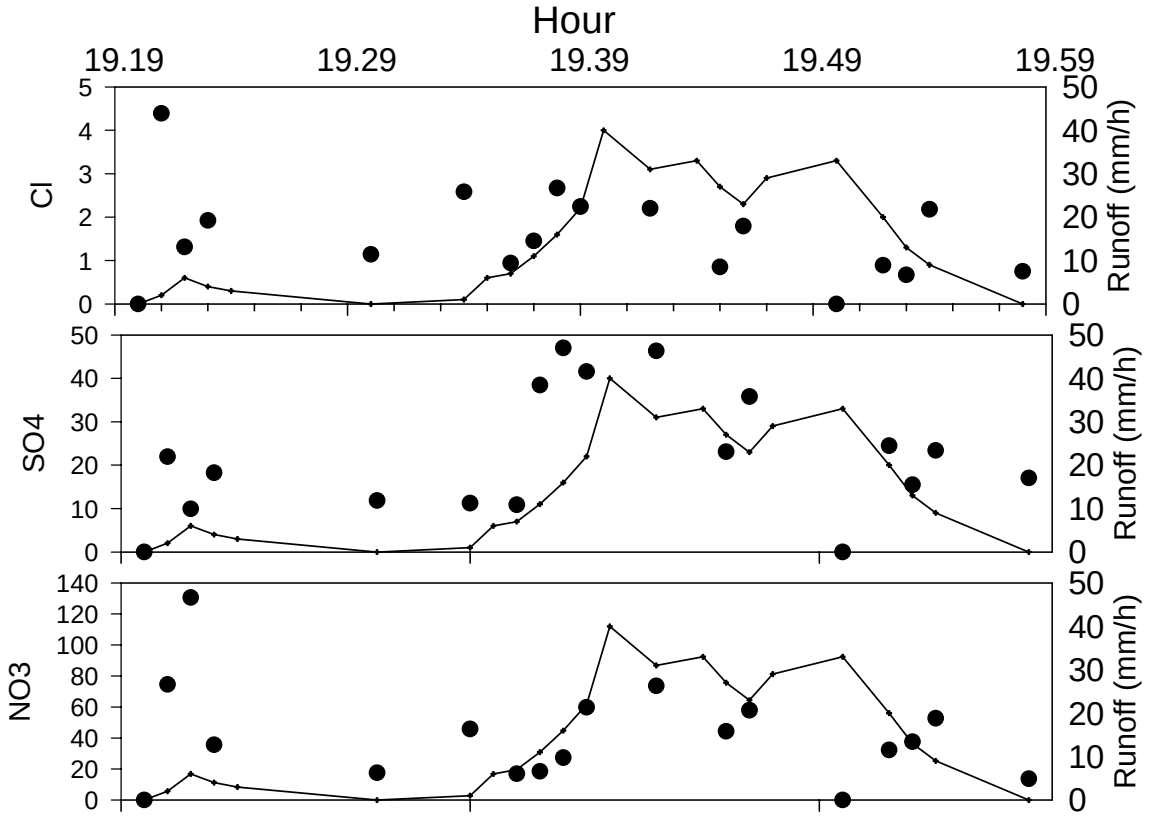
b[1]=400

r ²=0,4644

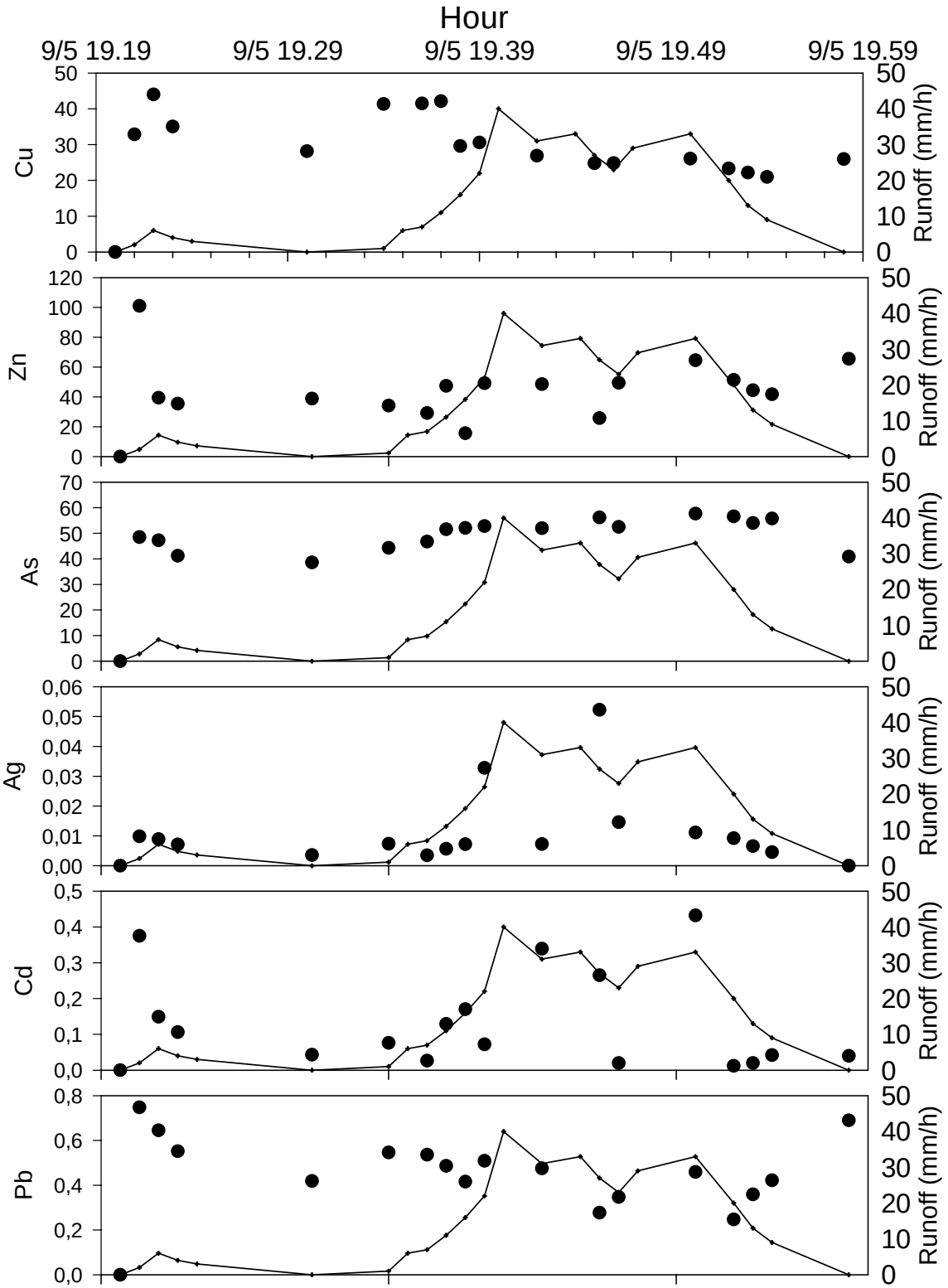
Crue du 9 mai 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments dissous (< 1µm) en mg/L



