



Evaluation de gains biologique et écologique associés à une réduction d'intrants polluants en milieu aquatique



Avec la collaboration de :



Rapport général

Sommaire

	pages
A/ Bilan du projet	
I/ Objectifs	3
II/ Intérêt pour la Région	6
III/ Gestion du projet - rôle des partenaires	7
IV/ Produits finaux	9
V/ Actions prévues d'exploitation et de dissémination	13
VI/ Bilan de l'ensemble du projet et faits marquants	13
VII/ Contraintes et difficultés	14
VIII/ Devenir	15
B/ Partenariat socio-économique	16
Résumé du projet	17
ANNEXE SCIENTIFIQUE	18

Evaluation de gains biologique et écologique associés à une réduction d'intrants polluants en milieu aquatique

A/ Bilan du projet

I/ Objectifs

Le projet « Evaluation de gains biologique et écologique associés à une réduction d'intrants polluants en milieu aquatique » avait pour objectif d'apporter des éléments d'information et de compréhension sur l'impact associé à des micropolluants organiques sur les milieux aquatiques récepteurs et sur les possibilités de réduction de cet impact. Cet objectif s'est décliné en trois sous-questions:

- Comment réagissent les communautés d'organismes aquatiques à la pression polluante sur le milieu aquatique et à son éventuelle réduction ? Quelle est l'inertie des communautés en terme de biodiversité et de fonctionnalités ?
- Quelles méthodes de réduction et de traitement des intrants peut-on mettre en œuvre, dans un contexte socio-économique donné ?
- Comment peut-on évaluer un gain écologique ou biologique suite à des opérations de réduction d'intrants polluants ?

L'approche de ces questions s'est faite en s'appuyant sur un modèle d'étude : un petit bassin versant rural, en zone viticole, qui représente un cas de figure fréquent dans la Région Rhône-Alpes. Ce bassin versant expérimental (le bassin de la Morcille) est situé dans le Beaujolais à 60km au Nord de Lyon et participe au Site Atelier Ardières Morcille, lui même inscrit dans la Zone Atelier du Bassin du Rhône.

Le programme a été organisé en **5 opérations** concertées :

Opération 1 : Caractérisation *in situ* (état chimique et biologique des milieux)

Opération 2 : Capacité de récupération (résilience) des communautés *in situ*

Opération 3 : Caractérisation de l'occupation des sols et modes de gestion agricole

Opération 4 : Méthodes physico-chimiques d'élimination des phytosanitaires (photo-dégradation et dégradation « catalysée »)

Opération 5 : Dégradation biologique des phytosanitaires

En complément aux approches globales *in situ*, nous avons choisi **d'approfondir les travaux** en travaillant sur un **phytosanitaire modèle** : le Diuron (herbicide, phényl urée) qui, dans la Directive Cadre européenne sur l'Eau (REF.....) est une substance prioritaire

susceptible d'être réévaluée en « dangereuse prioritaire ». Il est donc apparu pertinent d'approfondir la connaissance de sa dynamique physique et de son écotoxicité. Ce composé modèle a permis de mieux appréhender les mécanismes précis de dégradation, de comportement et d'effet toxique de phytosanitaires,

Sur un plan « réglementaire », les recherches effectuées s'inscrivaient dans le contexte de la DCE, qui impose une amélioration de l'état des milieux aquatiques. Nous avons donc organisé les travaux en vue d'une caractérisation de la situation écologique du cours d'eau en relation avec les teneurs en contaminants dans l'eau (gradient de contamination amont-aval) et l'occupation des sols sur le bassin versant. Puis, en abordant les possibilités de réduction des apports de contaminants (techniques de dégradation du phytosanitaire, avec une connaissance approfondie des mécanismes chimiques ...)

Ces travaux étaient organisés selon le modèle de type DPSIR (Driving force, Pressure, State, Impact, Response; ODE, 2000). Ce modèle correspond à une structuration de travaux de recherche particulièrement applicable à des études écosystémiques, à l'échelle d'un bassin versant, permettant de hiérarchiser les questions sous-tendant ce projet : en quoi des activités humaines modifient-elles l'environnement et comment peut-on élaborer des solutions pour en réduire les effets ? Les travaux développés ici ne sont pas exhaustifs, mais ils alimentent la compréhension du fonctionnement d'un écosystème fortement anthropisé, l'identification de causes de dysfonctionnement et proposent des pistes de réduction des pressions polluantes.

Résultats acquis versus objectifs :

Objectifs	Résultats
Caractérisation <i>in situ</i> (état chimique et biologique des milieux)	<p>Gradient amont aval croissant de composés chimiques de nature trophique et de toxique.</p> <p>Sur la base d'indice normalisé (Invertébrés), mise en évidence d'un gradient de dégradation amont - aval corrélé à l'augmentation croissante de la surface en vigne.</p> <p>Changement de diversité des communautés algales, avec sélection de souches résistantes aux phytosanitaires à l'aval.</p> <p>Mortalité de truites (stade embryo-larvaires) majoritairement liée aux crues, mais suspicion d'effet génotoxique .</p>
Capacité de récupération (résilience) des communautés <i>in situ</i>	<p>Suite à des problèmes de terrain (crues, puis sécheresse), seuls des essais de laboratoire ont montré une certaine capacité de résilience des communautés microbiennes (diversité bactérienne et algale) après 3 à 4 semaines. De nouveaux essais de terrain et sur un plus long terme sont en cours (automne 2006).</p>
Caractérisation de l'occupation des sols et modes de gestion agricole	<p>Etablissement d'un SIG de l'ensemble du bassin versant, détaillant l'occupation des sols, les réseaux routiers, de fossés de drainage, Ce SIG établit également les connectivités des parcelles de vignes avec le cours d'eau récepteur.</p>
Méthodes physico-chimiques d'élimination des phytosanitaires (photo-dégradation et dégradation « catalysée »)	<p>Trois techniques ont été testées (oxydation par voie humide et photodégradation catalysées, sonolyse,...) sur un phytosanitaire modèle, le Diuron. Des essais en laboratoire ont précisé les cinétiques et les produits de dégradation, ainsi que les intermédiaires réactionnels. La toxicité de ces produits a été testée (test algues, test rotifère).</p> <p>Enfin, la dégradation du Diuron par photolyse a montré la formation de résidus multiples et l'interaction avec d'autres composés type cuivre sur la cinétique de dégradation.</p> <p>Des essais de terrain en situation réelle, en partenariat avec des industriels du traitement d'effluents, ont permis d'évaluer les performances de deux systèmes : par photocatalyse et par traitement biologique (cf ci-dessous).</p>
Dégradation biologique des phytosanitaires	<p>Des essais de terrain en situation réelle, en partenariat avec un industriel du traitement d'effluents, ont permis d'évaluer les performances d'un système à boue activée.</p>

II/ Intérêt pour la Région

Le bassin versant de la Morcille, intégré à celui de l'Ardières est une bonne représentation de l'ensemble du massif du Beaujolais : même géologie, même altitude moyenne, même pente, même climat, même type d'occupation des sols. Il est donc a priori un bon modèle d'étude pour l'ensemble de cette zone viticole. Les résultats obtenus ont été exprimés en terme d'impact, en terme de relation entre qualité des eaux et occupations des sols ou en terme de techniques .

Il est typique de petits bassins versants fréquemment présents en Région Rhône-Alpes : les zones viticoles, milieu rural, en tête de bassin. Par ailleurs, ce bassin versant, par son type de contamination par les phytosanitaires, est typique de ceux de l'axe Saône (Beaujolais, Bourgogne) qui fait partie des zones les plus contaminées de Rhône-Alpes (Agence de l'Eau, 2004¹) (figure 1).

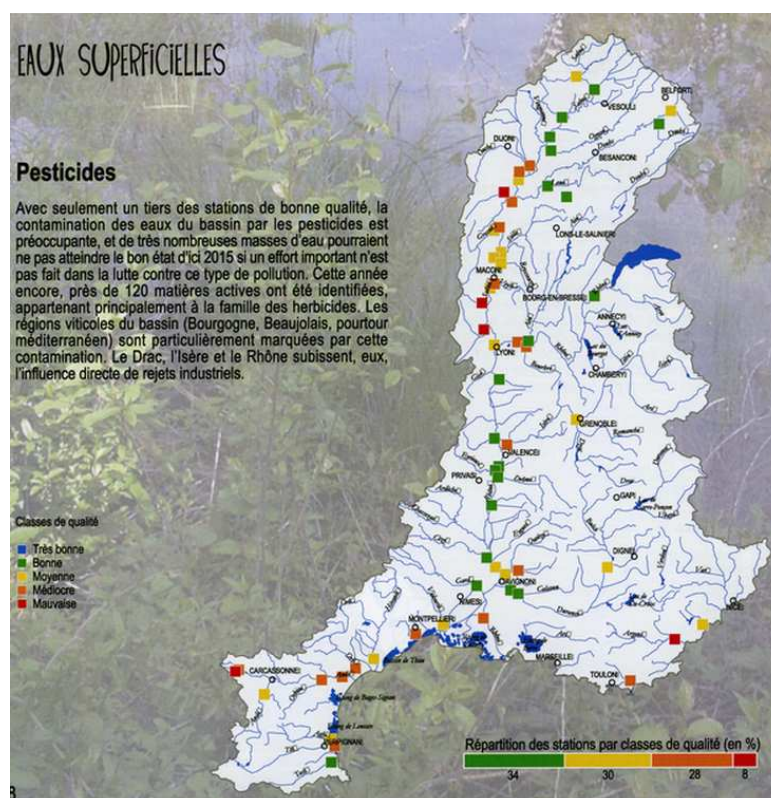


Figure 1 : Niveau de contamination des eaux superficielles par les pesticides dans le bassin Rhône-Alpes (état en 2004) - Carte Agence de l'Eau -

L'intérêt de cette étude (et, au delà, du site d'étude lui même qui sera pérennisé, cf VIII) est d'être au cœur d'un problème environnemental marqué en Région et au plan national et qui est au centre de nombreuses questions sociétales et scientifiques actuellement débattues².

¹ Agence de l'Eau RMC, DIREN Rhône - Alpes, 2004, Qualité des eaux superficielles et souterraines en Rhône Méditerranée, 16p.

² Collectif INRA-Cemagref, 2005, Pesticides, agriculture et environnement : réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux, Synthèse du rapport d'expertise, M. Volz Ed, 64p.

Le volet traitement « à la ferme » des résidus de phytosanitaires, expérimenté en fin de ce programme, est également un exemple extrapolable à de multiples sites régionaux.

Sur le plan des réseaux scientifiques, ce projet aura permis de faire se rencontrer et communiquer des disciplines variées (chimie, biologie, écotoxicologie) issues d'organismes différents de la Région, qui pour certains n'avaient jamais travaillé ensemble.

III/ Gestion du projet - rôle des partenaires

Le projet a été construit dès l'origine comme une approche pluridisciplinaire, pour fournir des éléments cognitifs et « opérationnels » sur le fonctionnement d'un bassin versant viticole, incluant de la recherche fondamentale et appliquée, une réalisation de type « ingénierie » et un volet formation (par l'accueil de stagiaires et de doctorants,...). Construit sur une base plus générale à l'origine, le projet a été recentré sur le contaminants phytosanitaires, suivant en cela l'avis des évaluateurs.

Chaque partenaire a apporté sa compétence (tableau 1).

partenaires	Rôle et compétence dans le programme
Cemagref - UR QELY	Transfert de pollution - SIG - Ecologie microbienne - Chimie des eaux
Cemagref - UR BELY	Ecologie des invertébrés
CNRS - IRC	Chimie analytique - Techniques de dégradation de produits organiques par oxydation catalysée par voie humide
CNRS - LACE	Chimie analytique - Techniques de dégradation de produits organiques par photocatalyse
Université Lyon I (UMR Chimie Analytique)	Chimie analytique - Dégradation de phytosanitaires par photolyse
ENTPE- Lab. Sciences de l'Environnement	Processus microbiens en sédiment et biofilm - Ecotoxicologie
Université de Savoie - LOCIE	Techniques de dégradation de produits organiques par sonolyse
INRA Thonon	Microbiologie aquatique - Ecotoxicologie -
<i>Lycée Viticole de Bel - Air</i>	<i>Organisme de formation - Essais de traitement d'effluents</i>
<i>Aderbio</i>	<i>Société industrielle - Traitement biologique d'effluents phytosanitaires</i>
<i>Alsthrom -Résolution</i>	<i>Société industrielle - Traitement physique d'effluents phytosanitaires</i>
ZABR	Animation - appui à valorisation

Tableau 1 : Les partenaires et leur rôle . En italique, les partenaires non partie prenante de la convention principale d'étude, mais ayant intégré le programme.

La gestion du projet s'est effectuée essentiellement lors de réunions annuelles plénières qui étaient l'occasion de faire le bilan des résultats acquis et de proposer et discuter les perspectives de l'année à venir. En cours d'année, des réunions plus restreintes par discipline ou par groupe ont eu lieu régulièrement.

Les subventions de fonctionnement attribuées ont couvert environ 55% des demandes. Au total, la Région Rhône-Alpes a apporté une aide de 220.720 € en fonctionnement et de 46.000€ en investissement³.

Bilan récapitulatif des subventions régionales :

Année	fonctionnement	Investissement
1	Demandé : 138.800 € Obtenu : 60.000 (soit 43,2 %)	Demandé : 40.295,7 € Obtenu : 30.000 (soit 74,5%)
2	Demandé : 129.500 € Obtenu : 90.000 (soit 69,5 %)	Demandé : 20.878,75 € Obtenu : 16.000 (soit 76,6%)
3	Demandé : 129.500 € Obtenu : 70.720 (soit 54,6 %)	Demandé : 0 Obtenu : 0

Tableau 2 : Répartition des subventions accordées

Ce projet régional s'est appuyé, pour certains de ses objectifs, sur d'autres conventions de recherche qui, avec des thématiques et des objectifs complémentaires, ont permis d'approfondir nos approches et de coordonner les sources de financement:

* Programme national ECCO - Périphyteau (2004-2005) -

Le programme Périphyteau avait pour objectif d'étudier la dynamique des microorganismes du périphyton exposés à des phytosanitaires issus du traitement des vignobles. L'effet de ces substances sur la structure taxonomique et fonctionnelle du périphyton est mal connu : y a-t-il changement de diversité ? de fonctions ? quelle est la résilience de ces systèmes microbiens ? Par ailleurs, *in situ*, l'effet des phytosanitaires s'exprime dans un contexte chimique de nutriments et de matières organiques, qui sont susceptibles d'interagir soit avec les micropolluants eux même (changement de bio disponibilité) soit sur les microalgues et les bactéries du biofilm, changeant en cela la diversité des organismes et les fonctionnalités du biofilm.

Complémentarité avec l'AO Région: Périphyteau a permis de développer le volet microbien, en permettant entre autres au développement des approches moléculaires pour l'étude de la diversité bactérienne et algale.

* Programme REBECCA (2004-2006)- Programme européen du 6^{ème} PCRD -

Ce programme avait pour objectif de relier des descripteurs de qualité chimique des milieux aquatiques à la qualité écologique de ces systèmes, en utilisant des indices de qualité biologique (indices diatomées, invertébrés,...).

Complémentarité avec l'AO Région : Rebecca est un programme qui a permis de recueillir des données biologiques et chimiques sur le bassin versant de la Morcille et celui de l'Ardières, dans l'objectif de vérifier des relations « teneurs en contaminants et indice de qualité biologique des milieux », relations établies par ailleurs par d'autres partenaires européens. A ce titre, Rebecca a contribué financièrement à des analyses chimiques et biologiques (indices invertébrés) et a permis d'élargir l'approche de ce programme à un bassin versant plus vaste.

³ Aide à l'achat d'un spectromètre de fluorescence à l'ENSMStE et d'un chromatographe ionique au Cemagref de Lyon.

IV/ Produits finaux, valorisation

Documents provisoires et intermédiaires :

- Collectif, 2004, Evaluation de gains biologique et écologique associés à une réduction d'intrants polluants en milieu aquatique, Rapport d'avancement année 1 du programme CPER Rhône- Alpes, 28p.
- Collectif, 2005, Evaluation de gains biologique et écologique associés à une réduction d'intrants polluants en milieu aquatique, Rapport d'avancement année 2 du programme CPER- Appel d'Offre Développement Durable, Région Rhône Alpes, 120p
- Collectif, 2005, REBECCA- WP6 Validation : State report on case studies (Deliverable D5), Ed E. Penning, S. Groot, H. Duel, 6eme Framework Contract SSPI-CT-2003-502158
- Montuelle B., 2004, Proposition de création d'un Plateau - Site Atelier sur le Bassin Versant Ardières-Morcilles, Envirhôn'Alp, 6 pages

Documents universitaires :

BTS - DUT :

- * Revollon A., 2004, Nitrification et dénitrification en sédiment, BTS Anabiotec, 30p.
- * Dessaignean J. 2004, Etude de l'Oxydation Voie Humide Catalytique du Diuron , Mémoire IUT 2e année Lyon I - IRC, 43p.
- * Bas P-E, 2005, Nitrification et dénitrification en sédiment, BTS Anabiotec, 32p
- * Crozet M., 2006, Evaluation de la toxicité du Diuron et de ses produits de dégradation par le test Rotifère (*Brachionus calcyflorus*), BTS Anabiotec, 25p.

Master 1 & 2 :

- * Bacher A., 2004, Caractérisation des effets de produits phytosanitaires sur les communautés d'invertébrés benthiques de la Morcille, IUP Génie de l'Environnement, Université de Corse - Cemagref Lyon, 32 p.
- * Barasc M., 2004, Mise au point de la méthode d'analyse de pesticides dans les biofilms, Mémoire Ingénieur CPE Lyon - Cemagref Lyon, en cours
- * Blanc L., 2005, Impact de pressions polluantes sur le fonctionnement de communautés microbiennes aquatiques. Application à un bassin versant rural sous influence viticole, Master 2 Pro REMAC, U. Blaise Pascal, Clermont Ferrand.
- * Cigna J., 2004, Relation entre la pression d'anthropisation et l'activité globale de périphyton et sédiments, Maîtrise Environnement, Université Lyon I - Cemagref Lyon, 22p.
- * Escot G., 2005, Contribution à l'évaluation des potentialités de transfert des phytosanitaires vers les eaux de surface sur un petit bassin fortement anthropisé, à travers l'intégration de l'ensemble des voies de circulation superficielles d'origine anthropique (fossés, chemins, buses) au sein du Système d'Information Géographique existant. Master 1, Aménagement, option gestion des risques dans les collectivités territoriales, Université Jean Moulin, Lyon 3.
- * Faure N., 2005, Mise au point d'une méthode d'analyse du diuron dans les biofilms microbiens et contribution à l'étude du comportement des produits phytosanitaires dans les eaux d'un bassin versant viticole, Master 2 Pro Méthodes physico-chimiques d'analyse appliquées à l'environnement et aux matériaux. Université de Pau et des Pays d'Adour. 37 pages+ annexes.
- * Gaillard I. (2005). Contribution de bio-essais de toxicité sur *Chlorella vulgaris* pour le développement d'un biocapteur à cellules algales. Rapport de stage année de spécialisation «Biotech » de l'Université Catholique de Lyon, 35 p. + annexes.

- * Guedri H. (2006) . Développement d'un biocapteur optique à cellules entières. Etude des supports du biorécepteur. Rapport de Master 2 "Sciences de l'environnement industriel et urbain" de l'INSA de Lyon, 61p. + annexes
- * Hassani K., 2005, Effet de mélanges phytosanitaires sur les communautés microbiennes aquatiques, Master 2 recherche INSA Lyon.
- * Henry J. (2004). Développement de biocapteurs à cellules entières pour la surveillance des milieux aquatiques. DEA«Sciences et Techniques du Déchet, INSA Lyon, 58p.
- * Marie B. , 2005, Optimisation de méthodes analytiques pour l'analyse de métaux traces dans des échantillons environnementaux, Mémoire de fin d'étude Ingénieur ECPM Strasbourg - Cemagref Lyon, 55p.
- * Petat B ., 2004, Contribution à l'évaluation de la pression polluante liée aux pollutions diffuses au sein d'un petit bassin versant viticole (Beaujolais) et impacts correspondants sur la qualité des eaux de surface, DESS IHCE Tours- Cemagref Lyon, 79p + annexes
- * Ponticelli A., 2005, Évaluation de la toxicité de différents produits de dégradation d'un herbicide, le diuron, sur les microalgues d'eau douce, Master I Biodiversité, Écologie, Environnement (UJF Grenoble).
- * Rachedi K., 2006, Mécanisme de dégradation photocatalytique du Diuron par méthode DFT, Master 2, IRC-ENS , Lyon. 30p.
- * Thomazi-Coral J., 2004 Immobilisation de cellules algales pour le développement des biocapteurs, Mémoire d'élève ingénieur, ENSME- Univ Santa Catarina (Brésil).
- * Villeneuve A., 2005, Rôle de la biodiversité dans la résistance et la résilience de communautés microbiennes expérimentales soumises à des perturbations par un herbicide, Master 2 Biodiversité et Fonctionnement des Ecosystèmes , Université Blaise Pascal - INRA Thonon, 43p.