Crue du 9 mai 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments dissous (< 1µm) en mg/L



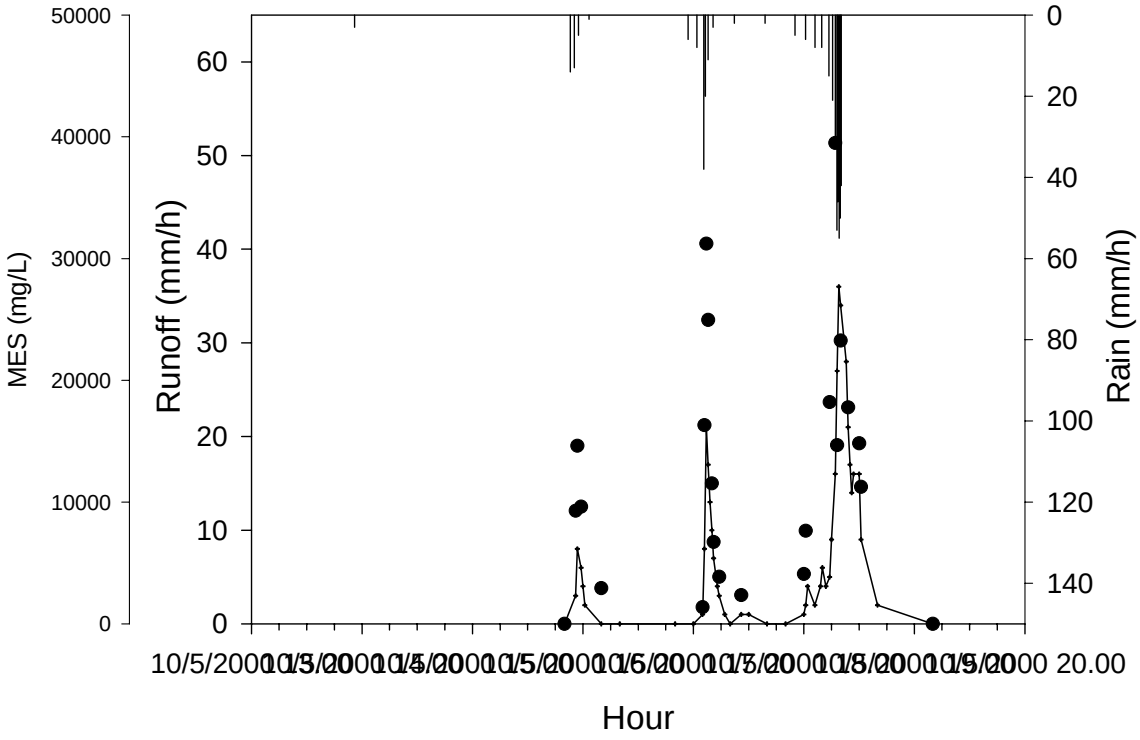
Crue du 9 mai 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments traces dissous (< 1µm) en µg/L



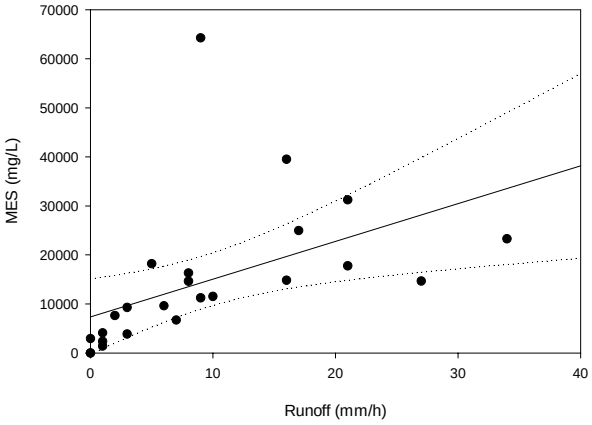
Crue du 10 mai 2000 - parcelle AW6 Roujan

Pluie : Imax (mm/h)= 55
P (mm) = 24

Ruissellement : Imax(mm/h) = 36
Conductivité (µS/cm) = 97
pH = 7,70



Corrélation MES / Débit



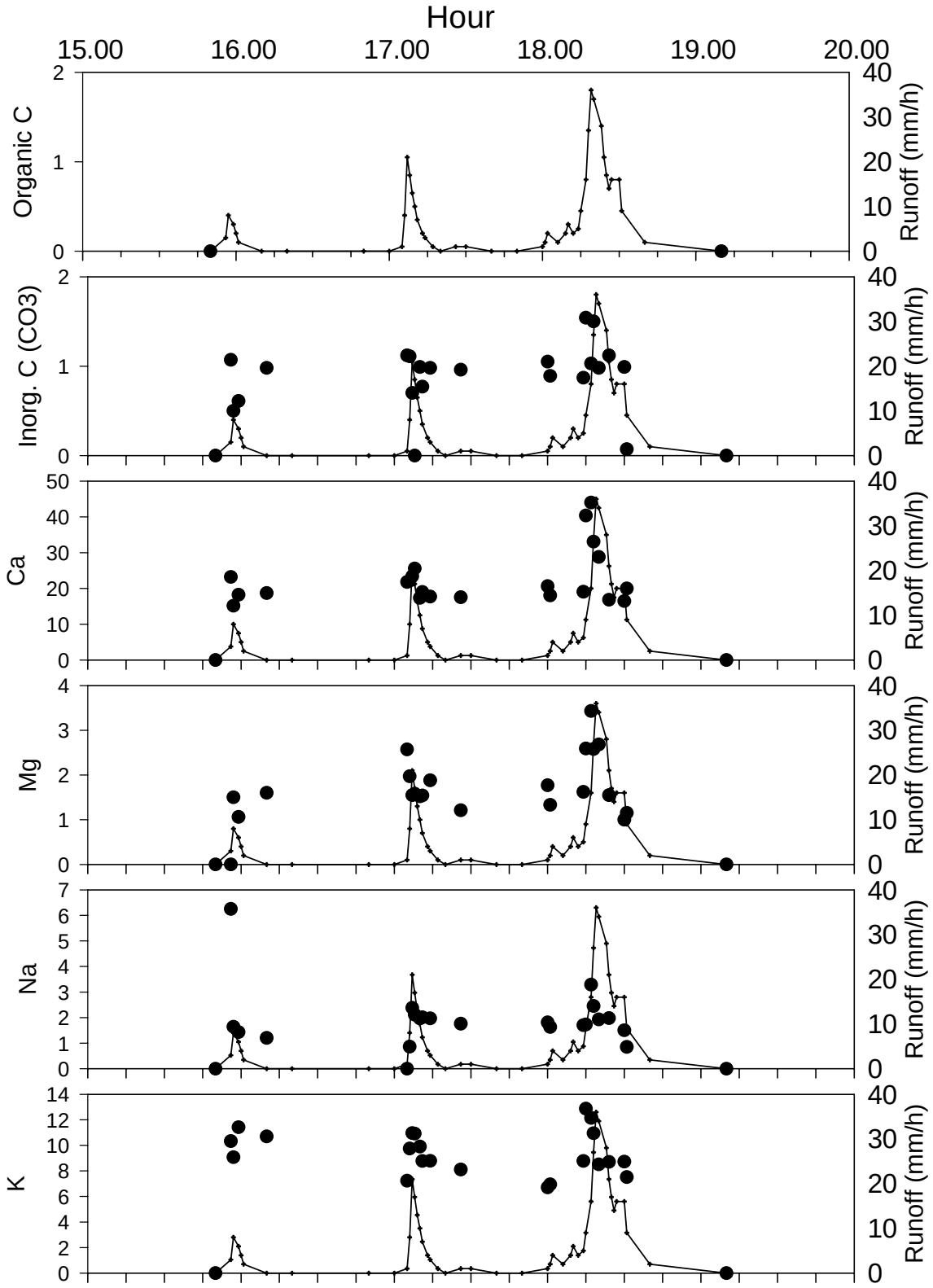
Y=b[0]X+b[1]