Articles scientifiques :

Parus et sous presse :

- * Durrieu C., Chouteau C., Barthet L., Chovelon J.M. & Tran-Minh C., A bi-enzymatic whole-cell algal biosensor for monitoring pollution of freshwater ecosystems, *Anal. Lett.*, 2004, 37, 1589-99
- * Wang X.J., C. Ling, X. Siqing, J.M. Chovelon, N. Jaffrezic-Renault, 2006, Biosorption of Cu(II) and Pb(II) from aqueous solutions by dried activated sludge, *Minerals Engineering* 19, 968-971
- * Wang X.J., S. Dzyadevych, J.M. Chovelon, N. Jaffrezic Renault, C. Ling, X. Siqing , 2006, Conductometric nitrate biosensor based on Methyl viologen/Nafion® /Nitrate reductase interdigitated electrodes, *Talanta* 69, 450-455
- * Wang X.J. , S.Q. Xia, L. Chen, J.F. Zhao, J.M. Chovelon, N.J. Renault, 2006, Nutrients removal from municipal wastewater by chemical precipitation in a moving bed biofilm reactor *Process Biochemistry* 41, 824-828.

Soumis :

- Dorigo U., C. Leboulanger, M. Lefranc, B. Montuelle & J.F. Humbert. "Spatial variability in the composition of benthic communities of a small French river characterized by an upstream-downstream pollution gradient.", *FEMS Microbial Ecology*.

Communications orales :

- Boisson JC, Volat B., Lazarroto J., Dorioz JM., Madigou E., Montuelle B., 2006, Typologie chimique de 3 cours d'eau et typologie fonctionnelle des communautés microbiennes épilithiques associées, 8^{ème} CILEF, Hammamet Tunisie, 17-21 Mars.
- Carrier M., Ponticelli A., Bouchez A., Vولات B., Besson M., Guillard C., Montuelle B., 2006, Toxic effects of degraded Diuron by advanced oxidation processes (AOPs) on microalgae and Rotifers, *Workshop "Analytical Chemistry and Ecotoxicology"*, 15 Février, Genève (Ch).
- Carrier M., 2005, Elimination des phytosanitaires par des Procédés d'Oxydation Avancés, Journées Doctoriales de la ZABR, 14/10/05, St Genis Laval
- Coquery M., Margoum C., Barasc M., Faure N., Marie B., Montuelle B., 2006, Analysis of pesticides and metals in freshwater biofilms: development of a methodology for studying environmental impact associated to pesticides treatment on vineyards., 3rd SWIFT-WFD *Workshop*, 15-17 Mai 2006, Barcelona, Espagne
- Durrieu C., Barthet L., Chouteau C., Tran-Minh C., & Chovelon J.M., 2003, A multienzymatic whole cell biosensor for monitoring pollution of freshwater ecosystem, *International workshop on Biosensors for Food Safety and Environmental monitoring*, Marakech, 9-11 Oct.
- Durrieu C., Chouteau C., Chovelon J.M, Josiane Coral & Tran-Minh C. , 2004, Study of bioactive structures in biosensors design, *TEDA 2004 Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures*, Beijing, May 23 - 27.
- Durrieu C., Chouteau C., Chovelon J.M. & Tran-Minh C., 2004, A multienzymatic algal biosensor for environmental bioanalysis, 6th *Workshop on Biosensors and BioAnalytical μ -Techniques in Environmental and Clinical Analysis*, Roma, October 8-12.
- Durrieu C., Tran-Minh C., Chovelon J.M., Barthet L., Chouteau C. & Védrine C., 2004, Mise au point de biocapteurs à cellules algales pour le monitoring des écosystèmes aquatiques, 3^e *Colloque Interdisciplinaire en Instrumentation (C2I)*, 29-30 Janvier, ENS Cachan,.
- Margoum C., Barasc M., Faure N., Coquery M., Montuelle B., 2006, Développement d'une méthode de dosage des pesticides dans les biofilms pour évaluer leur impact environnemental, xxxv^{ème} *Congrès du GFP*, Strasbourg, France.
- Montuelle B., 2004, Evaluation de gains biologique et écologique associés à une réduction d'intrants polluants en milieu aquatique, *XXXIV^{ème} Congrès du GFP* - Dijon 26-28 Mai 2004.
- Montuelle B., Blanc L., Margoum C., Coquery M., Volat B., Boisson J.C., Dorigo U., 2006, Qualité des eaux et fonctionnement du périphyton dans un cours d'eau drainant un bassin versant viticole, *Journées Techniques sur les Biofilms*, 14-15 Juin 2006, Orléans .
- Montuelle B., Boisson J.C., Volat B., Madigou E., 2006, Réponse des communautés microbiennes benthiques d'un petit cours d'eau soumis à un rejet domestique : Intérêt de l'utilisation d'un canal expérimental en dérivation et de substrats artificiels. 8^{ème} CILEF, Hammamet Tunisie, 17-21 Mars .
- Montuelle B., Dorigo U., Lefranc M., Leboulanger C., Humbert JF, 2006, composition and structure of a natural biofilm microbial communities along a chemical gradient, *SETAC*, 7-11 Mai , den Haag , Pays Bas.
- Villeneuve Aurélie, Montuelle B., Humbert Jean-François, Bouchez Agnès, 2006, Impact des facteurs physiques sur la biodiversité bactérienne et phytobenthique et le fonctionnement des communautés en «rivières» expérimentales, 8^{ème} CILEF, 17-21 Mars, Hammamet Tunisie.
- Wang X.J., S.V. Dzyadevych, J.M. Chovelon, N. Jaffrezic-Renault, L. Chen, S. Xia, 2005, Conductimetric nitrate biosensor, *EnvEdu* , 8-10 Septembre , Brasov (Roumanie).

Posters

- Boisson J.C., Montuelle B., Hassani K., 2006, Effect of PO₄ and/or cellulose on the growth and functions of periphytic communities exposed to diuron: microcosms assays, *SETAC*, 7-11 Mai, den Haag, Pays Bas.
- Carrier M., Besson M., Guillard C., Gonze E., 2005, Elimination de phytosanitaires par des procédés d'oxydation avancés, *Journée SFC Rhône-Alpes*, 16 juin, Le Bourget du Lac.
- Carrier M., Besson M., Guillard C. and Gonze E., 2005, Treatment of agricultural wastewater containing herbicides by Advanced Oxidation Processes, *Colloque "Recent Advances in Catalysis"*, Rennes (France), 5-9 September 2005.
- Carrier M., Besson M., Guillard C., Gonze E., Petrier C., Ponticelli A., Bouchez A., Vollat B., Montuelle B., 2006, Treatment of agricultural wastewater containing herbicides by Advanced Oxidation Processes, *Environmental Application of AOP*, 7-9 Septembre, Chania (Crête),
- Carrier M., Besson M., Guillard C., Gonze E., Petrier C., Ponticelli A., Bouchez A., Vollat B., Montuelle B., 2006, Treatment of herbicides by AOP, 4th European Meeting on Solar chemistry and Photocatalysis : Environmental Applications, 8-10 Novembre, Gran Canaria.
- Lefranc M., Montuelle B., Leboulanger C., Humbert J.F. 2005, Comment discriminer *in situ* l'effet de facteurs naturels et de facteurs anthropiques (toxiques) sur la variabilité du périphyton: une méthode de terrain. *2^{ème} Colloque d'Ecologie Microbienne*, 12-16 Mai, Obernai.
- Michel C., Battaglia-Brunet F., Bruschi M., Tran-Minh C., Ignatiadis I., 2004, Amperometric enzyme-based sensor for chromate bioavailability determination, *6th Workshop on Biosensors and BioAnalytical μ -Techniques in Environmental and Clinical Analysis*, October 8-12, Roma.
- Montuelle B., Leboulanger C., Lefranc M., Humbert J-F., Bouchez A., Boisson J-C., 2005, Evaluation de la toxicité de phytosanitaires sur la composition et la structure de communautés périphytiques, *Colloque ECCO*, Décembre 2005, Toulouse
- Montuelle B., Gouy V., Roger MC, Margoum C., Besson M., Guillard C., Chovelon JM., Devaux A., Durrieux C., Tran Minh C., Gillet C., Leboulanger C., Faure R., Herbreteau B., Marote P., Clemens A., 2004, Evaluation de gains biologique et écologique associés à une réduction d'intrants polluants en milieu aquatique : un programme de recherche pluridisciplinaire, *8^{ème} Colloque du Chapitre St Laurent - Québec* 3 & 4 Juin 2004.
- Montuelle B., Roger MC, Gouy V. Utilisation des terres et qualité écologique des cours d'eau: Evaluation d'une relation pression-impact en zone viticole, *Colloque Eau et Territoire - Lyon* - 9 & 10/01/06
- Roger MC, Bacher A., Gouy V., Montuelle B., 2005, Usages des sols et qualité écologique des milieux aquatiques : vignobles et communautés d'invertébrés aquatiques, *6^{ème} CILO - Vaulx en Velin*- 04-07 Juillet 2005.
- Roger MC, Bacher A., Gouy V., Montuelle B., 2005, Land uses and river ecological quality: assessment of pesticides effects on benthic invertebrates communities, *SETAC*, Lille, 23-27 May 2004.
- Roger MC, Bacher A., Gouy V., Montuelle B., 2006, Assessment of pesticide effects on benthic invertebrates communities: relationship between land uses and water ecological quality, *Workshop "Analytical Chemistry and Ecotoxicology"*, 15 Fevrier, Genève (Ch)

Actes de colloques:

- Montuelle B., Leboulanger C, Lefranc M, Humbert JF, Bouchez A., Boisson JC, 2005, Evaluation de la toxicité de phytosanitaires sur la composition et la diversité de biofilms périphytiques, *Actes du 1^{er} Colloque ECCO*, Toulouse, 5-7 Decembre, pp 55-60.
- Wang X.J, Dzyadevych SV., Chovelon JM, Jaffrezic- Renault N., Chen L., SXia SQ, ZhaO JF, 2005, Inhibitive determination of organophosphorus pesticides by conductrometric

butyrylcholinesterase biosensor, *1st International Conference and Resource reuse for a better tomorrow and sustainable economy*, Shanghai, 18-21 Octobre 2005, p. 700-707

- Wang X.J, Dzyadevych SV., Chovelon JM, Jaffrezic- Renault N., Chen L., SXia SQ, ZhaO JF, 2005, Conductometric nitrate biosensor based on Methyl viologen/Nafion/Nitrate reductase inderdigitated electrodes, *1st International Conference and Resource reuse for a better tomorrow and sustainable economy*. Shanghai, 18-21 Octobre 2005, p. 300-399.

VI/ Actions d'exploitation et de dissémination

Enseignement :

Les données acquises durant ce programme ont été incorporées dans les enseignements suivants :

- ENESAD - Dijon (depuis 2005) : « Dynamique des populations microbiennes aquatiques. Interactions avec les pollutions en zones rurales » (3h).

Autres :

- Réalisation d'un poster pédagogique destiné au Lycée viticole de Bel Air, à destination du grand public et à la sensibilisation des élèves aux problèmes de contamination environnementale. Ce poster accompagnait les expérimentations de traitement « à la ferme » (cf VI).

- Présentation auprès de la Cellule Régionale d'Observation et de Prévention des Pollutions par les Phytosanitaires (CROPPP) de la problématique générale des travaux du programme et du site atelier Ardières - Morcille.

- Exploitation des résultats: le programme a contribué, par ses résultats, à supporter la création d'un Site Atelier pérenne au sein de la Zone Atelier du Bassin du Rhône (cf VIII).

VI/ Bilan de l'ensemble du projet et faits marquants

Un bilan synthétique de l'ensemble du projet met en évidence quelques points notables:

- avancée globalement équilibrée des différentes actions : chacune des 5 actions a progressé, certaines sont encore en cours de développement (bilan définitif prévu pour Décembre 2006). C'est le cas des expérimentations de translocation *in situ* (Opération2) ou de réduction de toxicité lors du traitement de résidus de phytosanitaires à la ferme (Opérations 4 & 5). La thèse de M. Carrier (Opération 4) débutée fin 2004 s'achèvera fin 2007.

- approche couplée terrain - laboratoire: le choix de ce petit bassin versant viticole comme objet d'étude a permis la mise en place d'expérimentations en laboratoire réalistes : travail sur des formulations chimiques de produits réels et non uniquement sur la matière active, prise en considération de concentrations environnementales de phytosanitaires pour les essais, paramétrage de facteurs environnementaux réalistes en microcosmes (vitesse de courant, luminosité, ..).

- développement de méthodes d'analyses originales : mise au point et validation de dosage de phytosanitaires dans les biofilms aquatiques.

- développement des connaissances :

- fondamentales : sur la chimie des phytosanitaires (voies de dégradation sous différentes conditions de traitement), écologie aquatique de milieux fortement perturbés,
- appliquées : faisabilité de traitement à la ferme (grâce à un partenariat public - privé)
- mise au point d'outil de gestion et de surveillance (microcapteurs enzymatiques) ou amélioration d'outils existants (survie embryon-larvaire d'œufs de truite).

NB : Ces avancées scientifiques sont développées et présentées dans le document 2 (Annexe scientifique).

Quelques faits marquants :

- * l'attribution d'une bourse de thèse régionale, a permis 1/d'avancer fortement sur l'action 4, 2/ de rassembler des laboratoires de chimie et d'écotoxicologie autour d'un même volet du programme : les essais de dégradations des résidus « à la ferme ».

- * Attribution d'un accueil post-doctoral (8 mois en 2005) au LACE, sur le thème des microbiocapteurs, qui a permis également un bon développement méthodologique et une bonne valorisation .

- * la participation active en année 3 d'industriels régionaux et du Lycée Agricole de Bel-Air a permis la réalisation d'une expérience de traitement à la ferme des résidus de phytosanitaires issus du traitement des vignes du Lycée.

VII/ Contraintes et difficultés

Quelques difficultés sont apparues lors du déroulement de l'étude, qui pour la plupart ont été résolues :

- Aspect terrain : crues et sécheresse ont fait échouer et contraint à reporter les essais de translocation de biofilm (Opération 2 : Résilience des systèmes). Ces contraintes ont également perturbé les tests de survie embryon-larvaire.

- Niveau d'approche des équipes à harmoniser (du bécot au cours d'eau) : la compréhension des mécanismes chimiques et des schémas de dégradation des phytosanitaires s'effectuent nécessairement sur des substances actives pures (et non à des formulations commerciales utilisées *in situ*) et à des concentrations supérieures aux concentrations environnementales. Cette difficulté, inhérente aux disciplines mises en œuvre, a été partiellement compensée par des travaux 1/ de laboratoire à des concentrations de type « résidus de fonds de cuve » , 2/ des essais de dégradation sur site avec effluents réels et 3/ des essais couplés chimie - écotoxicologie, à des doses environnementales.

- L'expérimentation sur le traitement effluent *in situ* a été complexe à mettre en œuvre: convention lente à mettre en place et à signer (5 partenaires), matériel industriel à rassembler et installer sur place, nécessité d'être en période de traitement. Le début de ces essais n' a donc pu être effectif qu'en juin 2006 et s'est terminé en Octobre. Les résultats sont en cours de traitement.

- l'Opération 1 reposait en partie sur l'étude des microorganismes des biofilms. Une thèse sur financement Cemagref-INRA avait débuté en janvier 2004 sur ce sujet, mais a été arrêtée en février 2005 (pour raison médicale) et ceci a entraîné un retard notable dans l'avancée des travaux en ce domaine. L'accueil d'un post doctorat en Octobre 2005 sur des fonds Cemagref a permis de reprendre les travaux sur ce thème, mais la valorisation est encore en cours.

VIII/ Devenir

Plusieurs autres programmes se sont positionnés au côté de ce programme régional, avec certaines des équipes impliquées dans ce programme régional, mais aussi d'autres équipes extérieures à la Région. La plupart d'entre eux permettent une poursuite des travaux engagés, en élargissant certaines problématiques.

- Rebecca : ce programme européen, qui s'achève en Mai 2007, a permis un accompagnement analytique (caractérisation chimique in situ) et une mise en perspective des données biologiques (invertébrés, IBGN) dans un contexte européen d'évaluation de la qualité des milieux aquatiques (notion d'Ecological Quality Ratio, EQR).

- Ecoger : Programme INRA - Cemagref « Relations entre structures paysagères, transferts hydriques et flux géochimiques, état écologique des milieux aquatiques ». Ce programme (2005-2008) permet d'élargir le partenariat à des équipes non régionales (Uni Dijon, INRA Dijon) (physique, écologie, biologie, microbiologie, chimie) et la prise en compte du domaine terrestre du bassin versant de la Morcille.

- EC2CO : Programme « Padyma » : « Déterminisme de l'impact des pesticides en cours d'eau : de l'organisation du paysage à l'influence de la dynamique de l'exposition sur les effets biologiques. Appui à l'évaluation et à la gestion du risque » Ce programme (2006-2008) est plutôt orienté vers la production de données écotoxicologiques pour alimenter des modèles de transfert de contaminants et de prévision d'effets (physique - chimie- écotoxicologie)

- ANR Biodiversité : Ce nouveau programme de recherche (InBioProcess, 2007-2010) : L'objectif du projet est d'estimer le rôle de la biodiversité sur les processus écologiques aux interfaces eaux souterraines -eaux de surface, de quantifier le stockage des organismes dans les sédiments et leur rôle sur la stabilité et la résilience des systèmes de surface, en particulier vis à vis de la dégradation de la matière organique et la détoxification des polluants. Le site de la Morcille sera un des sites d'application de ce programme.

- Poursuite et fin de la thèse de M. Carrier : techniques et voies de dégradation chimique de phytosanitaires (bourse régionale) - fin prévue environ Octobre 2007.

- Création du site Atelier SAAM : Ce programme Région a permis de mettre sur pied et de développer le projet de création d'un site Atelier sur le bassin versant de l'Ardières-Morcille, en s'articulant d'une part sur la ZABR (Zone Atelier du Bassin du Rhône) et sur la mise en place, à l'échelon régional, du Pôle Envirhôn'Alp. Ce projet a depuis été labellisé par ces deux structures. Ce site est dédié à l'étude des conséquences de l'anthropisation sur le fonctionnement des écosystèmes aquatiques, en

particulier en étudiant dans sa globalité et sa complexité les « chaînes d'anthropisation », depuis la genèse des flux liquides et des polluants (domestiques, industriels, agricoles) sur les territoires du BV jusqu'à l'effet écologique de ces flux polluants.

B/ Partenariat socio-économique

B-1 : Industriels

Etabli avec deux sociétés industrielles de la Région Rhône-Alpes, spécialisées dans le traitement des effluents, dont les effluents viti-vinicoles, cette coopération a permis la mise en place d'un essai de dégradation d'effluents réels produits sur le site de l'exploitation viticole du Lycée de Bel Air.

Les deux industriels (Société Aderbio et Société Alsthrom - Résolution) ont mis à disposition deux systèmes de traitement des effluents. Cette participation était essentielle à la réalisation d'essai *in situ*, avec effluents réels, d'une part pour tester les performances de systèmes (abattement chimique et réduction de la toxicité des effluents traités) dont la finalité est d'être installé dans des exploitations viticoles (ou des groupements d'exploitation). Si le procédé biologique Aderbio a déjà fait, par le passé, l'objet d'études de performances et de faisabilité, le système de la société Résolution (Alsthrom) basé sur un traitement par rayons ultra violets était testé pour la première fois.

Cette étude, basé sur le site du Lycée Viticole de Bel Air (Beaujolais), a donc permis 1/ de caractériser la dégradabilité de substances phytosanitaires résiduelles et 2/ de compléter le travail de recherche de M. Carrier dans le cadre de sa thèse⁴ sur les procédés et mécanismes de dégradation du Diuron, en élargissant sa problématique et en abordant une question complémentaires à ses travaux de laboratoire.

Cet essai a été encadré par une convention d'étude spécifique et se terminera dans le courant de l'automne 2006.