b[0]=7378

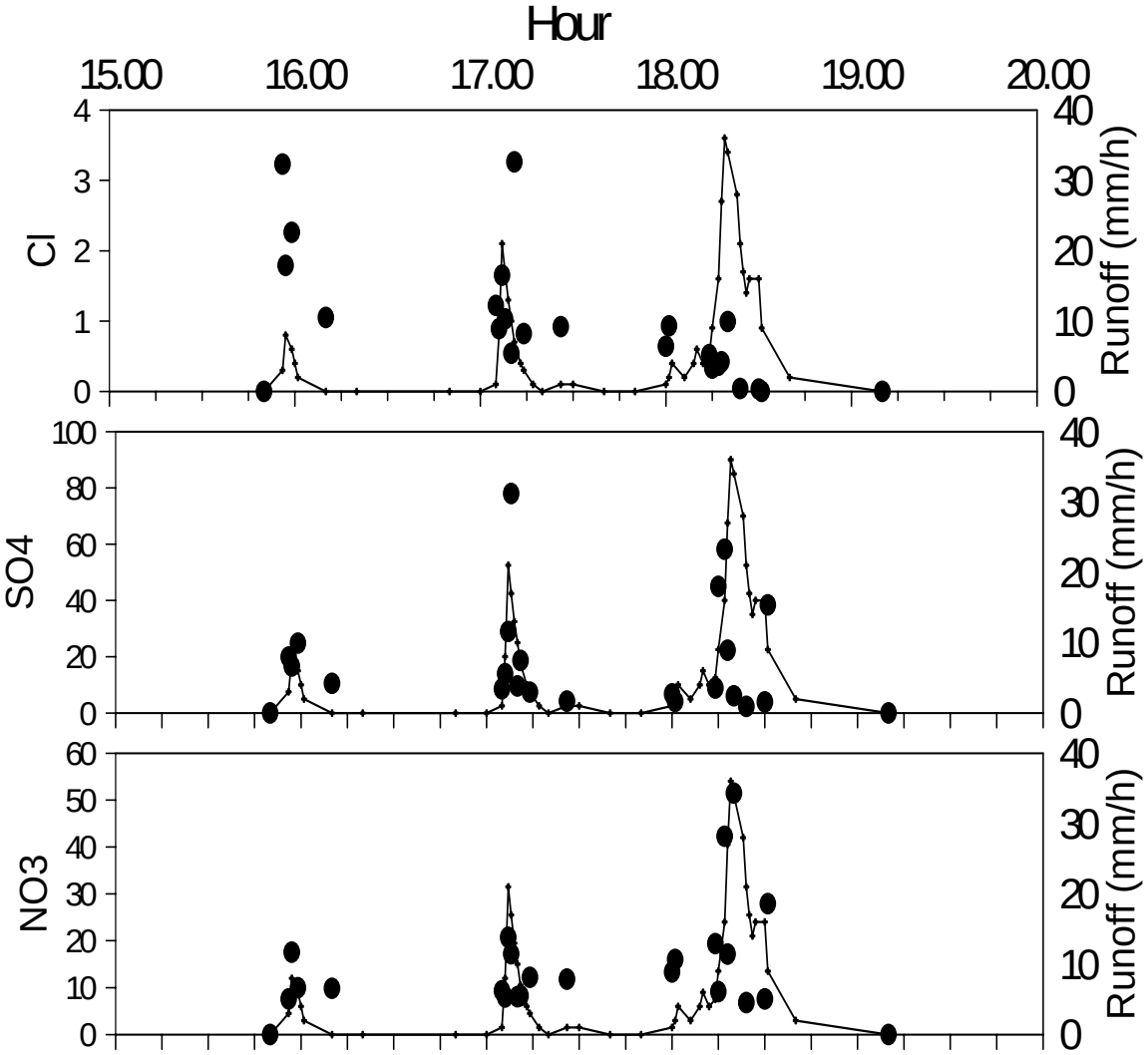
b[1]=769

r ²=0,2412

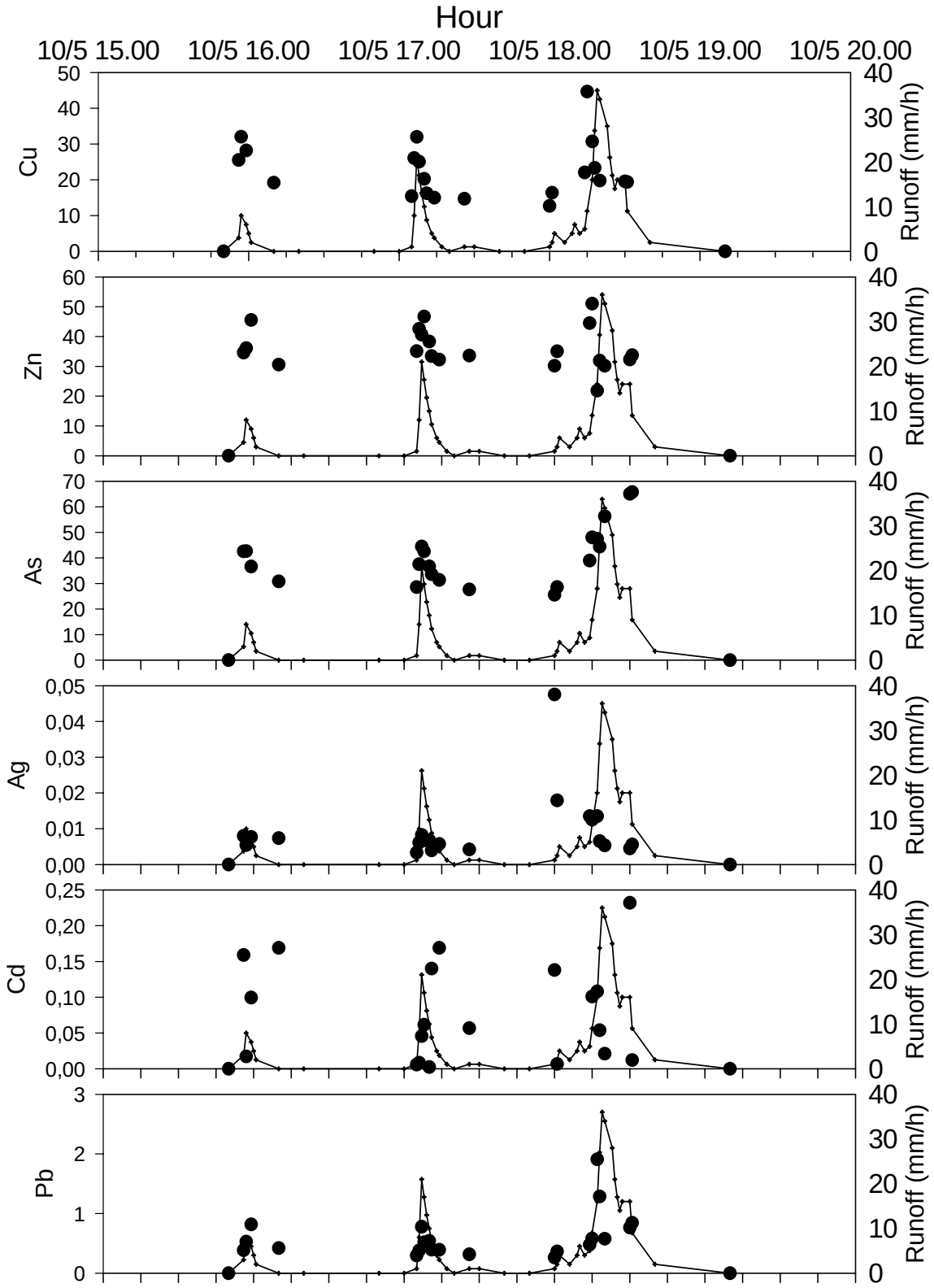
Crue du 10 mai 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments dissous (< 1µm) en mg/L



Crue du 10 mai 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments dissous (< 1µm) en mg/L



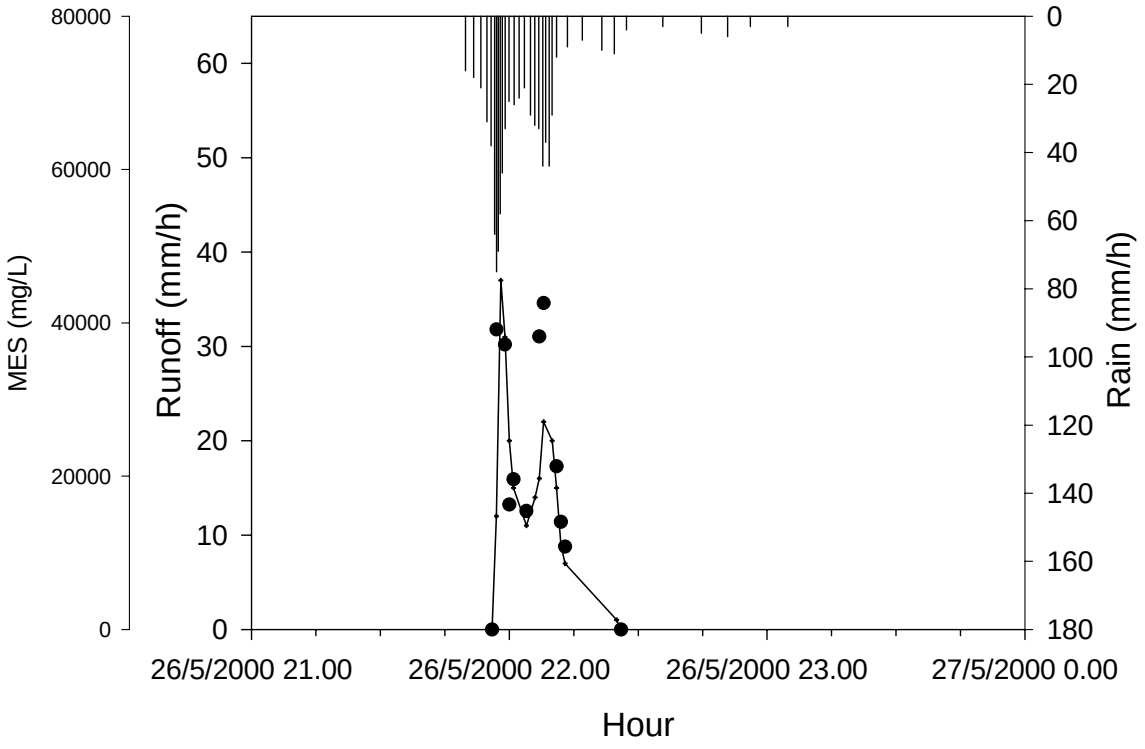
Crue du 10 mai 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments traces dissous (< 1µm) en µg/L



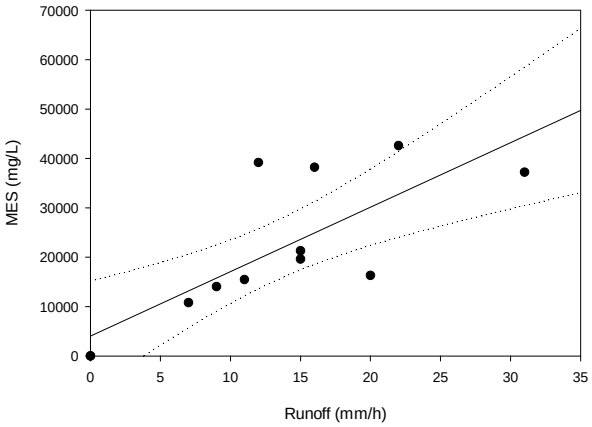
Crue du 26/27 mai 2000 - parcelle AW6 Roujan