B-2 Acteurs locaux

Le lycée viticole de Bel Air a été un partenaire important dans la mise en place de cet essai : lieu d'accueil des systèmes de traitement et des essais de dégradation, fourniture des résidus de traitement, prise en charge du coût de fonctionnement électrique des installations. Si le Lycée en a tiré un intérêt pédagogique, sa contribution a été essentielle pour la réalisation des essais de dégradation d'effluents réels.

Enfin, un viticulteur (M. Ducroux à St Joseph), qui met à disposition du Cemagref une bande enherbée, a permis la réalisation d'une partie des travaux dans l'opération 3.

⁴ Sur une bourse de thèse de la Région Rhône-Alpe.

RESUME – Thématique prioritaire 2003 – 2005 : DEVELOPPEMENT DURABLE

Nom, Prénom du Responsable du projet: MONTUELLE Bernard

Adresse électronique : montuelle@lyon.cemagref.fr

Titre du projet : Evaluation de gains biologique et écologique associés à une réduction d'intrants polluants en milieu aquatique

Ce projet avait pour objectif de contribuer à l'évaluation de la qualité écologique d'un cours d'eau récepteur d'un bassin versant viticole, en identifiant d'une part les principaux déterminants de l'occupation des sols ainsi que des descripteurs de l'état du milieu aquatique et d'autre part en approfondissant l'étude d'une voie de réduction des intrants polluants dans le système aquatique.

L'ensemble des travaux a été organisé selon l'approche dite DPSIR, qui permet de hiérarchiser les différentes composantes du fonctionnement d'un écosystème à l'échelle du bassin versant, en y incluant la composante humaine (anthroposystème).

Ce programme a été organisé en 5 opérations complémentaires :

Opération 1 : Caractérisation *in situ* (état chimique et biologique des milieux)

Opération 2 : Capacité de récupération des communautés

Opération 3 : Caractérisation de l'occupation des sols et modes de gestion agricole

Opération 4 : Méthodes physico-chimiques d'élimination des phytosanitaires

Opération 5 : Dégradation biologique des phytosanitaires

Huit laboratoires de divers instituts publics associés, pour une partie des opérations, à des industriels et à un partenaire local (Lycée viticole de Bel Air) ont contribué à ce programme, qui a bénéficié d'une allocation doctorale et d'une allocation post doctorale.

Les résultats obtenus ont permis :

- de préciser certains déterminants d'occupation des sols qui contraignent les flux de polluants sur le bassin versant,
- de montrer la perte de qualité biologique amont –aval sur le cours d'eau récepteur, en lien avec la gradient croissant de pression chimique,
- de préciser, sur un plan fondamental, des méthodes et techniques de dégradation de produits phytosanitaires, en identifiant les cinétiques, les sous- produits de dégradation et leur toxicité et mettre en place des essais grandeur nature sur effluents réels.

Par ailleurs, ce programme a également fortement contribué à la mise en place d'un Site Atelier, rattaché à la Zone Atelier du Bassin du Rhône (ZABR), qui est actuellement le lieu de réalisation de plusieurs programmes de recherche nationaux pluridisciplinaires.

Annexe scientifique



**Evaluation de gains biologique et écologique associés à une
réduction d'intrants polluants en milieu aquatique.**

Contributeurs (par ordre alphabétique):

Besson M. (IRC)
Boisson JC. (Cemagref-ENTPE)
Bouchez A. (INRA)
Carrier M. (IRC-LACE-LOCIE)
Clemens A. (ZABR)
Chovelon JM. (LACE)
Coquery M. (Cemagref)
Devaux A. (ENTPE)
Dorigo U. (Cemagref)
Durrieu Cl. (ENTPE)
Faure R. (UMR Chimie Analytique)
Gillet C. (INRA)
Gouy V. (Cemagref)
Gonze E. (LOCIE)
Guillard C. (LACE)
Herbretreau B. (UMR Chimie Analytique)
Margoum C. (Cemagref)
Marotte P. (UMR Chimie Analytique)
Motte B. (Cemagref)
Roger MC. (Cemagref)
Tran Minh C. (ENSMSE)
Villeneuve A. (INRA)
Volat B. (Cemagref)
Vollat B. (Cemagref)

Coordination et synthèse :

Montuelle B. (Cemagref)

Sommaire

	pages
I/ Introduction	22
II/ Evaluation des pressions	24
II-1 Occupation des sols	24
II-2 Débits et régime hydrologique	26
II-3 Evaluation de la qualité chimique du milieu	28
III/ Etat écologique du cours d'eau récepteur et évaluation de l'impact	38
III-1 Communautés naturelles	38
III-2 Espèces sentinelles : truite fario	44
III-3 Conclusions sur les impacts	47
IV/ Techniques et méthodes de dégradation des micropolluants	49
IV-1 Dégradation du Diuron par procédés d'oxydation avancée	49
IV-2 Dégradation par photolyse	55
IV-3 Traitement « à la ferme »	58
V/ Eléments de réponse pour la réduction d'intrants polluants et une amélioration de qualité du milieu aquatique.	59
V-1 Données biologiques	59
V-2 Approche de la remédiation <i>in situ</i> : éléments de réflexion et de perspective	61
VI/ Conclusions	62
VII/ Références	65

Préambule

De très nombreux résultats ont été acquis au cours de cette étude, dans les différentes opérations. L'interprétation d'une partie des données est en cours de traitement ; certains travaux ne seront terminés que fin 2006 (écotoxicologie des effluents issus du traitement « à la ferme ») ou fin 2007 (thèse de M. Carrier, débutée fin 2004).

Compte tenu du cahier des charges imposé, cette synthèse ne présente qu'une sélection des résultats les plus significatifs.

Introduction

Depuis 2000, les études et recherche sur les milieux aquatiques sont fortement orientés par la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (DCEE). Celle ci a induit un questionnement scientifique très vaste sur le fonctionnement des écosystèmes aquatiques, de la ressource en eau... , qui va bien au delà de l'application d'indicateurs de qualité physiques, chimiques ou biologiques. L'objectif d'amélioration de la qualité des milieux aquatiques a renforcé la nécessité de comprendre le fonctionnement intégré des écosystèmes, dans leurs composantes aquatiques et terrestres, environnementales, économiques, humaines. La notion d'anthroposystème (Lévêque *et al*, 2003) prend tout son sens quand on sait que les problèmes de l'eau sont multiples, parfois sources de conflits d'usage et qu'une amélioration du patrimoine écologique et de ressource que représentent les hydrosystèmes doit se faire dans le cadre d'une approche globale.

La prise en compte de ces problèmes multifactoriels, dans le cadre d'études environnementales, nécessite une structuration des approches. Le modèle DPSIR (fig. 1), dont la base est antérieure à la DCEE, est un modèle qui permet de classer des informations, d'organiser des actions et de préciser les liens unissant les composantes de l'environnement, en terme de synergie ou d'antagonisme (ODE, 2000 ; Virtual Centre, 2006).

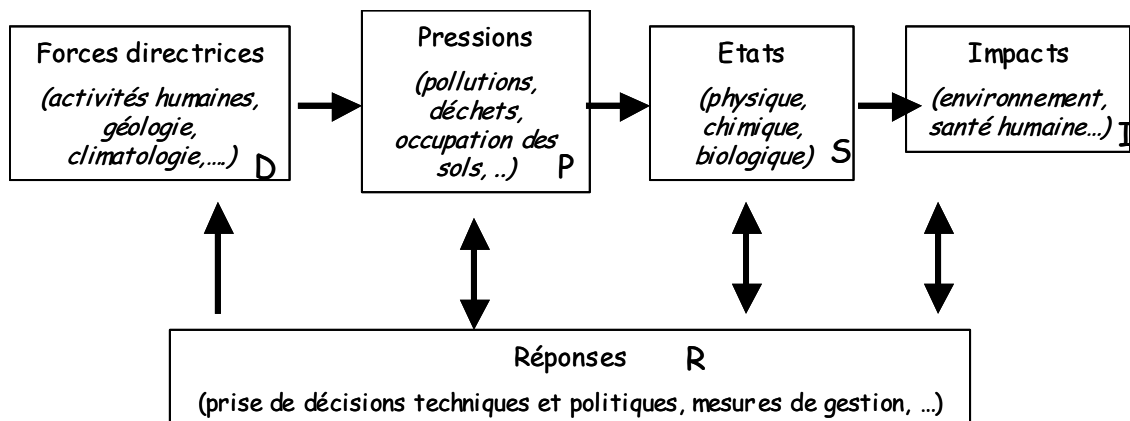


Figure 1 : Schéma d'organisation du système DPSIR.

Ce modèle peut se décliner à l'échelle d'un bassin versant, d'une zone délimitée, d'une ville (ODE , 2000) ou d'un cours d'eau (Marsilli-Libelli *et al*, 2003) et est une aide précieuse à la prise de décisions.

Nous avons appliqué ce schéma pour répondre à l'objet de recherche de ce programme « Evaluation de gains biologique et écologique associés à une réduction d'intrants polluants en milieu aquatique », appliqué à un site particulier : le bassin versant viticole de la Morcille. Chacune des composantes du modèle DPSIR a été décrite à l'aide d'indicateurs spécifiques qui déclinent chacune des étapes du modèle DPSIR (Figure 2).

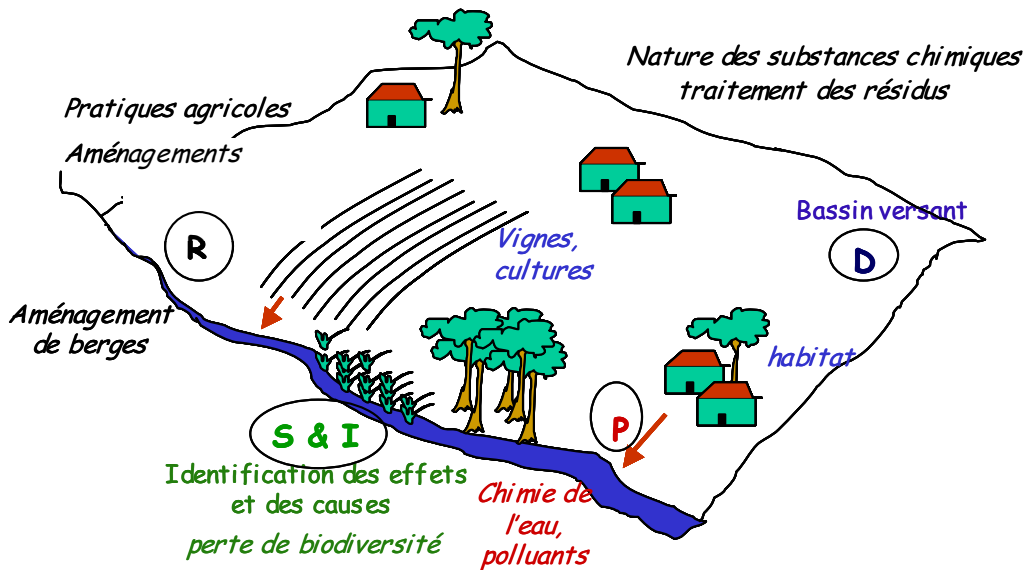


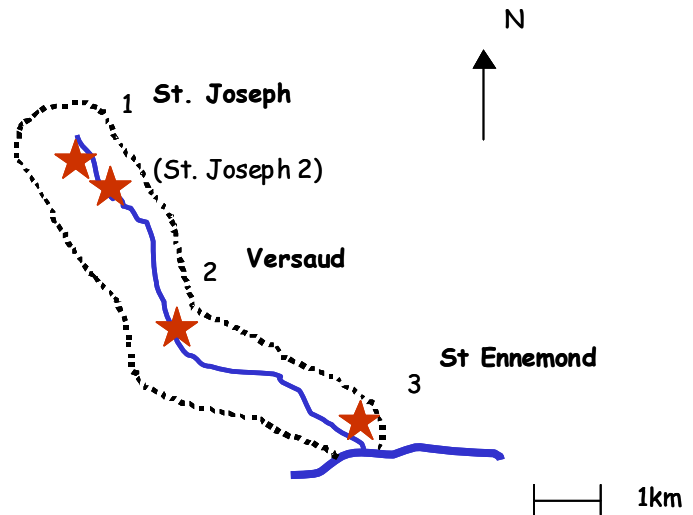
Figure 2 : Déclinaison du modèle DPSIR sur le site du bassin versant de la Morcille.

D : pentes, structure du sol pluviométrie, ... ; P : occupation des sols, nature des polluants, mode d'accès au cours d'eau (diffus, ponctuel), biodisponibilité et transformation dans le cours d'eau) ; S & T : état des communautés d'invertébrés et de l'épilithon, espèces sentinelles ; R : mesures de réduction de la dégradation du milieu (bandes enherbées, traitement des produits à la ferme, choix de produits...).

Les travaux réalisés dans ce programme ne sont bien sûr pas exhaustifs dans ce cadre: ils apportent des éléments de connaissance à chacune des composantes DPSIR, mais ne peuvent pas répondre à la question ultime : comment restaurer la qualité écologique de la Morcille, dans un contexte socio-économique donné, qui est une question beaucoup plus vaste. Pour autant, le cadrage DPSIR a permis de coordonner les démarches de différentes équipes, de promouvoir un travail pluridisciplinaire et d'obtenir des résultats cognitifs et appliqués, de laboratoire et de terrain, qui permettent de poser les bases d'une approche intégrée de ce bassin versant et d'identifier des questions complémentaires qui sont (ou seront) traitées dans des programmes ultérieurs.

Sur le terrain, s'appuyant sur un site bien identifié, nous avons sélectionné plusieurs points d'échantillonnage permanents pour les suivis chimiques et biologiques (figure 3) répartis d'amont en aval de la Morcille de manière à pouvoir décrire l'évolution qualitative du cours d'eau. Celui-ci, drainant un petit bassin versant (8km²), est typique de ce versant du Beaujolais viticole.

Figure 3 : Schéma du BV Morcille et des points d'échantillonnage. Les points permanents sont en gras. Dans le texte ils sont référencés, dans l'ordre : amont, intermédiaire et aval. Le point St Joseph 2 a été utilisé uniquement pour le SIG⁵ et l'évaluation IBGN (cf III-1 -2).



II/ Evaluation des pressions :

II-1/ Occupation des sols.

Sur ce bassin versant, les pressions se caractérisent d'abord par l'occupation de ses sols qui est un déterminant important des flux polluants. Dans le cas du bassin versant de la Morcille, il s'agit d'une zone viticole avec usage de produits phytosanitaires, un habitat dispersé sans réseau de tout-à-l'égout, complété par un important maillage de voies d'écoulement de l'eau et d'interfaces (fossés, bandes enherbées, haies, ...). Un SIG a été effectué par Corine Land Cover (CLC) et selon les nomenclatures d'occupation des sols (IFEN 2000). Cette première approche (assez grossière pour un petit bassin versant, car l'unité de base de CLC est de 25 ha) permet néanmoins de faire ressortir les caractéristiques générales du bassin versant à chacun des 3 principaux points d'échantillonnage .

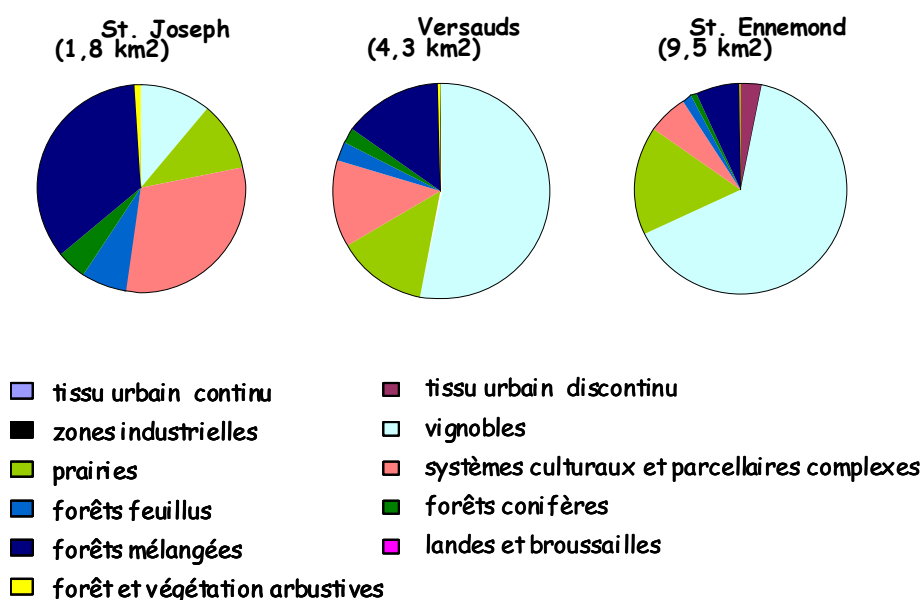
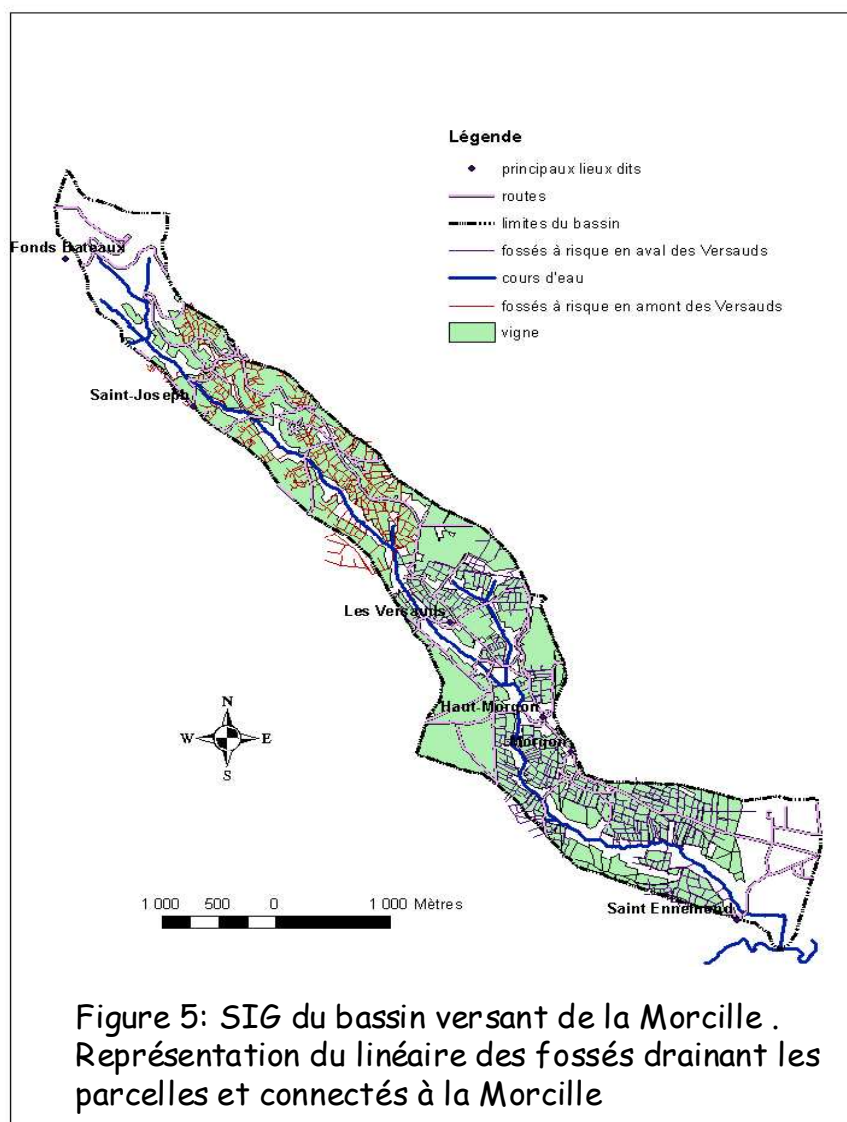


Figure 4: Occupation des sols sur le bassin versant de la Morcille.

⁵ SIG : Système d'Informations Géographiques ; IBGN : Indice Biologique Global Normalisé

De manière synthétique, l'occupation des sols présente un gradient croissant très marqué de la vigne, représentant plus de 60% du bassin versant à l'exutoire de St Ennemon (N. Corcoll, 2006). L'occupation des sols change bien sûr selon les saisons (période de culture et de traitements) et ceci modifie parfois fortement les flux polluants générés lors des événements pluvieux: c'est le cas du vignoble avec une période de traitement d'Avril à Août (Gouy & Nivon, 2005). On notera que même le site amont de St Joseph, considéré comme la référence par rapport aux deux autres stations aval est déjà sous une légère influence de vignoble (cf tableau 1).