Pluie : Imax (mm/h)= 75
P (mm) = 16

Ruissellement : Imax(mm/h) = 37
Conductivité (µS/cm) = 256
pH = 7,80



Corrélation MES / Débit



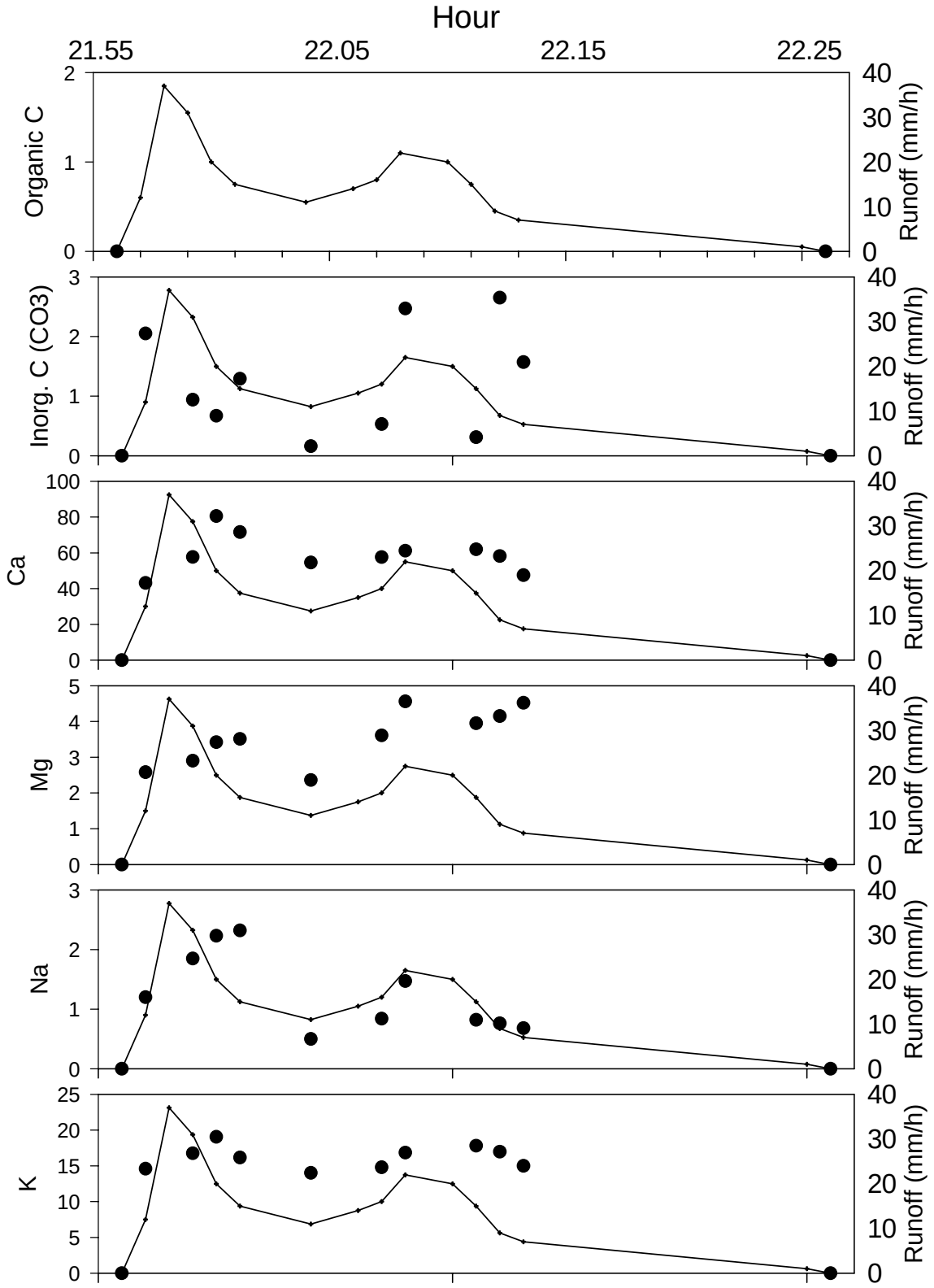
Y=b[0]X+b[1]

b[0]=4031

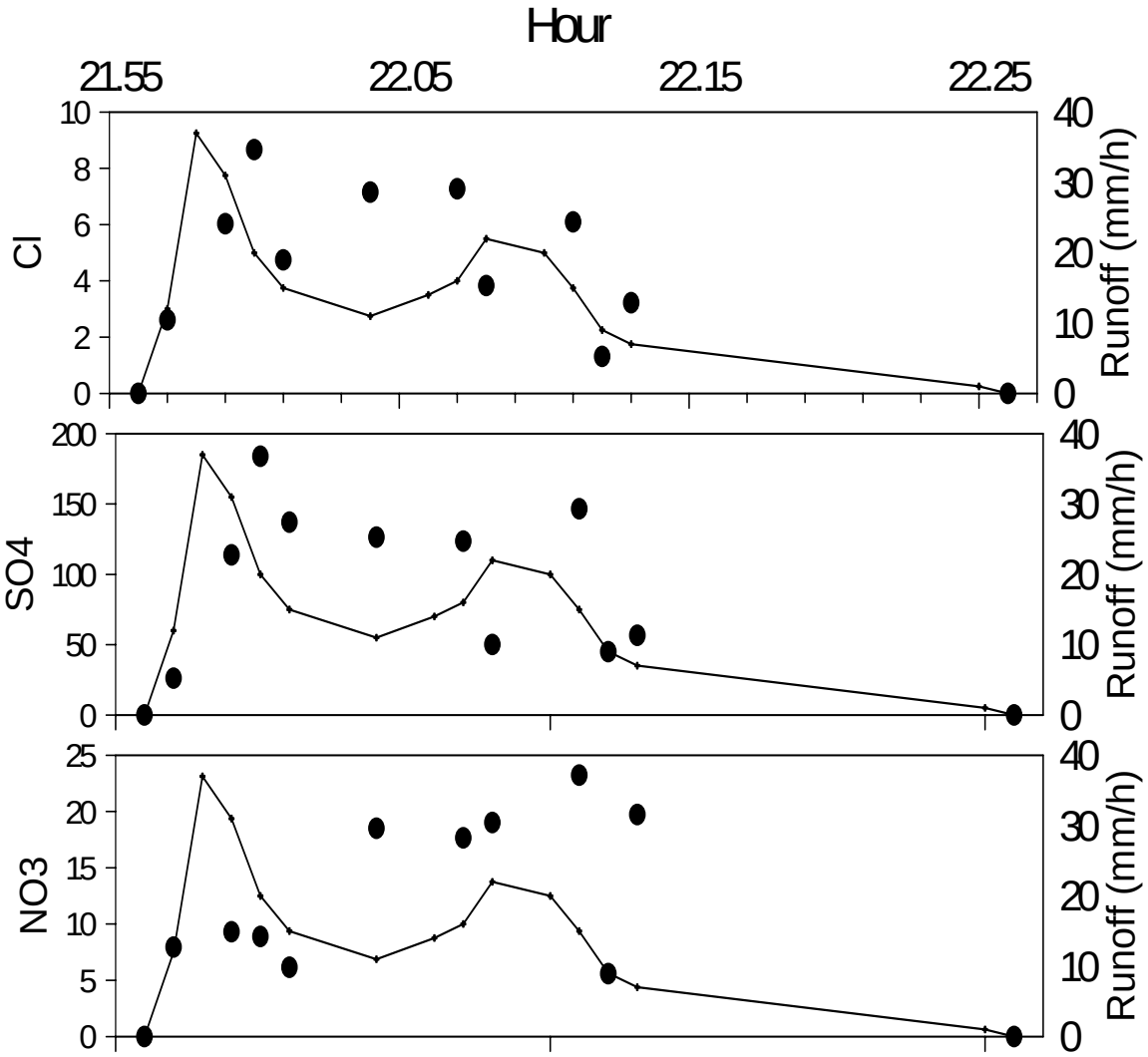
b[1]=1304

r ²=0,6035

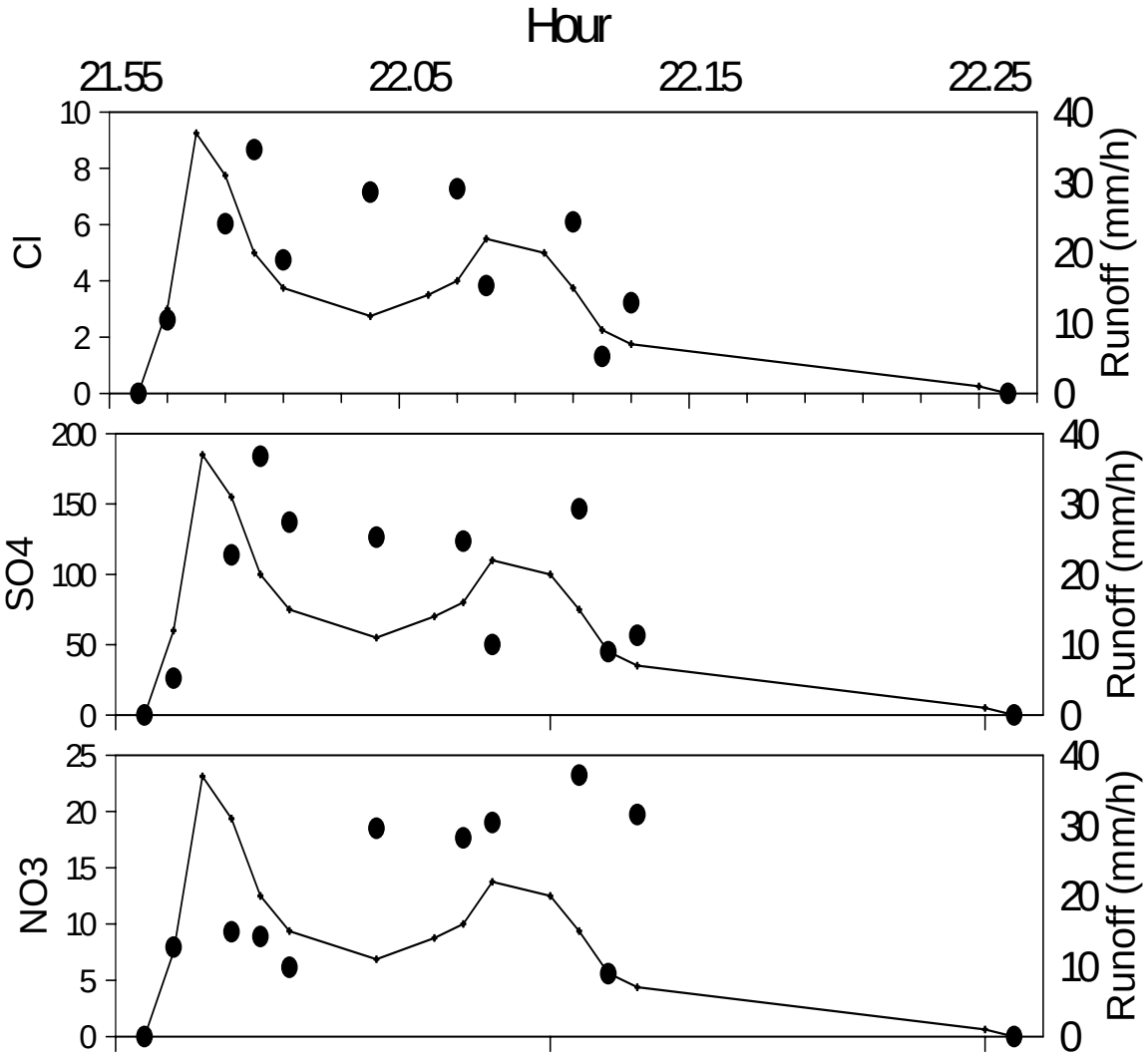
Crue du 26/27 mai 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments dissous (< 1µm) en mg/L



Crue du 26/27 mai 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments dissous (< 1µm) en mg/L



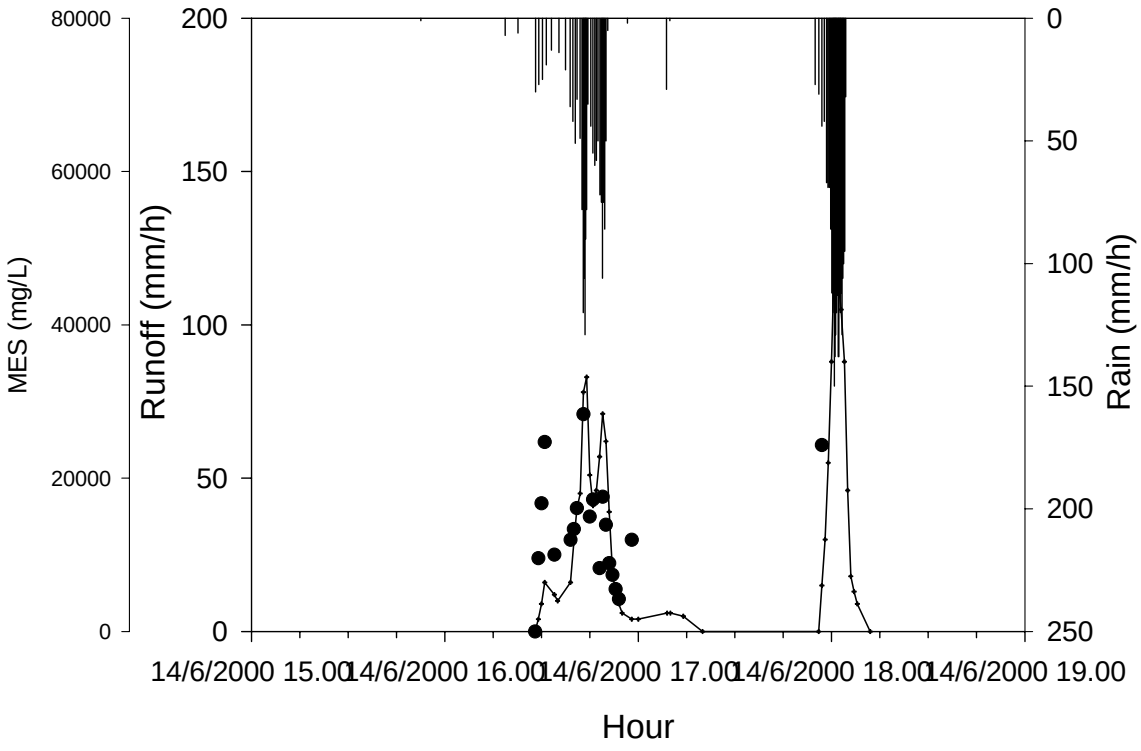
Crue du 26/27 mai 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments dissous (< 1µm) en mg/L