Une approche plus fine du bassin de la Morcille, a été réalisée avec des moyens d'investigation complémentaires : l'analyse de cartes, le recours à la base de données topographiques au 1/25000° de l'IGN, l'acquisition et la numérisation/intégration au SIG des plans du cadastre et des réseaux de fossés et la prospection terrain (Petat, 2004 ; Escot, 2005). Ceci a permis d'établir un SIG beaucoup plus précis et d'intégrer d'autres indicateurs de l'occupation des sols. Par exemple, les linéaires de fossés, qui en drainant les parcelles de vigne, contribuent à l'arrivée accélérée d'eau de ruissellement à la Morcille et rendent la notion de distance de la parcelle au cours d'eau délicate à utiliser (figure 5), certaine parcelles situées loin du cours d'eau pouvant y être directement connectées par l'intermédiaire d'un fossé.



Le linéaire de fossés ramené à la surface en vigne permet d'estimer une densité moyenne de fossés par hectare de vigne et donc, *a priori*, une capacité de drainage des parcelles plus ou moins grande. En réalité toute la surface de vigne n'est pas drainée de façon équivalente au sein de chaque sous-bassin. C'est pourquoi on a estimé plus pertinent d'approcher une surface de vigne potentiellement drainée par les fossés (SVd) en ciblant, à partir du SIG, uniquement les parcelles de vigne bordées par, ou contenant, au moins un fossé (Tableau 1).

De même, on a également estimé par le SIG la surface en vigne contenue, par exemple, dans une bande de 100 m de part et d'autre du cours d'eau afin d'approcher une potentialité de « contamination globale de proximité », estimant que plus les parcelles sont éloignées du cours d'eau plus les transferts par le sol ou les nappes temporaires peuvent être potentiellement atténués par la matrice organo-minérale.

Un dernier indicateur, enfin, peut être la surface occupée sur chaque sous-bassin par le bâti qui peut donner une indication des pollutions domestiques (cf II-3).

Stations		1	2	3	4
Superficie totale en amont (ha)		114,2	126,7	338,6	799,5
Surface totale de vigne	(ha)	7,7	16,9	174,9	631,8
	(%)	6,7	13,3	51,6	79
Linéaire de fossés connectés à la rivière sans les rases (km)		0,2	1,8	33,4	97,1
Densité de ce linéaire de vigne (m/ha)		26	106	191	154
Parcelles de vigne bordées à moins de 1 m par un fossé connecté à la rivière (ha)		5	22	138	505
Surface en vigne dans les 100 m de part et d'autre du cours d'eau (ha)		6	7,5	63,5	204
Surface occupée par des bâtiments (ha)		0,05	0,7	2,2	6,9

Tableau 1: Evolution d'amont en aval de la surface occupée par la vigne et densité moyenne de fossés correspondante. 1, 2, 3 & 4 : Stations d'amont en aval (cf figure 2).

Il semble que SVd est un indicateur à rapprocher plus spécifiquement des potentialités de transferts rapides en crue alors que le ratio « Surface en vigne /Surface totale » est probablement un meilleur indicateur d'une pression polluante globale.

II-2/ Débits et régimes hydrologiques

L'hydrologie de la Morcille est caractérisée par un régime pluvial marqué. L'écoulement hivernal est permanent et abondant alors que l'écoulement estival, s'il reste permanent, est nettement plus faible. Cependant, les crues sont assez brutales en été et l'écoulement peut osciller très rapidement (figure 6). Sur le bassin versant,

l'assainissement pluvial et individuel de l'habitat dispersé du bassin versant est fréquemment raccordé aux fossés et donc contribue pour une part non négligeable au maintien d'un débit dans ces derniers, particulièrement à l'étiage.

Compte tenu de la nature majoritairement sableuse du substrat (à forte capacité d'infiltration), des pentes, de la présence du socle cristallin à faible profondeur, il existe probablement un écoulement sub-surfacique. Le ruissellement est essentiellement hortonien par dépassement de la capacité d'infiltration au cours d'événements pluvieux de forte intensité (orages).

Ceci entraîne diverses modalités de transfert des pesticides de la parcelle au cours d'eau :

- le ruissellement de surface, rapide et intense au cours des orages (printemps, été), sous forme dissoute ou fixée sur les parties érodées, rapidement canalisé par les fossés, qui court-circuitent les zones tampons (prairies, forêts) bordant la Morcille.

- le transit dans le sol et la re-direction vers les eaux de surface par des écoulements latéraux dont le transfert est plus lent, qui offrent la possibilité d'une rétention des pesticides, voire d'une dégradation. Mais ce type de transit peut cependant être à l'origine d'apports chimiques à la rivière, de molécules mères ou de leurs métabolites.

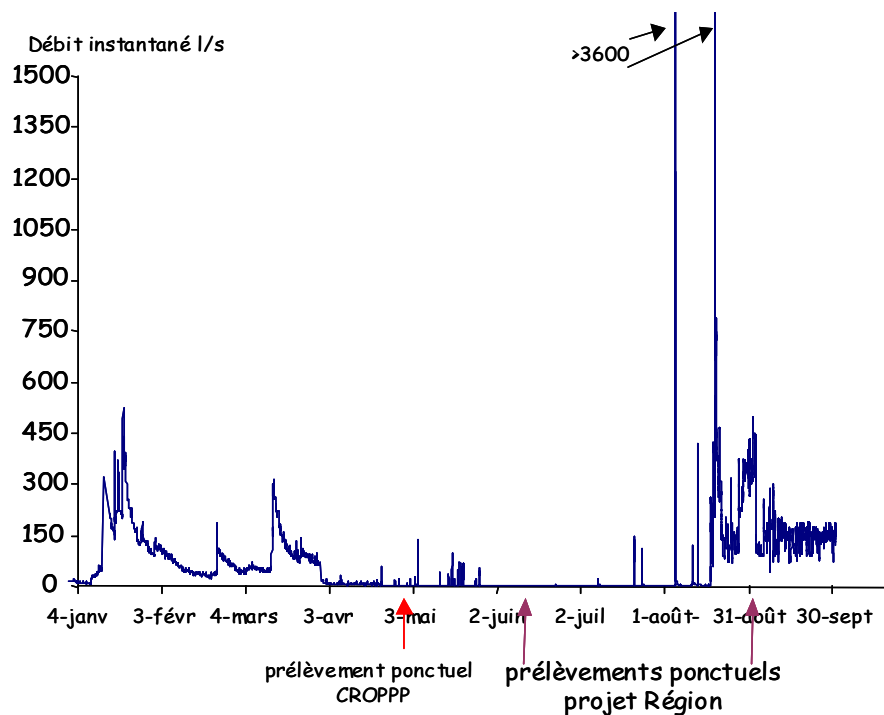


Figure 6: Hydrogramme de la Morcille pour l'année 2004. On notera l'importance et la courte durée des phénomènes hydrauliques.

Ces événements hydrologiques ont pour conséquences d'entraîner de grandes quantités de matières en suspension (MES), issues des sols très érosifs (texture, pente) dans les parcelles de vigne.

II-3/ Evaluation de la qualité chimique du milieu

L'évaluation des pressions polluantes qui s'exercent sur le milieu aquatique peut être réalisée par deux voies : des mesures de concentrations d'éléments chimiques directement dans les différents compartiments (eau, sédiment, biofilm) ce qui permet ultérieurement de caractériser des flux et des expositions d'organismes (explicatifs de leur état et de l'éventuel impact subi). Cette approche pose la question de la stratégie d'échantillonnage, de la fréquence et du coût d'analyse.

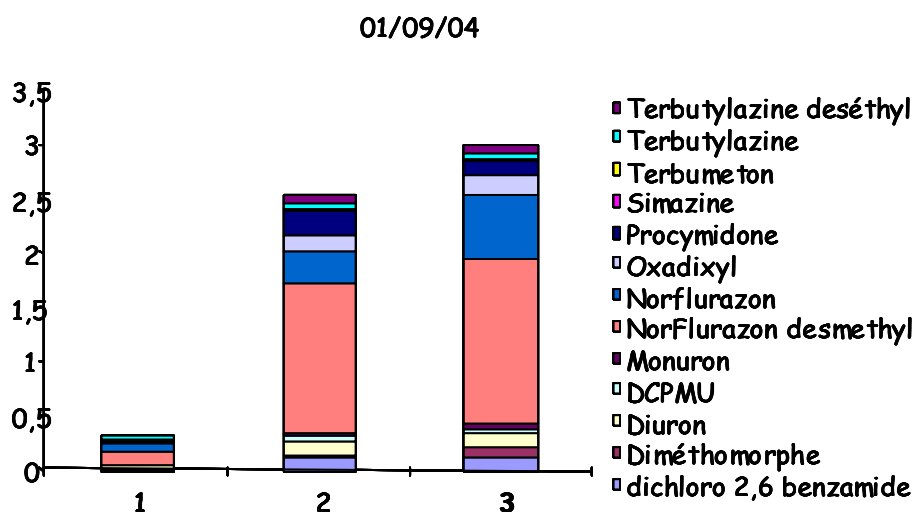
Une autre approche, encore peu répandue, est une mesure indirecte par le biais de microcapteurs, chimiques ou biologiques. Ces techniques sont actuellement en plein développement et les progrès sont rapides, tant au niveau de la spécificité de ces capteurs qu'au niveau de leur sensibilité et de leur fiabilité. Leurs avantages (au moins potentiels) sont leur faible coût (comparativement à l'analyse), leur faible encombrement, la possibilité de suivi en continu,....

Ces deux méthodes ont été abordées au cours de ce programme pour l'évaluation des pressions polluantes sur la Morcille et pour développer de nouvelles méthodes analytiques.

II-3-1/ Qualité chimique de l'eau

Globalement, les teneurs en composés à effet trophique (C, N, P) et à effet toxique (phytosanitaires particulièrement) augmentent selon un gradient amont-aval très marqué (Figures 7 & 8).

L'ensemble de ces indicateurs chimiques traduisent un gradient de pollution croissant d'amont en aval. La comparaison avec les classes de qualité du SEQ Eau (MEDD & Agence de l'Eau, 2003) montre que les principaux facteurs déclassants sont d'une part essentiellement les toxiques et, à un moindre niveau les substances trophiques, en particulier les orthophosphates. On notera que la plupart des phytosanitaires retrouvés dans les eaux de la Morcille n'ont pas de valeurs seuils fixées dans le cadre du SEQ.



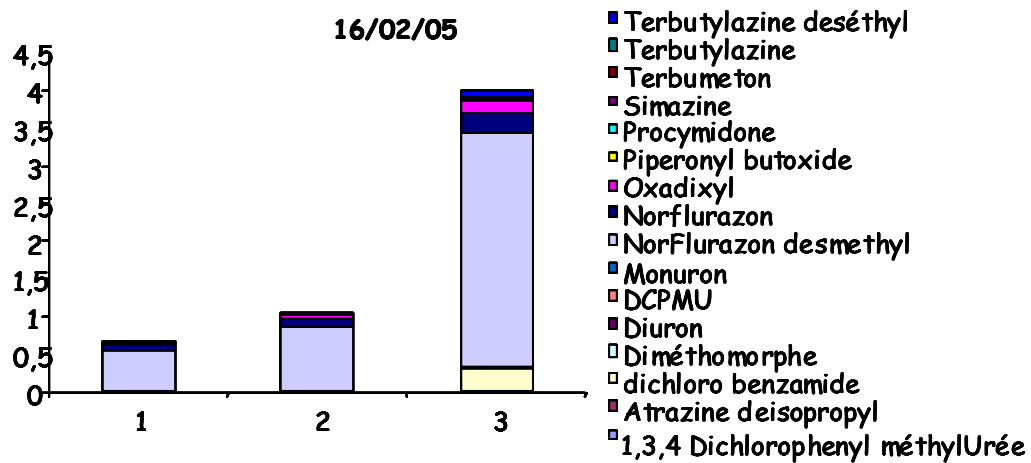


Figure 7 : Caractéristiques des variations de concentrations en produits phytosanitaires dans l'eau de la Morcille - Prélèvements ponctuels à 2 dates. 1 : St Joseph (amont) ; 2 : Versauds (intermédiaire), 3 : St Ennemond (Aval) - NB ; chaque graphique possède son propre code couleur (nombre et nature de produits différents).

Les indications de toxicité des substances fournies par la base de données Agritox ne sont pas non plus exhaustives, en particulier elles ne préjugent en rien l'effet des cocktails de substances tels que ceux présents dans la Morcille. Les analyses ont été effectuées en multi-résidus (c'est à dire une recherche systématique de 310 substances), une quinzaine de produits sont retrouvés, de nature et concentration différente selon la période. Néanmoins quelques produits dominent : Diuron, Norflurazon, Norflurazon desmethyl, à noter l'absence d'insecticides dans les eaux analysés alors que ces substances sont utilisées sur le bassin versant. De même, aucune trace de phytosanitaires n'a été trouvée dans les sédiments. Les exemples indiqués en figure 7 sont parfaitement représentatifs des autres prélèvements réalisés sur le site : quelle que soit la saison (les périodes hivernales, hors traitement de vigne, sont également caractérisées par des niveaux de contamination aval de la Morcille)⁶ il y a un gradient amont - aval marqué, qui traduit la rémanence des produits et l'existence de sources permanentes et diffuses de contaminants dans les sols du bassin versant.

Compte tenu des fréquences de présence et des concentrations présentes dans l'eau, et de spécificités chimiques (Agritox, 2006), le Diuron a été choisi comme composé modèle pour des études de laboratoire (cf IV).

En ce qui concerne les métaux, la situation est moins nette. Il n'existe pas de gradient amont-aval marqué sauf pour 2 métaux, l'arsenic et le cuivre dont les concentrations déclassent la qualité d'eau de la Morcille (Tableau 2). En terme de PNEC⁷, la situation est mauvaise, puisque l'As dépasse sa PNEC (4,1 µg/L) sur les deux sites avals et le Cu est systématiquement au-dessus de sa PNEC (1,6 µg/L). On peut donc

⁶ En tout, sur la durée du programme, 8 campagnes de prélèvement et d'analyses multirésidus de phytosanitaires et de métaux ont été réalisées, dans les eaux et les sédiments.

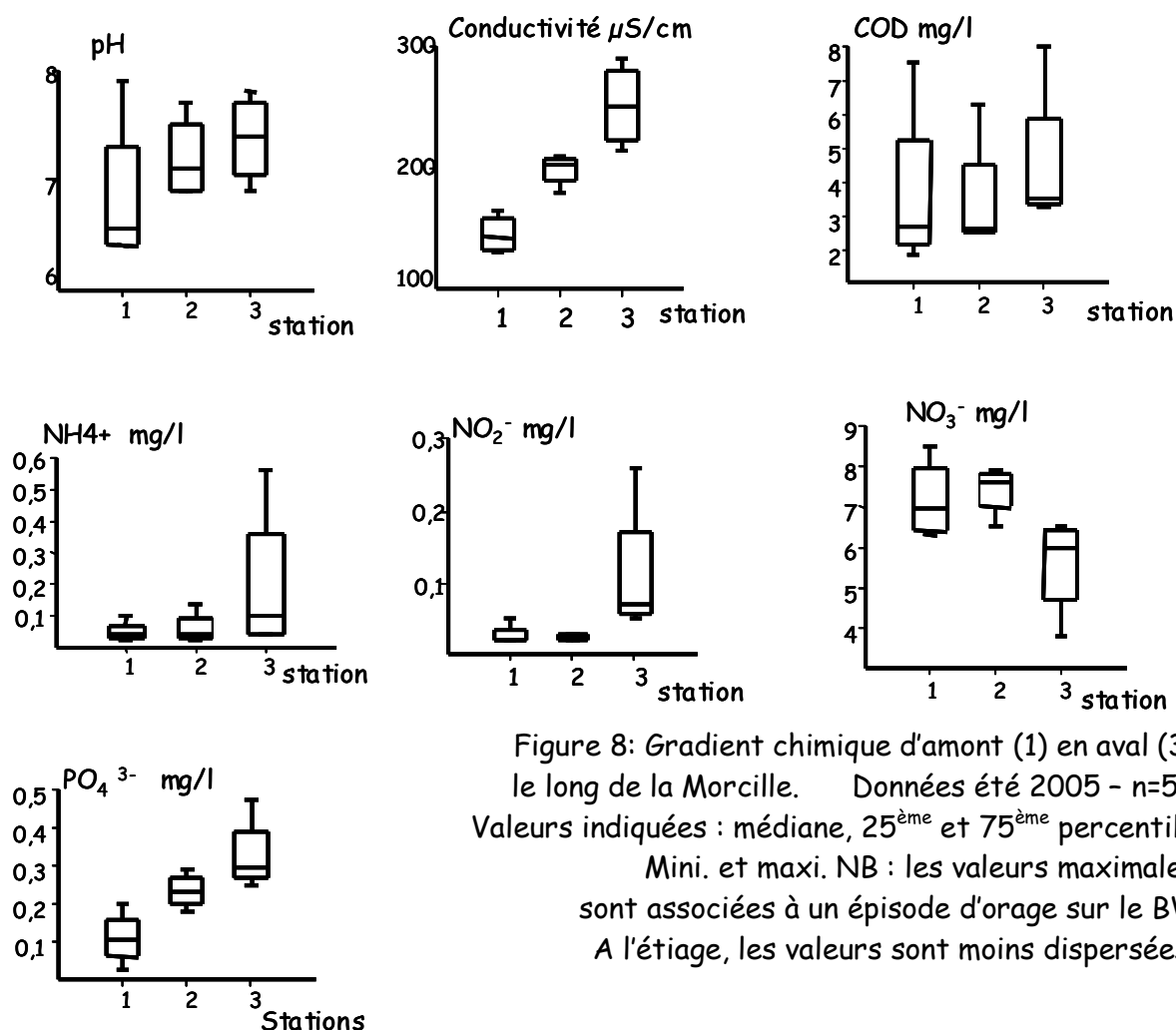
⁷ PNEC : Probable No Effect Concentration : plus forte concentration ne générant pas d'effet biologique sur une espèce donnée.

considérer que ces deux éléments sont susceptibles de contribuer à la dégradation de la qualité biologique du milieu (cf III-1).

	St Joseph	Versaud	St Ennemond
As	2,6	14,4	18,2
Cd	<0,3	<0,3	<0,3
Cr	0,5	0,5	<0,5
Cu	3,2	4,4	5,3
Ni	<1	<1	<1
Pb	<1	1,4	<1
Zn	<20	<20	<20

Tableau 2: Evolution amont-aval des concentrations en métaux dans les eaux de la Morcille (en $\mu\text{g/L}$, au 16/11/2005). Le code couleur correspond aux critères de qualité du SEQ ; Eau : bleu : très bonne qualité ; vert : bonne qualité ; jaune : qualité moyenne.

Concernant les composés à effet trophique (nutriments minéraux, matières organiques (MO) et d'autres indicateurs de qualité (pH, conductivité), les données recueillies montrent une augmentation d'amont en aval de la charge en nutriments et en MO (figure 8).



Cette évolution traduit, d'amont en aval, l'augmentation d'habitations sur le bassin versant. Ce type d'évolution est caractéristique du site, les autres campagnes de mesures effectuées lors de cette étude ayant donné la même information. D'un amont oligotrophe, la Morcille devient progressivement oligo-mésotrophe. La contamination de nature trophique est relativement faible.

II-3-2/ Qualité chimique des sédiments

Seuls l'As et le Cu sont présents à des concentrations supérieures à la PNEC (Pnec As en sol : 1,8mg/kg et Pnec Cu sédiment : 0,8mg/kg)⁸. Hormis ces deux métaux, dont la concentration croît d'amont en aval (tableau 3) et qui présentent un risque pour l'environnement, la contamination métallique des sédiments est en deçà des seuils de risque. Dans le cas de l'As, le fond géochimique local représente la majeure partie de l'As trouvé sur les sites, le cuivre trouvant plutôt son origine dans les produits de traitement phytosanitaire.

	St Joseph	Versaud	St Ennemond
As	12.5	13.4	20.5
Cd	0.2	0.2	0.6
Cr	27.5	20.8	18
Cu	2.9	3.7	6.1
Pb	31.5	39	41.5
Zn	28.6	26	21.9

Tableau 3: Concentration en métaux dans les sédiments de la Morcille (16/11/2005) en mg/kg. Le code couleur correspond aux critères de qualité du SEQ ; Eau : bleu : très bonne qualité ; vert : bonne qualité ; jaune : qualité moyenne.

En complément à ces valeurs de concentrations totales dans les sédiments, se pose la question de leur biodisponibilité réelle, qui dépend de nombreux ligands chimiques (carbonate, matière organique,...) présents dans les sédiments.