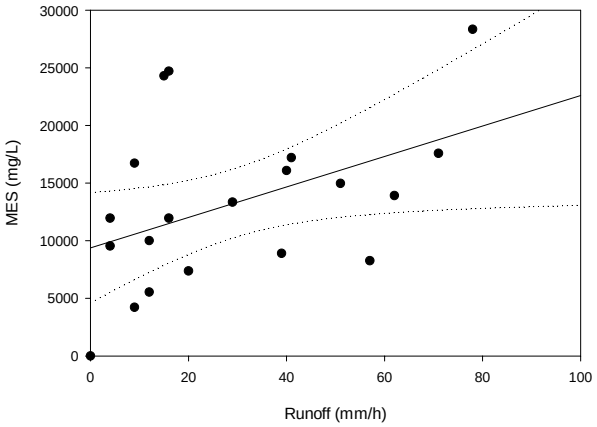
Crue du 14 juin 2000 - parcelle AW6 Roujan

Pluie : Imax (mm/h)= 75
P (mm) = 16

Ruissellement : Imax(mm/h) = 37
Conductivité (µS/cm) = 256
pH = 7,80



Corrélation MES / Débit



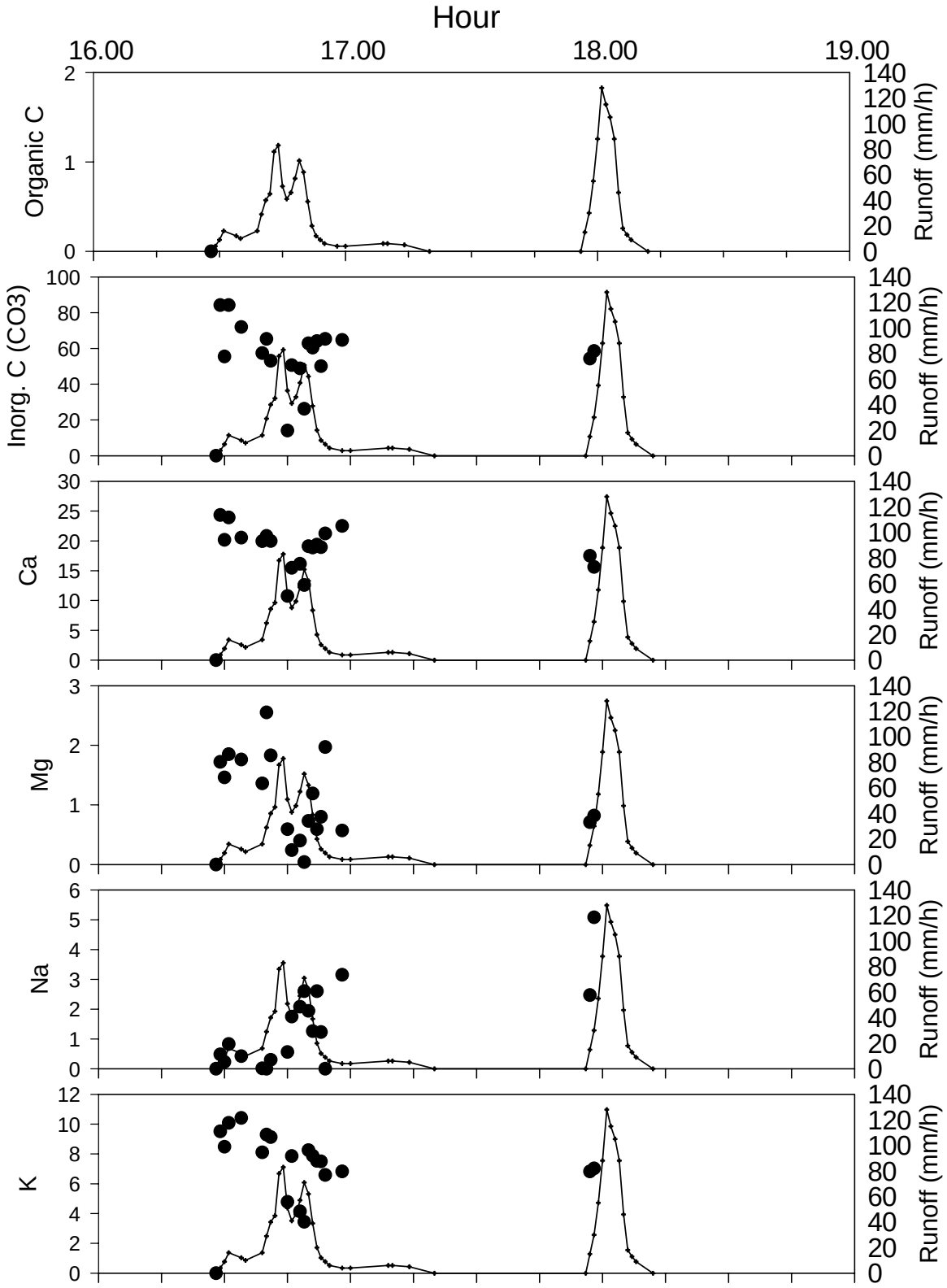
Y=b[0]X+b[1]