Aucun pesticide n'a été trouvé dans les sédiments, ce qui peut s'expliquer par la faible teneur en matières organiques des sédiments (2 à 3 % du poids sec) qui sont constitués à plus de 80% par des sables de granulométrie supérieure à 200µm.

II-3 -3/Mesures de contaminants dans les biofilms

Très peu d'études ont été menées en conditions naturelles pour déterminer simultanément le niveau de contamination du milieu et des biofilms qui s'y sont développés. Bohuss *et al.* (2003) ont mis en évidence leurs capacités de bio-accumulation, en détectant de l'atrazine dans des biofilms (jusqu'à 10 µg/g) tandis que le dosage de cet herbicide dans l'eau du lac Valence (Hongrie) n'a pas montré de

⁸ Données Ineris : <http://chimie.ineris.fr> . Il n'existe pas de PNEC sédiment pour l'As.

contamination du milieu aquatique au moment du prélèvement (inférieure à la limite de détection de 70 ng/L). En plus de l'intérêt à connaître les concentrations internes dans les biofilms pour une caractérisation précise des concentrations d'exposition, le biofilm pourrait donc être utilisé comme un indicateur intégratif de contamination. Toutefois, il n'existe pas dans la littérature de protocole analytique de dosage des micropolluants organiques clairement défini et validé pour ce type de matrice.

Les premiers travaux ont donc consisté à mettre au point et valider une méthode analytique, en utilisant comme modèle le diuron (DIU) et ses principaux métabolites : 3,4 dichloroaniline (DCA) et 3-(3,4-dichlorophenyl)-1-méthyl urée (DCMU).

Pour la mise au point de la méthode, des biofilms ont été développés sur plaques de verre au laboratoire, éclairés 12 h par jour et alimentés par de l'eau de surface non contaminée prélevée sur le site du Beaujolais (Barasc, 2004). Après prélèvement, les biofilms sont séchés à température ambiante pendant une nuit (au moins 15 h), puis sont lyophilisés pour limiter la dégradation de la matrice avant l'analyse (Faure, 2005).

La méthode d'analyse est une extraction sur biofilm sec (entre 10 et 100 mg) par 10 mL d'un mélange acétone/dichlorométhane dans une cuve à ultrasons pendant 30 minutes. L'extrait est ensuite purifié sur cartouche SPE (Oasis HLB, 3mL, 60 mg, Waters) puis repris dans 250 μ L d'un mélange eau/acétonitrile pour dosage en chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LCMSMS). Comme il n'existe pas de matériaux certifiés, la mise au point de la méthode repose sur un dopage de la matrice par les composés à doser. Après essais d'optimisation, le temps de contact a été fixé à 1h. Une quantité connue de linuron est rajoutée avant chaque extraction du biofilm, pour servir de traceur analytique pour tout le protocole, tandis que le diuron deutéré (dimethyl D6, CIL, France) est utilisé comme étalon interne pour le dosage en LCMSMS (ajout dans l'extrait final).

Les limites de quantification obtenues sont de 40, 60 et 100 ng/g poids sec respectivement pour le diuron, la DCMU et la DCA, pour une prise d'essai initiale de 100 mg de biofilm sec. Le taux de récupération moyen sur tout le domaine d'application de la méthode est de 71% pour le diuron (coefficient de variation= 24%, n=10).

L'application de la méthode développée dans cette étude à des échantillons prélevés sur la Morcille montre une contamination des biofilms par le diuron, qui augmente d'amont en aval pour toutes les périodes de prélèvements (figure 9). Les niveaux de concentrations en pesticides dans les biofilms sont reliés à ceux relevés dans l'eau de chaque site.

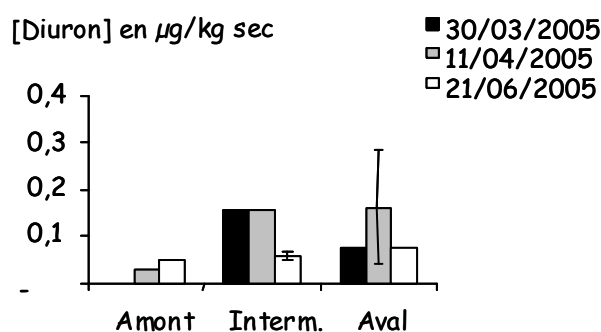


Figure 9 : Evolution de la concentration en diuron dans les biofilms de la Morcille avant le début des traitements de la vigne (30/03/05) et pendant (11/04 et 21/06) (moyenne \pm écart type, n=3)

Cette méthode d'analyse permet désormais de disposer d'une évaluation plus pertinente de l'exposition des microorganismes périphtiques aux contaminants et de mieux expliquer leurs réponses biologiques.

II-3-2 / Microcapteurs

L'utilisation de microbiocapteurs pour la détection et la mesure des concentrations de toxiques ou d'autres substances (nutriments, par exemple) constitue une approche complémentaire au dosage direct des composés. C'est une technique intéressante pour la surveillance en continu des milieux aquatiques, car elle donne (au moins en théorie) une réponse rapide, quantifiée, peu onéreuse. De très nombreuses recherches en ce domaine visent à améliorer la spécificité de la réponse, la proportionnalité de la réponse, la stabilité du signal Dans le cadre de ce programme, plusieurs types de capteurs ont été développés (Xuejiang, 2005 ; Durrieu et al, 2004).

Le principe général est que, en combinant un biorécepteur (enzymes ou cellules entières) avec un transducteur, il est possible d'obtenir un signal électrique traduisant l'action des composés polluants sur le matériel biologique utilisé. Deux types de capteurs ont été développés durant ce programme : des capteurs enzymatiques, utilisant des enzymes purifiées comme bio-récepteurs (tyrosinase, cholinestérase) et un capteur algal, utilisant des cellules algales de *Chlorella vulgaris* comme bio-récepteurs. Les essais ont permis 1/ d'avancer dans la mise au point de microbiocapteurs, 2/ de tester plusieurs substances phytosanitaires (dont le Diuron, produit modèle de cette étude, ou d'autres produits insecticides d'intérêt phytosanitaire), un nutriment (le nitrate) et des eaux du site de la Morcille, 3/ de préciser leur domaine de validité (interférences éventuelles, sensibilité,...).

° Biocapteur à Cholinestérase

L'activité de la Butyrylcholinestérase (BuChE) est plus fortement inhibée par le Dichlorvos que par le Trichlorphon. La limite de détection a été déterminée comme étant la concentration induisant une baisse du signal de 3 fois la valeur du bruit de fond. Cette limite est de $4,7 \cdot 10^{-7}$ M pour le Trichlorphon et $3,1 \cdot 10^{-8}$ pour le Dichlorvos. La limite de détection du Dichlorvos est assez proche des recommandations de l'OMS (2ppb). Quand la membrane enzymatique est exposée à des concentrations supérieures pour le Dichlorvos ($>1,8 \cdot 10^{-6}$ M) et le Trichlorphon ($>6,0 \cdot 10^{-6}$ M), de fortes inhibitions $>40\%$ et $>30\%$ respectivement sont observées (figure 10).

Ce capteur a montré une bonne reproductibilité de mesures (déviations standard 3,8%, n=5) et possède une stabilité dans le temps de 4 semaines avec une perte de sensibilité de moins de 10%.

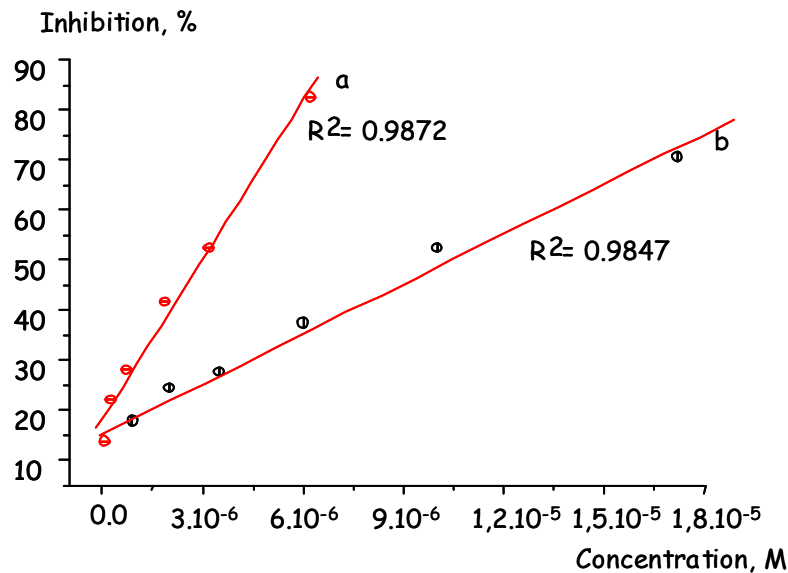


Figure 10: Calibration du microbiocapteur à ButylCholine Estérase pour 2 insecticides, le Trichlorophon (a) et le Dichlorvos (b). Mesures réalisées dans du tampon phosphate 5 mM, pH 7,5 et un temps de contact de 30 minutes.

Compte tenu de la simplicité de sa fabrication et de sa mise en œuvre, il semble que ce système puisse être un système d'alerte précoce pour le suivi de contaminants dans l'environnement (il reste cependant à élargir son domaine d'application).

° Biocapteurs à nitrate réductase

Un autre travail de développement de microcapteurs a été réalisé pour doser les nitrates dans l'eau. Les méthodes classiques de dosage (spectrophotométrie, conductimétrie, chromatographie ionique,...) sont sensibles, reproductibles, mais nécessitent un prétraitement des échantillons et sont parfois complexes de mise en œuvre. Les électrodes spécifiques donnent des réponses rapides, sont simples d'emploi et peuvent être installées *in situ* pour des mesures en temps réel. Elles sont cependant peu stables dans le temps et subissent de nombreuses interférences. Les biocapteurs enzymatiques sont une alternative intéressante à ces problèmes.

Les travaux réalisés en ce sens ont été orientés vers la réalisation d'un microcapteur conductimétrique utilisant l'enzyme nitrate réductase d' *Aspergillus niger* couplée au méthyl Viologen (Xuejiang, 2005). Le développement technologique de ce capteur et les premiers essais en laboratoire (domaine de validité, interférences, ..) ont montré que sa sensibilité (figure 11) était suffisante pour travailler sur certains échantillons réels (eaux potables, eaux résiduaires), avec une stabilité dans le temps satisfaisante (essais sur 15j).

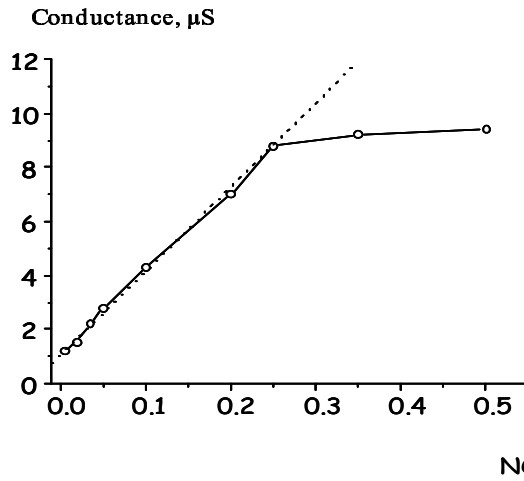


Figure 11: Sensibilité et courbe de réponse aux teneurs en NO₃⁻ du capteur à nitrate réductase.

°Biocapteur à tyrosinase

Sur le même principe, un micro-biocapteur intégrant l'enzyme tyrosinase a été testé sur différents produits toxiques dont le Diuron. Pour ces capteurs, préexistants à cette étude et testés sur quelques substances (Chlorophénol, Atrazine,...), l'objectif était de préciser les interférences éventuelles avec des produits (de type métaux lourds, présents sur le site d'étude) et d'évaluer la sensibilité au Diuron (figure 12). La tyrosinase paraît peu influencée par la présence des ions Pb⁺², Cd⁺² et Zn⁺², mais l'influence des ions Cu⁺² est très importante sur l'activité de la tyrosinase et plus particulièrement dans la gamme 0,5 à 20 ppb de cuivre.

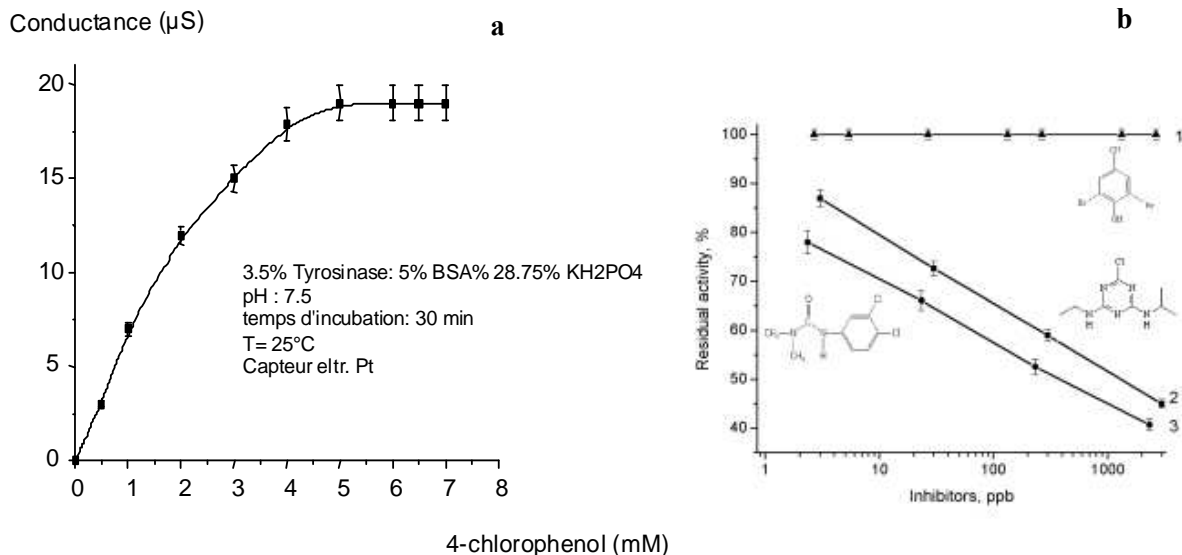


Figure 12: Réponse du biocapteur à tyrosinase en absence (a) et en présence (b) de (1) Bromoxynil, (2) Atrazine, et (3) Diuron.

Pour 1 ppb de Cu⁺², le taux d'inhibition de l'activité de la tyrosinase est de 30% (13% pour 0,5 ppb de Cu⁺² et 20% pour 10 ppb de Cu⁺²). Ce résultat pourrait s'expliquer par le

fait que le cuivre est présent dans l'enzyme tyrosinase et que la présence de cuivre dans la solution conduit à un réarrangement de la distribution des ions Cu^{2+} dans des sites actifs de l'enzyme elle-même.

° Biocapteur à cellules algales

La technologie d'utilisation de cellules entières de *Chlorella vulgaris*, insérées dans un gel de sérum albumine de bœuf, déposées sur des électrodes conductimétriques interdigitées, permet une approche intéressante, car elle traduit la réponse de cellules complètes (et non plus d'enzymes isolées) et est donc d'un plus grand réalisme pour l'évaluation d'effets biologiques. Pour cette technique aussi, cette étude a permis la poursuite de la mise au point de la méthode et des essais de sensibilité sur le Diuron (figure 13). Un changement significatif de signal fluorescent apparaît vers 70 ppb de Diuron (la limite de détection étant de 1 ppb et correspondant à 3 fois la valeur du bruit de fond), c'est à dire à des valeurs nettement supérieures aux concentrations environnementales.

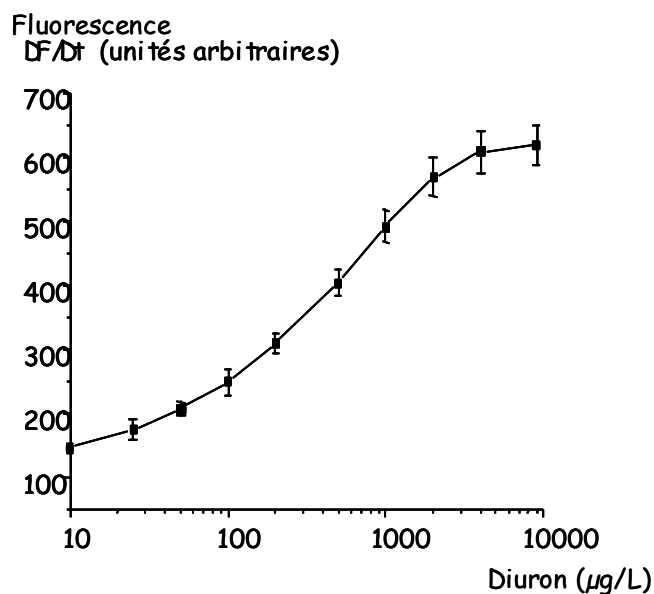


Figure 13: Etalonnage du biocapteur algal par mesure de la variation de fluorescence (6×10^7 cellules/mL, pH 7)

Ce modèle de biocapteurs a permis également de comparer les sensibilités relatives des cellules algales selon qu'elles soient libres ou immobilisées, vis-à-vis de différents métaux ou produits phytosanitaires (figure 14). Pour les effets des phytosanitaires (4 produits testés), les travaux montrent que les cellules libres ont des seuils de sensibilité plus bas que les mêmes cellules fixées, tout au moins pour des concentrations de 1 ppm et 100 ppb (il n'y a plus de différence aux faibles teneurs, et peu d'effet toxique). A 1 ppm, on atteint des CE 40 pour le Diuron ou la Triazine quand

les cellules sont libres et seulement une CE 20 quand elles sont immobilisées. A l'opposé, avec des contaminants métalliques, on n'observe que très peu de différences cellules libres - cellules fixées et uniquement à 1 ppm (figure 14)⁹.

Ces résultats sont intéressants car ils permettent de relativiser les données de toxicité algales qui sont toujours mesurées sur des cellules libres (Chlorelle en culture). Or, dans les cours d'eau à forte énergie (tous les petits cours d'eau, en particulier), l'essentiel de la biomasse microbienne et algale est fixé sous forme de biofilm. Dans ces conditions de microenvironnement, le biofilm et sa matrice complexe d'exopolysaccharides assurent vraisemblablement un rôle protecteur des cellules en piégeant les phytosanitaires ou en limitant leur diffusion, en tout cas en réduisant l'exposition réelle des microorganismes du biofilm¹⁰.

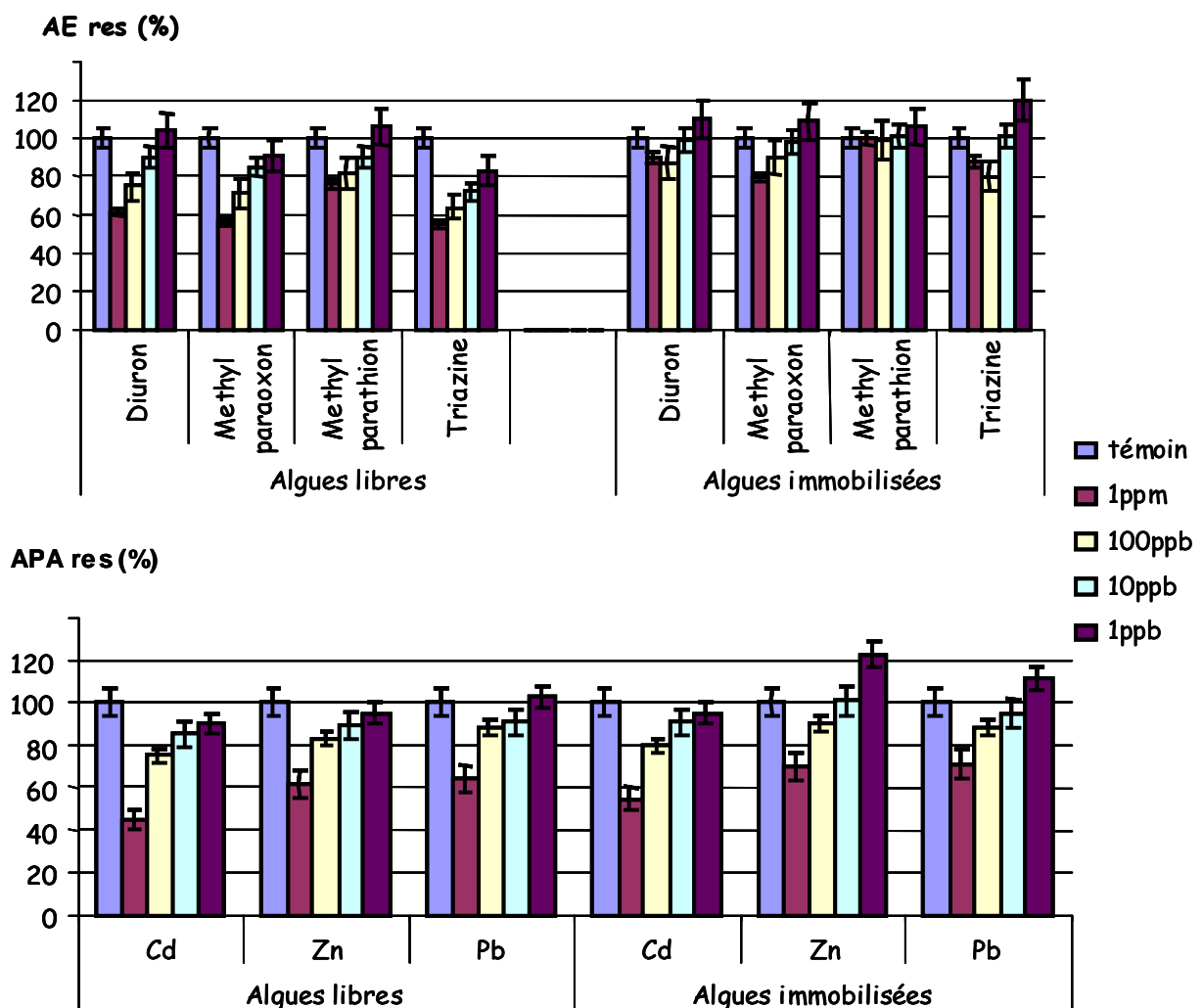


Figure 14: Action de métaux lourds et de pesticides sur algues libres et immobilisées dans un gel d'agarose.

Dans le cas des métaux, où cette différence cellules fixées-cellules libres est moins marquée, on peut faire l'hypothèse que la diffusion des métaux est moins ralentie

⁹ NB : la PNEC chronique pour le Diuron est de 0,2µg/L pour les algues.

¹⁰ Cf les approches sur le dosage des phytosanitaires dans les biofilms

par les Exo Poly Saccharides (EPS) des biofilms. Des travaux sont en cours pour doser les concentrations intracellulaires des métaux et les concentrations totales dans les biofilms, ce qui permettra de préciser cette hypothèse.

III/ Etat écologique du cours d'eau récepteur et évaluation de l'impact:

L'évaluation de l'état écologique du milieu récepteur (la rivière Morcille) et l'estimation des impacts *in situ* se sont effectuées par comparaison des 3 à 4 sites situés d'amont en aval, en se basant sur plusieurs descripteurs :

- des communautés naturelles en place: invertébrés benthiques (approches taxonomiques et indiciaires) et communautés périphytiques et sédimentaires pour lesquels des approches de diversité (PCR-DGGE) et fonctionnelles (activités enzymatiques,) ont été appliquées.

- l'utilisation d'organismes dit « sentinelles», introduits dans le milieu : des œufs de truite, sur lesquels les taux de survie ont été analysés et complétés par une approche de génotoxicité pour étudier les lésions à l'ADN.

Si les approches *in situ* ont pour avantage essentiel leur réalisme, elles peinent parfois à identifier précisément des relations de causalité (contaminant-réponse biologique) ou à préciser des mécanismes d'effet, car la réponse biologique intègre l'ensemble des facteurs environnementaux (biodisponibilité, hydrodynamique, lumière,...) qui sont alors autant de facteurs de confusion.

Ces évaluations *in situ* ont donc été complétées par des expérimentations de laboratoire, sur la partie périphyton (Villeneuve, 2005 ; Hassani, 2005). Elles sont à mettre en perspective avec une démarche générale d'évaluation de la toxicité des substances anti-parasites telle que conseillée par la SSM (2004).

III-1/ Communautés naturelles :

III -1-1/ Périphyton¹¹ (algues, bactéries) : diversité et fonctions

Les caractérisations spatiales et temporelles des communautés microbiennes du périphyton réalisées sur la Morcille ont permis de montrer les changements de diversité amont - aval. Une approche expérimentale de terrain, basée sur la mise en place de pastilles de verre qui se colonisent naturellement dans le cours d'eau et permettent de recueillir des communautés microbiennes adaptées aux sites d'implantation (Montuelle et al., 2005), a permis entre autres 1/ de mettre en évidence la variabilité intra site et inter sites, 2/ de s'affranchir de l'effet de facteurs de confusion tels que la vitesse de courant ou de la luminosité. Quelle que soit la saison, les 3 sites sont parfaitement discriminés (figure 15).

¹¹ bien que le terme précis soit épilithon, nous utiliserons par la suite le terme périphyton, utilisé de façon très générique pour décrire le biofilm .

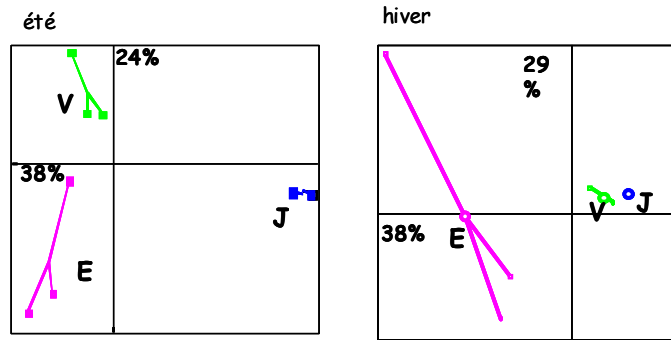


Figure 15: Discrimination des sites amont-aval par ACP sur l'ADNr 18S (Procaryotes) (échantillonnage juin 2004 & Janvier 2005).

De même, la biomasse périphytique décroît d'amont en aval, St Ennemenond étant systématiquement de 2 à 3 fois moins dense que St Joseph à l'amont.

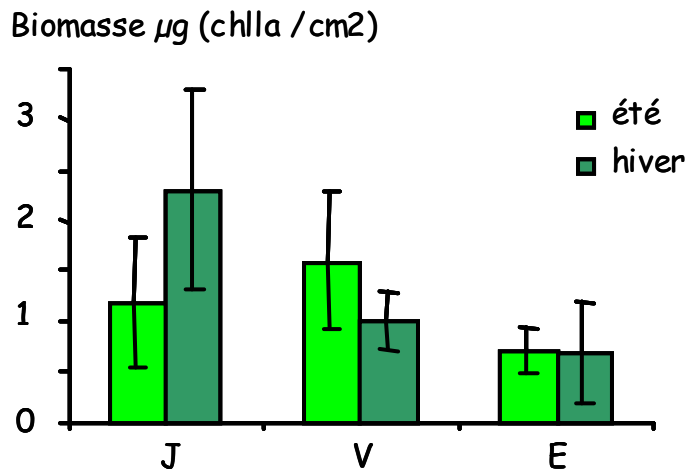


Figure 16: Evolution amont aval des densités d'épilithon, en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de chlorophylle a.

Cette baisse de densité algale dans les biofilms peut être mise en regard de l'augmentation amont-aval des phytosanitaires et en particulier d'herbicides (figure 16) qui, inhibant la photosynthèse, peuvent conduire à une réduction des biomasses algales. Par voie de conséquence, on peut envisager que cette réduction ait des impacts sur les réseaux trophiques, par exemple une réduction indirecte des invertébrés brouteurs qui disposent de moins de ressources à l'aval de la Morcille (cf III 1-2).

En complément à ces informations, la mise en oeuvre de la méthode PICT¹² a permis de quantifier la résistance des communautés épilithiques aux herbicides. L'utilisation du Diuron, par des essais d'écotoxicologie au laboratoire, a montré que les concentrations nécessaires pour inhiber 50% de la capacité photosynthétique du biofilm (CE50) augmente de façon significative d'amont en aval, traduisant une plus grande

¹² PICT : Pollution Induced Community Tolerance. Il s'agit d'une démarche expérimentale basée sur l'hypothèse qu'une communauté issue d'un milieu contaminé (ex St Ennemenond) présente une résistance à ce contaminant plus importante qu'une communauté similaire issue d'un milieu non contaminé (ex St Joseph).

résistance des communautés photosynthétiques aval à l'herbicide et par conséquent un probable changement de biodiversité avec sélection de souches résistantes, mieux adaptées aux conditions environnementales des sites aval. Les CE 50 des sites de l'amont à l'aval sont respectivement de 0,56 μM Diuron (min 0,39 - max 0,77) pour St Joseph, 1,57 (min 1,04 - max 2,2) aux Versauds et 1,89 (min 1,39 - max 2,57) à St Ennemond. Ces valeurs sont à mettre en regard des concentrations croissantes en phytosanitaires trouvées sur ces sites (figure 7).

Dans la bibliographie, les valeurs de toxicité de produits phytosanitaires sont fréquemment mesurées sur des espèces individuelles en culture (test mono-spécifique). Les comparaisons des valeurs de CE 50 trouvées ici sont donc délicates, car nous sommes sur une situation de terrain avec 1/ des mélanges de substances et 2/ sur des communautés microbiennes fixées. Il est difficile d'extrapoler les valeurs obtenues en cultures vers des systèmes de cultures fixées (les biofilms), comme l'ont montré les essais sur capteur algal (cf II-3-2).

Ces impacts sur les communautés algales de l'épilithon ne se retrouvent pas sur l'ensemble de la communauté microbienne. Plusieurs campagnes de mesures (2/an) ont permis de caractériser les principales activités microbiennes impliquées dans la dégradation de la matière organique (glucosidase, aminopeptidase, phosphatase), les cycles du carbone (respiration) et de l'azote (nitrification, dénitrification).

Les activités microbiennes en sédiment présentent des variations d'intensité importantes selon saison (Blanc, 2005), avec parfois l'existence d'un gradient amont - aval. Cependant, globalement, il est peu évident de discriminer les sites d'étude : le patron de gradient trophique ne se traduit pas par un patron similaire pour les activités hétérotrophes, qui sont manifestement sous la dépendance de facteurs environnementaux locaux structurants. Ici encore les seules différences significatives sont obtenues sur le site de St Ennemond (figure 17).

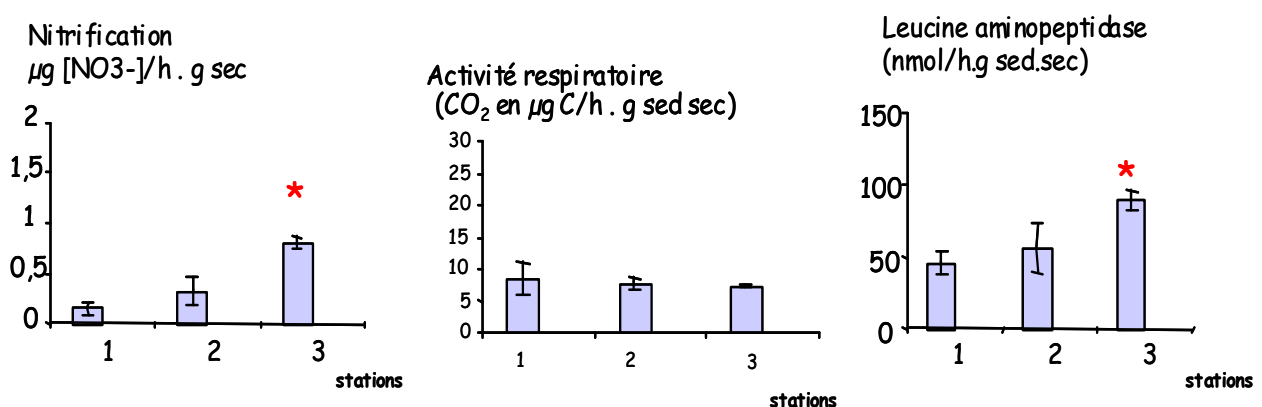


Figure 17: Exemple d'activités bactériennes en milieu sédimentaire (mesures de Juin 05), * :différences significatives au seuil de 0,05 ; 1, 2 & 3 : respectivement St Joseph, Versauds & St Ennemond.

Comparativement à d'autres milieu sédimentaires, les processus microbiens sont peu intenses sur la Morcille : absence ou très faible dénitrification, respiration de faible

intensité . La faible intensité des processus dénitrifiants ($0,014\mu\text{g N/g}$ sédiment sec. h)¹³ peut s'expliquer par la texture très sableuse du sédiment (92% de sables grossiers et moyens) et une très faible teneur en MO (0,8% du poids sec). Par comparaison, les sédiments de la Saône, de texture beaucoup plus fine (95% limon et argile) et avec une teneur en MO de 5,2% atteignent une capacité de dénitrification de $13,4\mu\text{g N/g}$ sédiment sec. h (Bas, 2005). D'autres sédiments (7% de MO, 92% de limon et argile) supportent des dénitrifications potentielles de $20\mu\text{g N/g}$ sédiment sec. h (Nogaro et al, soumis).

III-1-2/ Invertébrés : Diversité, valeur indiciaire (IBGN) et traits biologiques.

Les macro-invertébrés benthiques ont été prélevés selon le protocole IBGN (AFNOR , 1993) à l'aide d'un filet de type Surber. Les prélèvements ont été réalisés lors de sept campagnes d'échantillonnage entre Février 2004 et Août 2005, à raison d'une par saison. Ces campagnes représentent deux années biologiques et le pas de temps saisonnier permet d'appréhender une partie de la dynamique des populations d'invertébrés et notamment des insectes.

Les valeurs de l'IBGN décroissent nettement de l'amont vers l'aval : de $18,3 \pm 1$ à St Joseph, il chute à 10 ± 3 aux Versauds et à 8 ± 3 à St Ennemond, ce qui correspond à un milieu très dégradé selon les critères du SEQ Bio (MEDD, 1999).

De nombreuses études mettent en évidence les conséquences néfastes des pesticides sur les invertébrés (Liess et al., 1999 ; Leonard et al., 2000). L'une d'entre elles montre que la composition taxonomique change profondément le long d'un gradient de concentration en pesticides (Friberg et al., 2003). Il a également été montré que l'agriculture, particulièrement par les risques de ruissellement de pesticides, entraîne pour toutes les tailles de cours d'eau une diminution du nombre moyen d'espèces avec l'augmentation du pourcentage de terres cultivées (Probst et al., 2005 ; Neumann, 2002 ; Thiere, 2004). Le nombre total de taxons est significativement plus faible dans les cours d'eau les plus sévèrement pollués.

De même, il existe une grande corrélation entre la contamination par les pesticides et l'abondance des différents taxons (Neumann et al., 2003). En effet, dans les cours d'eau pollués, les taxons polluo-sensibles présentent des plus faibles densités et les taxons résistants sont plus abondants.

Ces résultats sont confirmés par tous les échantillonnages d'invertébrés réalisés lors de cette étude : modification de la biodiversité, avec réduction de la richesse taxonomique (figure 18).

¹³ Mesure de dénitrification potentielle, sur échantillon hivernal.

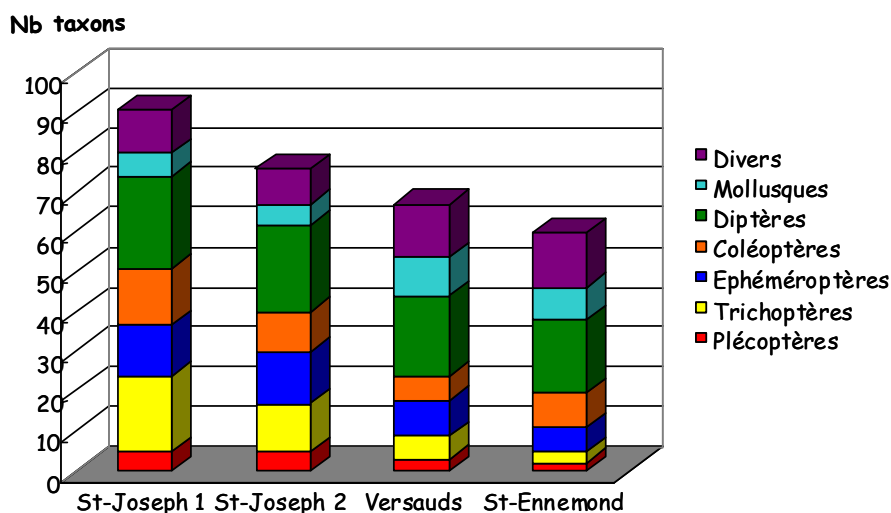


Figure 18: Evolution spatiale de la richesse taxonomique (moyenne de 7 campagnes).

Sur les 114 taxons recensés on note une perte totale de plus de 50% sur le site aval (Blacher, 2005) et ceci en dépit de l'apparition de nouveaux taxons (Coléoptères *Dytiscidae*, Diptères *Culicidae*, Odonate *Calopteryx*, et le crustacé *A. aquaticus*).

La perte de taxons est particulièrement sensible pour les Ephéméroptères, Plécoptères et Trichoptères (figure 18). Un test non paramétrique (ANOVA de Friedman) sur la richesse spécifique calculée à partir de l'indice de Shannon¹⁴ montre que le nombre d'espèces décroît significativement de l'amont à l'aval ($p = 0,0046$) (figure 19).

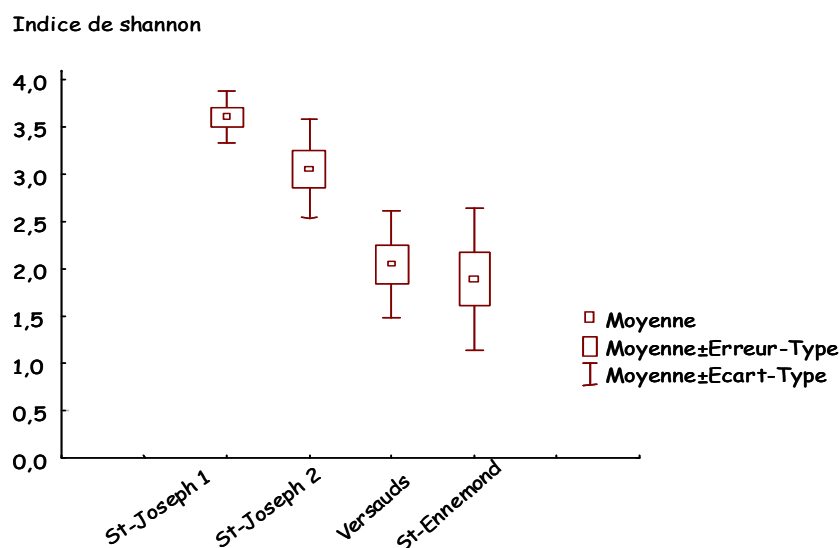


Figure 19 : Variation de l'indice de Shannon d'amont en aval de la Morcille

¹⁴ L'indice de Shannon est un indice de diversité qui combine le nombre de taxons et leur régularité : $H = R \cdot \log_2 S$ avec R = régularité, S: nombre d'espèces

- H est maximum quand tous les taxons sont également abondants
- plus H est faible, plus les espèces sont inégalement réparties

En revanche, il n'y a pas de différences significatives entre les deux stations en amont ni entre les deux stations en aval (test U de Mann Whitney); la baisse de la richesse taxonomique est essentiellement marquée à partir de la station des Versauds.

Cette baisse de la qualité écologique de la Morcille, que traduit la baisse de l'indice de Shannon, est inversement corrélée à la surface en vigne du bassin de la Morcille, dont la proportion augmente d'amont en aval (cf III-4).

Le mécanisme d'action des phytosanitaires sur les communautés d'invertébrés de la Morcille est cependant mal connu : les produits retrouvés ne sont pas des insecticides, mais des fongicides et des herbicides. A priori les invertébrés ne sont pas des cibles directes de ces produits. On peut donc supposer un effet cascade, les herbicides réduisant la diversité et la biomasse périphytique, qui est la ressource alimentaire principale pour les invertébrés brouteurs. La réduction de la ressource alimentaire entraînerait une diminution de certains taxons alors que d'autres proliféreraient.

L'analyse des traits biologiques supporte assez bien cette hypothèse : en effet le trait biologique « nutrition sur microphytes vivants (= biofilm) » baisse de presque 10% entre St Joseph (amont) et St Ennemond (aval) ce qui pourrait s'expliquer par un baisse de la ressource particulière qu'est le biofilm périphytique (figure 20). Les organismes brouteurs baissent d'amont en aval, avec un remplacement d'espèces, les mollusques se trouvant uniquement à l'aval.