b[0]=9382

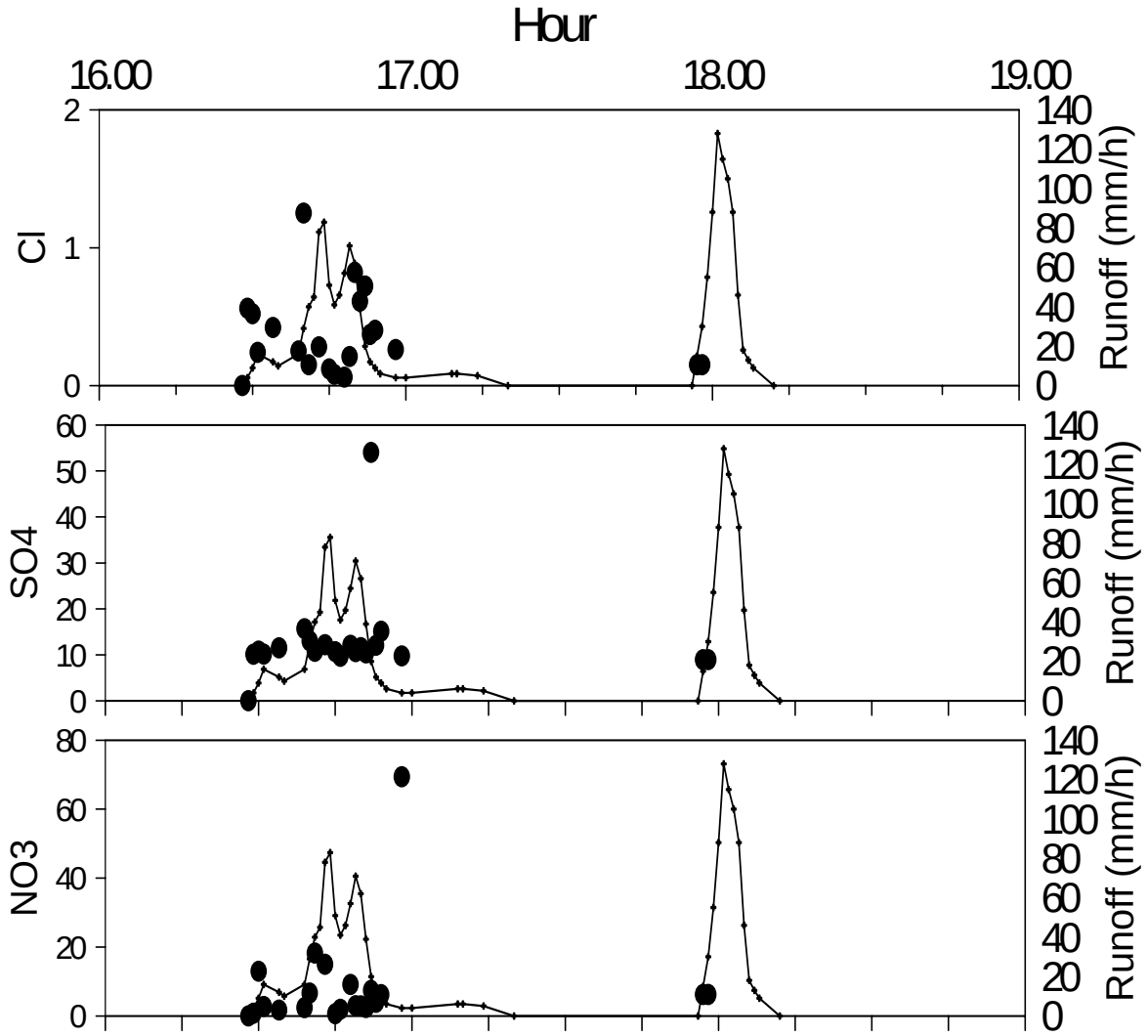
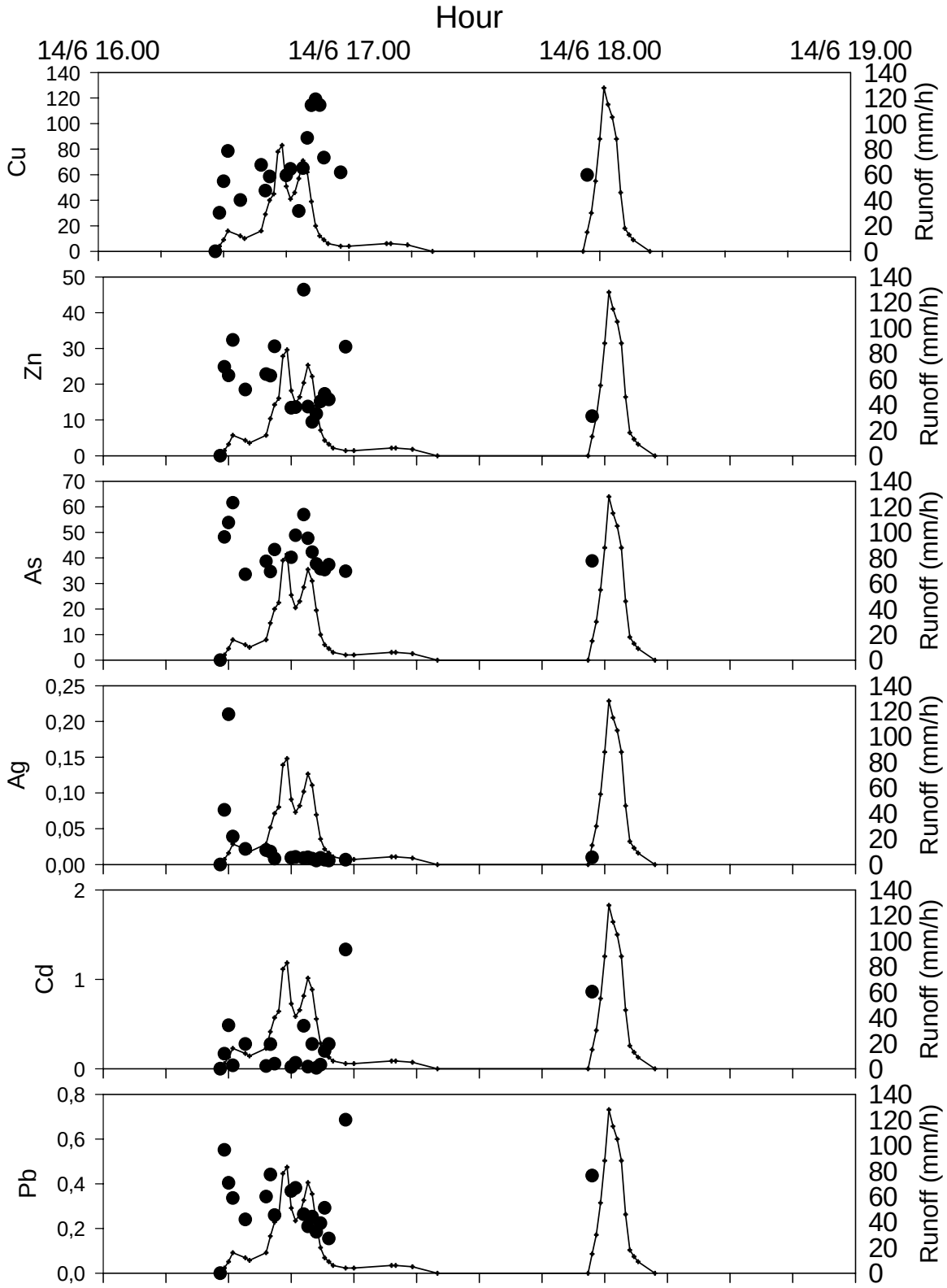
b[1]=132

r ²=0,1989

Crue du 14 juin 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments dissous (< 1µm) en mg/L



Crue du 14 juin 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments dissous (< 1µm) en mg/L



Crue du 14 juin 2000 - parcelle AW6 Roujan
éléments traces dissous (< 1µm) en µg/L