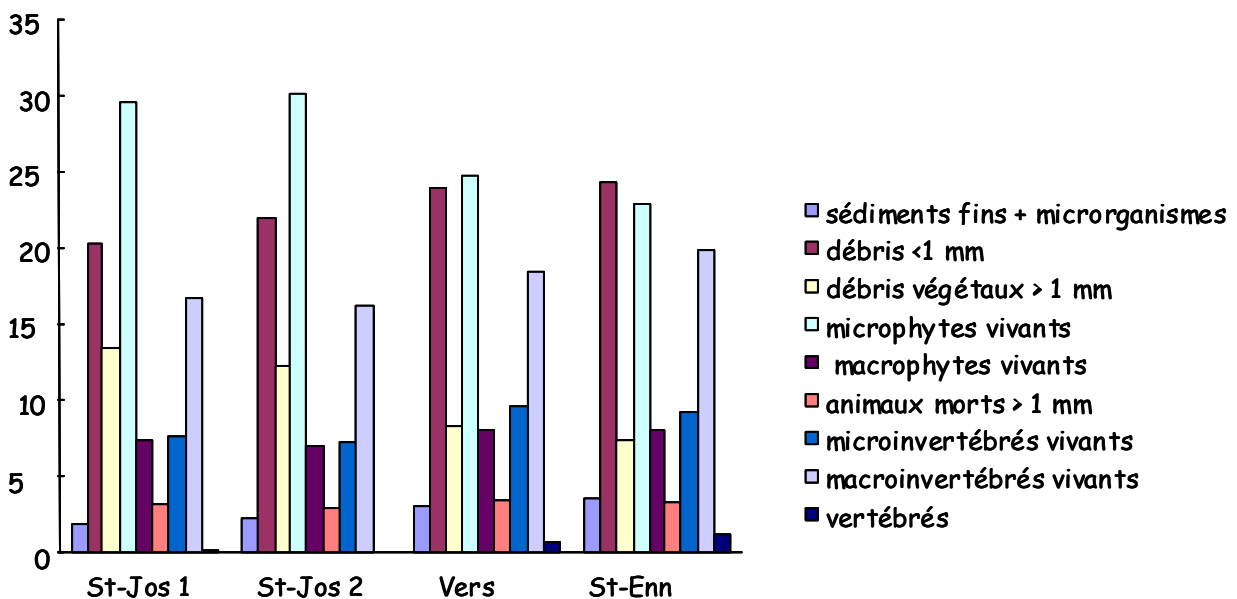


Figure 20: Evolution du trait biologique mode de nutrition le long de la Morcille. A chaque point, la somme des traits biologiques est de 100%.

De façon complémentaire, le trait biologique « trophie », qui indique les conditions de charges organiques dans le milieu, montre l'effet des rejets domestiques croissants d'amont en aval (figure 21). Cette évolution est à rapprocher des gradients de composés chimiques à effet trophique (cf II-3-1).

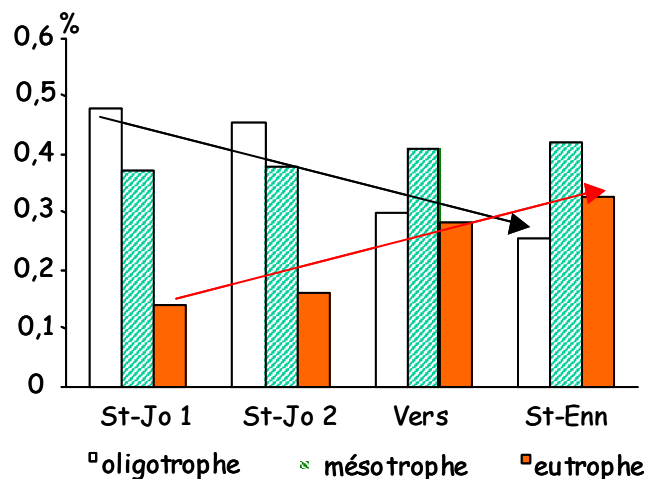


Figure 21 : Evolution du trait biologique « trophie » le long de la Morcille.

III-2/ Espèces sentinelles : truite fario (*Salmo trutta*)

Le bon développement embryolaire est une condition fondamentale pour le maintien de peuplements piscicoles dans le milieu. Ces stades représentent en effet une phase critique de l'ontogenèse, sans protection particulière vis-à-vis du milieu extérieur alors qu'ils sont en contact intime avec le sédiment et qu'ils dépendent étroitement de la qualité de l'eau environnante.

Eutrophisation et colmatage sont deux sources de pollution susceptibles d'agir en synergie car la matière organique produite dans les milieux eutrophisés est riche en colloïdes. Ces derniers retiennent et agglomèrent les particules les plus fines des MES qui contribuent au colmatage des frayères. De plus, les colloïdes et les matières organiques sont des ligands forts pour les micropolluants. Au final, les œufs qui se développent dans ce type d'environnement appauvri en oxygène sous l'effet conjugué de ces deux facteurs, sont susceptibles de présenter une sensibilité accrue aux divers micropolluants présents. Il est donc intéressant de compléter l'indicateur « taux de survie », par un indicateur sub-létal permettant de discriminer un éventuel effet de micropolluants.

Des œufs de truites, encagés et placés dans les sédiments de la Morcille aux différentes stations de suivi, permettent d'évaluer la qualité du milieu vis-à-vis de la vie piscicole.

La survie est généralement plus élevée dans la partie amont que dans la partie aval, les résultats étant très variables dans la partie intermédiaire (tableaux 4 et 5). Le colmatage des frayères par les MES véhiculées lors des crues semble pouvoir expliquer la très mauvaise survie des œufs dans la partie aval de la Morcille. Dans les parties amont et intermédiaire, lorsqu'il y a des crues, le colmatage est assez important pour entraîner une baisse de la survie des œufs par comparaison avec différents ruisseaux oligotrophes de Haute-Savoie (fig. 22). Lorsqu'il y a des conditions hydriques très favorables sur la Morcille (ni crues, ni étiages sévères), la survie est élevée dans les trois parties étudiées.

Station de la Morcille	Amont	Intermédiaire	Aval
Survie en début de résorption. (%).	202/300 (67,33)	201/300 67,0)	58/300 (19,33)*

Tableau 4 : Survie des stades embryolarvaires de truites fario (*Salmo trutta*) de la fécondation jusqu'au stade oeillé (vers 350 degrés jours). Avril 2004.

*: significativement différent de la valeur du témoin (amont) au seuil de 5% (Khi 2).

Station de la Morcille	Amont	Intermédiaire	Aval
Répliquat 1	46/50	41/50	44/50
Répliquat 2	46/50	25/50*	42/50
(% dans la trappe d'émergence)	(81)	(42)	(79)

Tableau 5 : Survie des stades embryolarvaires de truites fario (*Salmo trutta*) entre le stade oeillé et le stade émergence (vers 650 degrés jours). Juin 2004.

*: échappement probable d'une partie des alevins.

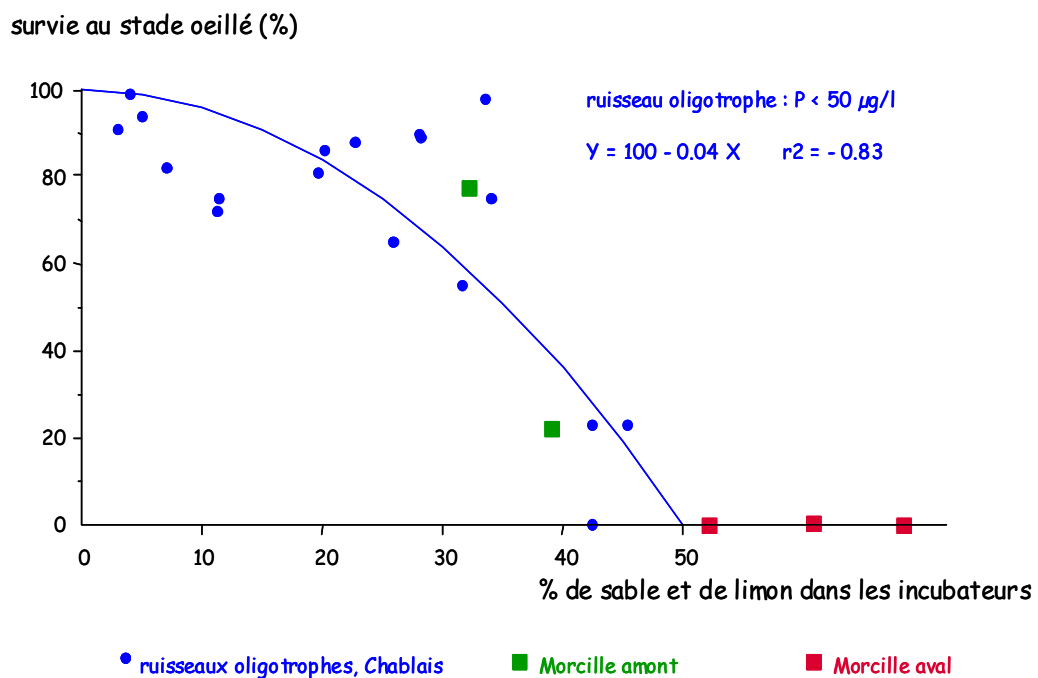


Figure 22 : Effet du degré de colmatage des incubateurs sur la survie des oeufs de truite. Les carrés correspondent aux résultats sur le site amont et les croix au site aval. Ils sont comparés à une relation obtenue sur des ruisseaux oligotrophes du Chablais.

En tout, 9 séries d'installation de cages à œufs de truite ont été effectuées, mais seule une série a pu être exploitée sans problème de crue ou d'étiage.

En complément à cette survie, l'étude du niveau de dommages à l'ADN cellulaire, du fait de la transmission intergénérationnelle possible du message toxique, présente un grand intérêt chez les organismes vivants dans des milieux anthropisés. Nous avons choisi de mesurer sur les stades embryolarvaires de truite le niveau de dommages primaires à l'ADN des hématies en mettant en œuvre l'essai des comètes en conditions alcalines.¹⁵.

Ces résultats mettent en évidence un niveau d'endommagement de l'ADN des érythrocytes d'embryons de truites significativement supérieur aux stations intermédiaire et aval par rapport à la station amont considérée comme témoin relatif dans notre étude, et ceci quels que soient les paramètres de quantification utilisés et la date de prélèvement (tableau 6). Dans cette zone témoin cependant, le niveau d'atteinte génotoxique reste cependant significativement plus élevé que dans un ruisseau de référence (Les Plenets - 74), situé en zone d'alpage avec une pression anthropique très faible.

Les embryons provenant des pontes installées dans les stations intermédiaire et aval ne présentent pas par contre de différence significative dans l'intégrité de leur ADN. De plus, les résultats obtenus varient peu dans le temps, les valeurs obtenues pour les deux prélèvements (avril et juin 2004) n'étant pas significativement différentes (tableau 6).

		tail DNA	tail length	tail moment
Avril 2004	amont	5,03 ± 0,37	11,3 ± 0,63	1,17 ± 0,11
	intermédiaire	26,3 ± 1,69*	75,42 ± 2,82*	11,83 ± 0,95*
	aval	27,1 ± 1,63*	77,77 ± 2,77*	11,98 ± 1,00*
Juin 2004	amont	3,76 ± 0,30	13,15 ± 0,72	0,86 ± 0,09
	intermédiaire	22,23 ± 1,26*	83,67 ± 3,34*	10,43 ± 0,86*
	aval	22,73 ± 2,04*	73,41 ± 2,08*	9,17 ± 0,66*

Tableau 6: génotoxicité sur œufs de truite. Résultat des tests comètes. *: significativement différent de la valeur du témoin correspondant au seuil 5% (test *U* Mann-Whitney).

Il est à noter que le niveau d'endommagement moyen de l'ADN au niveau des stations intermédiaire et aval se situe à des valeurs proches de celles mesurées dans des globules rouges de poissons provenant de zones relativement contaminées d'autres cours d'eau français (Devaux *et al.*, 1998 ; Flammarion *et al.*, 2002).

Les fortes valeurs obtenues pour tous les tests comètes pratiqués dans les parties intermédiaire et aval permettent de supposer que l'accumulation dans les sols des herbicides, des fongicides et des pesticides utilisés sur la vigne est très importante et qu'il y a continuellement du relargage. Même la partie amont ne semble pas totalement indemne de contamination. Mais il est difficile d'estimer l'impact des produits de traitements de la vigne sur les stades embryolarvaires. En absence de crue,

¹⁵ Cette technique d'investigation à spectre large permet la prise en compte d'évènements génotoxiques variés (cassures simple et double brins, formation de sites alcali-labiles, réparation incomplète) susceptibles d'exister dans le cas de contaminations multiples comme sur le bassin de la Morcille

la survie des œufs est très bonne sur les trois tronçons. Cependant il faudrait étudier l'ensemble du cycle biologique, toutes les grandes fonctions physiologiques et les relations écologiques avec l'habitat et les proies pour établir des conclusions solides.

III-3/ Conclusions sur les impacts

Les différents indicateurs biologiques indiquent une évolution amont-aval de la diversité, et ce, à différents niveaux du réseau trophique. Les informations obtenues sont complémentaires et traduisent une dégradation de la qualité écologique de la Morcille: changement de structure des communautés, perte de biodiversité, impossibilité du maintien de populations piscicoles (sans que l'on puisse en hiérarchiser les causes, hydrologiques ou toxiques).

L'établissement de relations entre l'état écologique du système et l'occupation des sols permettent de considérer l'ensemble de l'écosystème bassin versant (figure 23). Plusieurs descripteurs sont susceptibles d'être utilisés et, d'évidence, il est difficile d'établir des relations de causalité simples car les effets écologiques *in situ* sont la résultante d'un système multifactoriel dans lequel les interactions, synergiques ou antagonistes, sont quasi systématiques.

Le choix de descripteurs globaux, à haut niveau d'intégration de l'information environnementale permet cependant d'établir les tendances fortes de l'évolution des écosystèmes et la mise en évidence de leurs principaux facteurs de forçage.

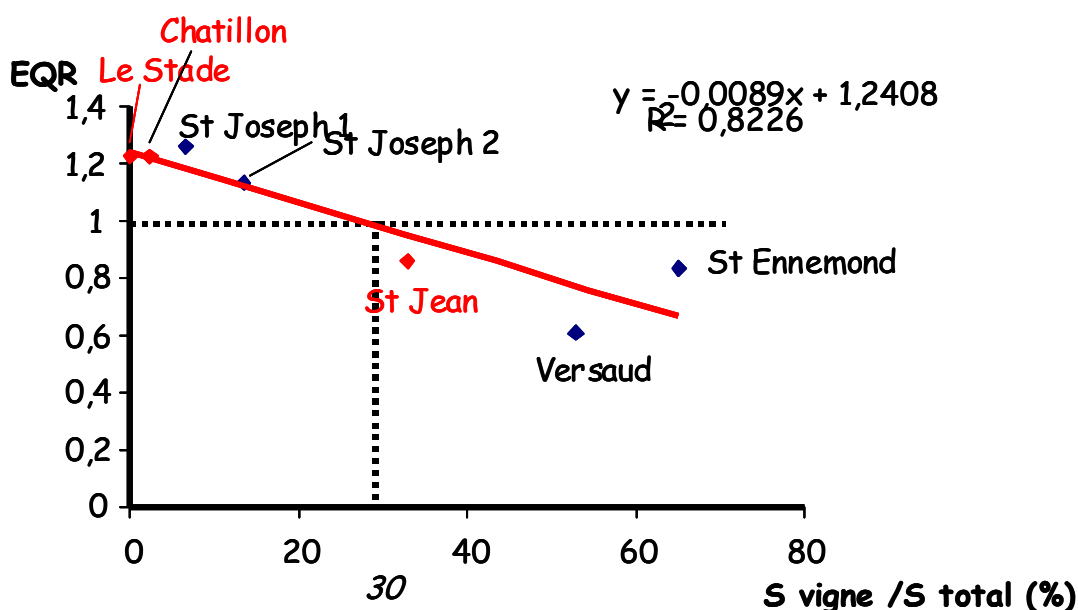


Figure 23 : Evolution de la qualité écologique de la Morcille (en noir) et de l'Ardières (en rouge) exprimé comme une fonction du pourcentage de surface en vignoble dans le bassin versant. Cette relation combine des données d'IBGN obtenues sur l'ensemble du Site Atelier Ardières - Morcille, normalisées pour tenir compte des spécificités régionales. Les valeurs inférieures à 1 correspondent à une dégradation de qualité par rapport à la valeur de référence régionale.

A titre d'exemple, l'indicateur EQR¹⁶ qui permet de relativiser la valeur de l'indice IBGN en le normalisant est en bonne relation avec un indicateur de l'occupation des sols typique de ce bassin versant, la surface de vignoble, ici exprimée en pourcentage de la surface totale du bassin versant (indicateur de pression) (figure 23). La valeur de 30% est bien sur indicative et ne préjuge pas des effets associés à d'autres causes de dégradation.

¹⁶ EQR : Ecological Quality Ratio: Ratio de qualité écologique. Exprime la qualité relative d'un milieu, basé sur un indicateur (ici les communautés d'invertébrés, traduite en IBGN) et exprimé par rapport à la qualité maximale de l'hydroécocorégion considérée.

IV/ Techniques et méthodes de dégradation des micropolluants :

Pour lutter contre les pollutions ponctuelles et réduire les concentrations résiduelles en polluants dans les milieux récepteurs, il est nécessaire de collecter les résidus des fonds de cuve ou les eaux de lavage du matériel pour leur assurer un traitement adéquat. Les agriculteurs auront l'obligation de recycler leurs fonds de cuve (JO 21/09/2006). Depuis quelques années, des industriels ont développé des systèmes de traitement des résidus vini et viticoles sur la base de techniques plus ou moins classiques (boues activées, traitement par ultra-violet,..) et qui peuvent être adaptés à des volumes restreints et à des durées ponctuelles.

Dans ce programme, des procédés biologiques et chimiques ont été étudiés, qui ont pour objectif final de dégrader des composés complexes, en particulier les phytosanitaires. Des applications ont été réalisées dans un premier temps sur une substance modèle (le Diuron) avec des techniques de laboratoire pour approfondir les connaissances sur les processus chimiques mis en œuvre (recherche des voies de dégradation et identification des produits intermédiaires - chapitres 4-1 et 4-2), puis dans un second temps, par un essai sur des effluents réels, à l'aide d'installations à taille réelle (chapitre 4-3).

Les travaux présentés ci-dessous ont permis de tester l'efficacité des Procédés d'Oxydation Avancés (POA) tels que l'Oxydation par Voie Humide Catalysée (OVHC), la Photocatalyse et la Sonolyse pour dégrader des phytosanitaires utilisés en viticulture.

IV - 1- Dégradation du Diuron par des procédés d'oxydation avancés

*** OVHC :**

Ce procédé consiste en l'oxydation des composés organiques solubles dans l'eau à température et pression élevées. Une série de réactions a lieu (production de radicaux, oxydation, décarboxylation, hydrolyse...) au sein du milieu et permet de dégrader les polluants en produits d'oxydation : les produits finaux sont le dioxyde de carbone et l'eau en passant souvent, de façon intermédiaire, par des acides carboxyliques réfractaires à chaîne courte. L'azote organique est minéralisé en NH_4^+ (N_2), le chlore organique est transformé en ions chlorures. L'emploi d'un catalyseur permet de réduire la pression et la température diminuant ainsi le coût énergétique du processus.

Le Diuron est instable thermiquement et est transformé en Dichloroaniline (DCA) et en Diméthylamine (DMA) (figure 24). En présence d'air, la DCA est oxydée, tandis que la DMA reste stable au cours du temps à 140°C. La DMA peut être oxydée à son tour si la température du milieu est plus élevée (180°C).

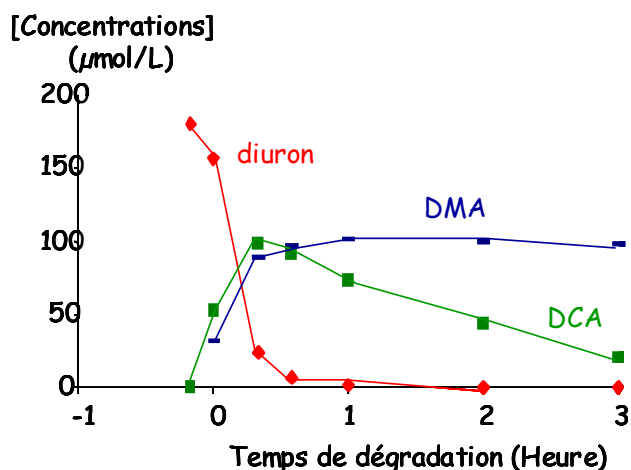


Figure 24: Dégradation du Diuron (40mg/L) sous air (50 bar) à 140°C en présence de 0,2 g/L de catalyseur 3%Ru/TiO₂.

A la suite de l'identification de certains sous-produits par LC-MS, différents chemins de dégradation ont été proposés (Figure 25). Le Diuron est décomposé thermiquement en DCA et DMA. La DCA subit une perte successive des atomes de chlore, des groupes méthyls ou encore l'attaque d'acides carboxyliques provenant de la dégradation du cycle, elle peut aussi être oxydée en 3,4-dichlorophénol, avant d'être totalement minéralisée.

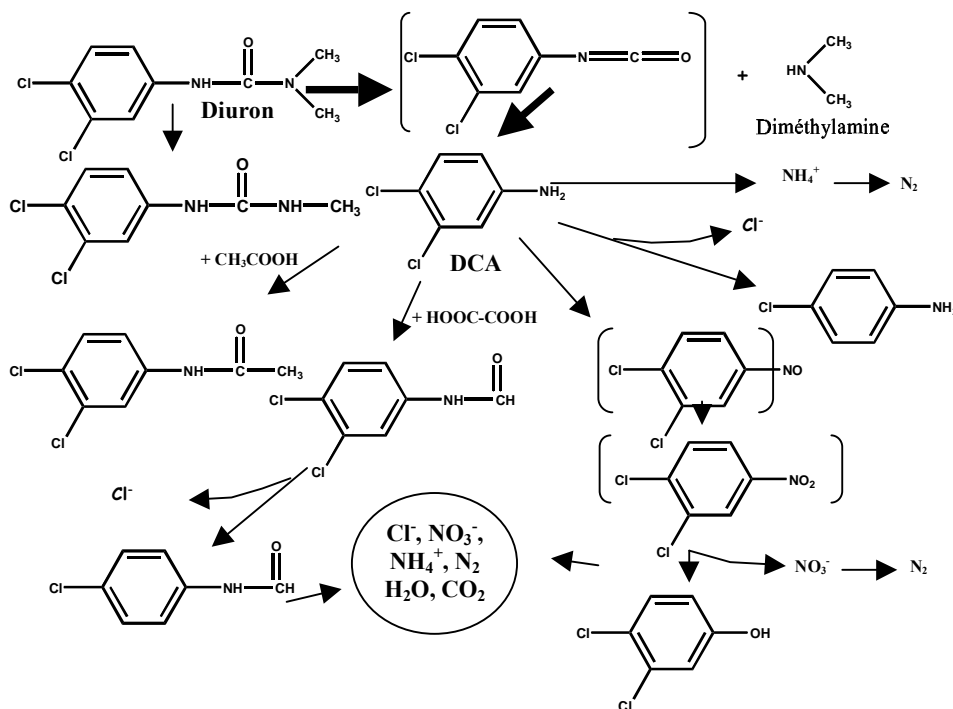
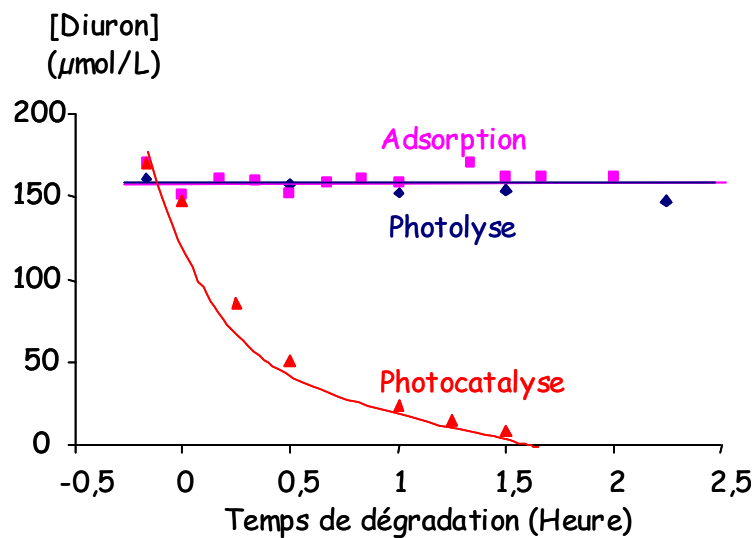


Figure 25 : Voies de dégradation du Diuron par OVHC à 140°C.

* Photocatalyse

L'excitation de l'oxyde de titane, par un rayonnement lumineux énergétique, forme des espèces actives dont les principales sont les radicaux hydroxyles HO° . Ces derniers, très oxydants, réagissent avec le polluant et conduisent, après des étapes successives d'adsorption et de dégradation, à la minéralisation totale en dioxyde de carbone et en eau. L'azote est en général transformé en NH_4^+ ou NO_3^- , à l'exception des groupes azoïques qui forment sélectivement N_2 .

L'irradiation de la solution de Diuron (40mg/L) en l'absence de catalyseur démontre que le phénomène de photolyse est ici négligeable (Figure 26). L'équilibre d'adsorption est atteint à partir de 30 minutes. En présence de TiO_2 Degussa P25, la disparition quasi-totale du Diuron est observée après 1h30.



Figures 26: (3a) Dégradation du Diuron par photocatalyse en présence de 0,6 g/L de catalyseur TiO_2

A l'exception de la présence de la Dichlorophénylméthylurée (DCPMU), seuls des composés hydroxylés sont mis en évidence, indiquant l'implication prépondérante des radicaux HO° dans le mécanisme de dégradation (Figure 27). Ces composés subissent aussi des déchloration successives.

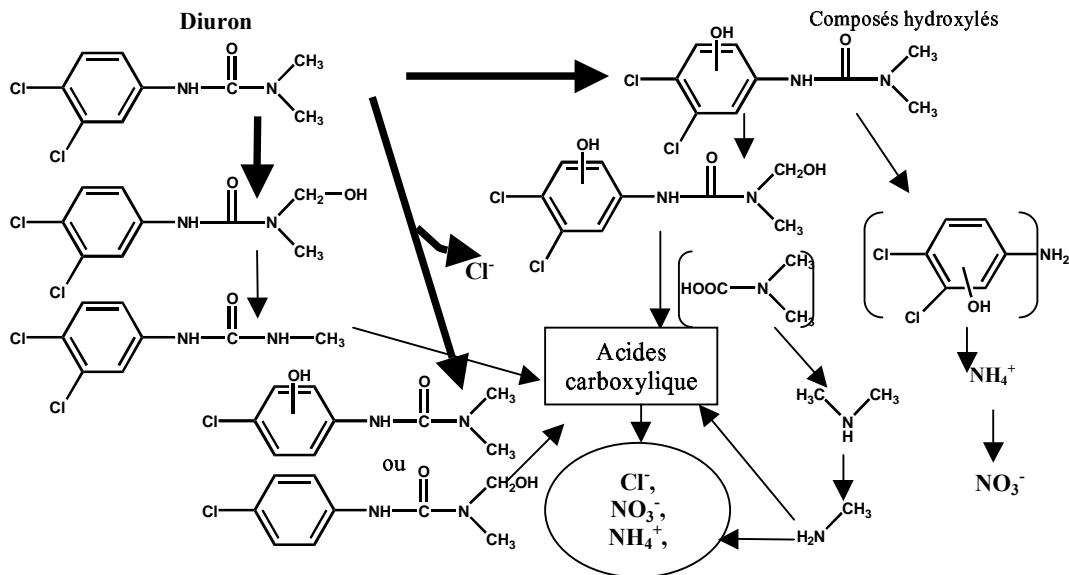


Figure 27: Voies de dégradation du Diuron en photocatalyse

*** Sonolyse :**

Si dans le domaine de la photochimie, la transformation de la matière est associée à des excitations moléculaires et atomiques qui résultent d'interactions directes entre l'onde électromagnétique lumineuse et les structures moléculaires et organiques, la chimie connectée aux ultrasons ne résulte pas d'une interaction directe entre l'onde acoustique propagée dans un milieu et la matière. Les activations chimiques observées sous ultrasons en milieu liquide sont principalement dues au phénomène de cavitation acoustique (formation et évolution dans un liquide de bulles de gaz et de vapeur). Techniquement, un volume de 500 mL de solution aqueuse de Diuron (40 mg/L) est soumis aux ultrasons d'une fréquence de 488 kHz et d'une puissance électrique incidente de 100 W ou de 50 W. Il n'y a pas d'agitation mécanique. L'homogénéisation de la solution étant assurée par les courants acoustiques induits par la force de radiation et par les micro-courants des bulles qui implosent. Le réacteur est thermostaté à la température de 30 °C afin de contrôler les effets thermiques.

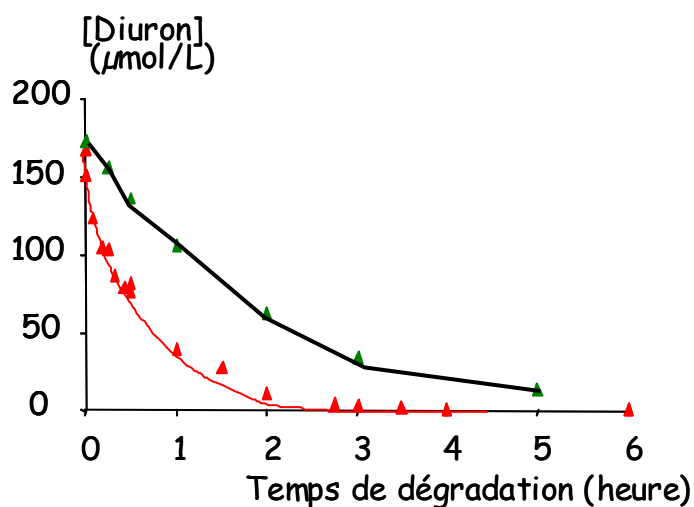


Figure 28: Dégradation du Diuron par sonolyse à 100 Watts (rouge) et 50 Watts (noir).

L'élimination du Diuron apparaît totale après 4 heures de traitement à 100 W (Figure 28). Le Diuron étant peu soluble et non volatil, son élimination pourrait résulter de la réaction avec les radicaux HO° dans la phase liquide à l'interface de la bulle. Une certaine destruction thermique toutefois très minoritaire n'est pas à exclure.

Le rendement de l'élimination dépend de la puissance appliquée. L'augmentation de puissance accroît l'importance de la cavitation : le nombre des bulles est plus élevé, la réaction est plus rapide à 100 W qu'à 50 W. La déchloration apparaît totale après 5 heures de réaction. Il est cependant difficile d'établir le bilan en azote. En effet, en présence d'air, contenant de l'azote et de l'oxygène moléculaire, la sonolyse de l'eau conduit à la formation d'acides nitreux et nitrique.

Les sous-produits primaires identifiés en début de sonolyse sont les produits hydroxylés. Une deuxième voie de dégradation minoritaire mène à la formation de DCPMU. Comme en photocatalyse, des produits issus de la coupure de la liaison C-Cl et des composés dihydroxylés ont été identifiés confirmant une fois de plus le rôle très oxydant des HO° (Figure 29).

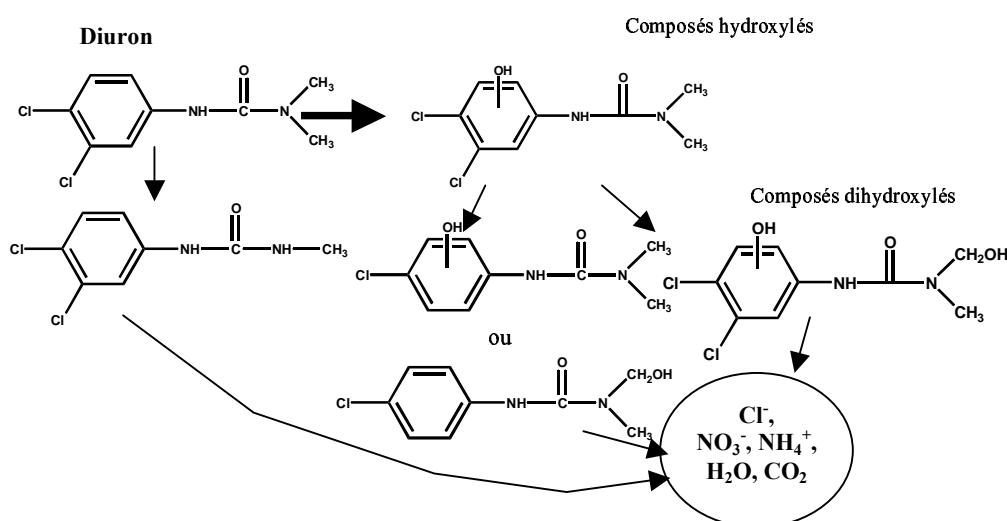


Figure 29: Voies de dégradation du Diuron en sonolyse.

* Minéralisation du carbone : comparaison des trois procédés.

Pour l'OVHC, au temps zéro, la totalité du carbone organique (COT) est encore en solution (mais le Diuron disparu s'est décomposé thermiquement en DCA et DMA). Le COT diminue ensuite progressivement avec l'oxydation de la DCA et atteint un plateau. Ce dernier est dû à la formation de DMA réfractaire à l'OVHC dans les conditions expérimentales utilisées, 140°C et 50 bar (Fig. 30). Pour une minéralisation plus complète, il est nécessaire de travailler à plus haute température (180°C). De même pour la sonolyse, le COT diminue lentement pour atteindre finalement un plateau

confirmant que des produits intermédiaires ne sont pas dégradés. Seule la photocatalyse permet la minéralisation totale du carbone.

Il faut souligner que, quel que soit le procédé, les conditions expérimentales n'ont pas nécessairement été optimisées. Dans cette étude l'objectif principal était de mieux comprendre les voies initiales de dégradation impliquées dans ces trois procédés.

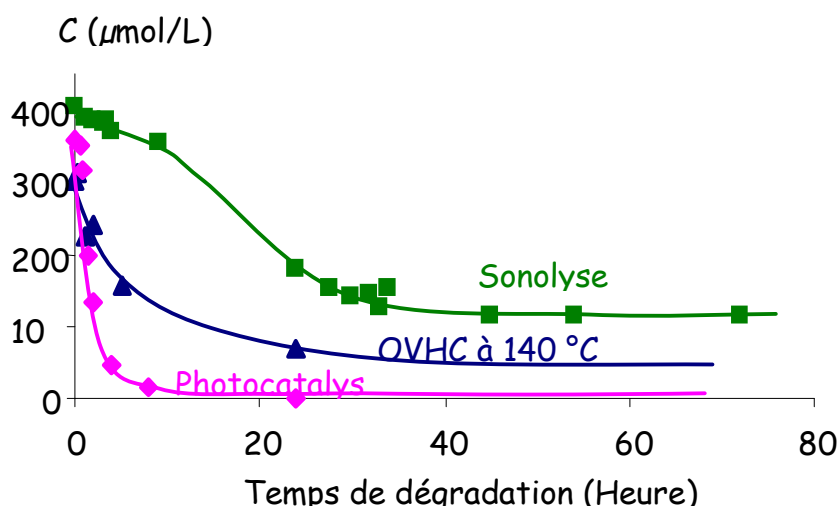


Figure 30: Minéralisation du Carbone Organique Total pour la photocatalyse, l'OVHC et la sonolyse.

* Evaluation de la réduction de toxicité

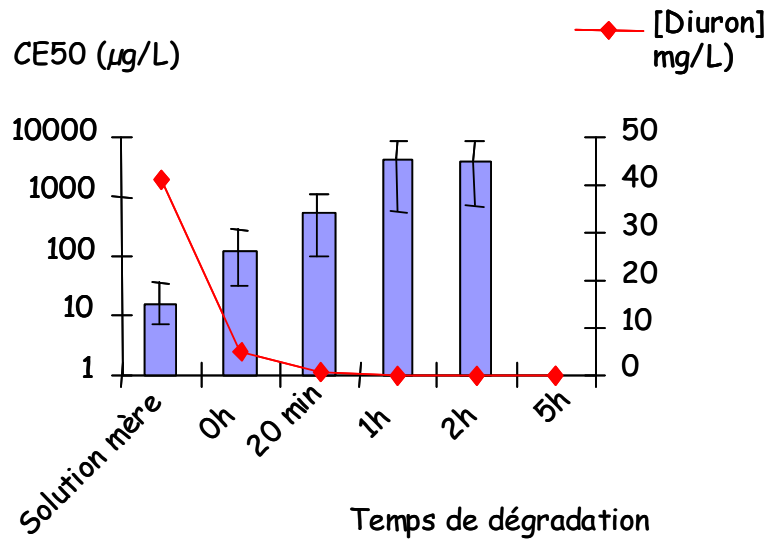
Sur les solutions de Diuron étudiés par les différentes techniques catalysées, des évaluations du niveau de toxicité en cours de dégradation ont été effectuées. Deux espèces ont été utilisées : l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* et le Rotifère *Brachionus calyciflorus*, qui sont à deux niveaux différents dans le réseau trophique aquatique. Les algues sont *a priori* sensibles aux herbicides (inhibition du système photosynthétique), alors que le Rotifère ne devrait pas l'être (tout au moins aux doses environnementales).

L'effet sur les *P. subcapitata* est évalué par un test de croissance 96h et sur les rotifères par un test de mortalité 48h.

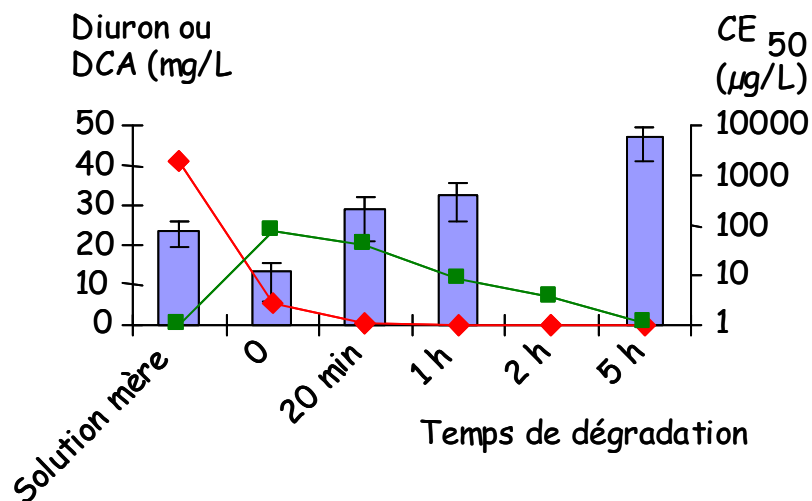
Lors de la dégradation, quel que soit le procédé testé, la toxicité décroît rapidement lorsqu'elle est mesurée avec les Algues. Inversement, le test Rotifère montre qu'il peut apparaître une toxicité liée aux sous produits de dégradation, par exemple la DCA dans le cas de la technique OVHC (figures 31 et 32),

Il est donc pertinent, pour des évaluations de substances, de disposer de batterie de biotests qui décrivent autant que faire se peut la diversité des organismes du milieu et de connaître les voies de dégradation des substances, pour identifier les sous produits responsables de la toxicité résiduelle lors de la dégradation.

Ces résultats n'ont cependant que peu de valeur prédictive sur les effets des formulations commerciales à base de Diuron, effets qui peuvent varier selon la nature chimique de ces formulations.



Figures 31: Evolution de la toxicité lors de la dégradation du Diuron par OVHC sur des microalgues .



Figures 32: Evolution de la toxicité lors de la dégradation du Diuron par OVHC sur Rotifères . En rouge (et losanges) le Diuron, en vert (et carrés) son produit de dégradation la DCA.

IV- 2 Dégradation par photolyse

L'objectif principal de cette contribution est de mesurer l'incidence de la présence de sels de cuivre (couramment utilisés en milieu viticole) sur la cinétique de photodégradation du pesticide. La photodégradation du Diuron a déjà été très étudiée (Nick & Schoeler, 1996 ; Okamaru, 2002; Canle Lopez et al., 2005) mais sans que l'incidence de la présence de sels de cuivre ait été abordée.

Dans cette optique, il est nécessaire de déterminer la ou les voies de photodégradation du Diuron et d'en caractériser les photoproduits. Les manipulations ont concerné l'irradiation de solutions aqueuses, d'une part de Diuron seul (10 mg/L), et d'autre part de Diuron en présence de sulfate de cuivre dont la molarité maximale est double de celle du Diuron (21 mg de sulfate de cuivre pentahydrate/ L, soit un rapport sulfate de cuivre/Diuron $R = 2$) et également en présence de chlorure cuivrique.

Ces premiers travaux (Figure 33) montrent que si le sulfate et le nitrate de Cu n'ont aucune influence sur la dégradation du Diuron, d'autres sels de cuivre (chlorures) montrent des effets plus marqués dus à la nature de l'anion qui ralentit la cinétique de dégradation du Diuron.

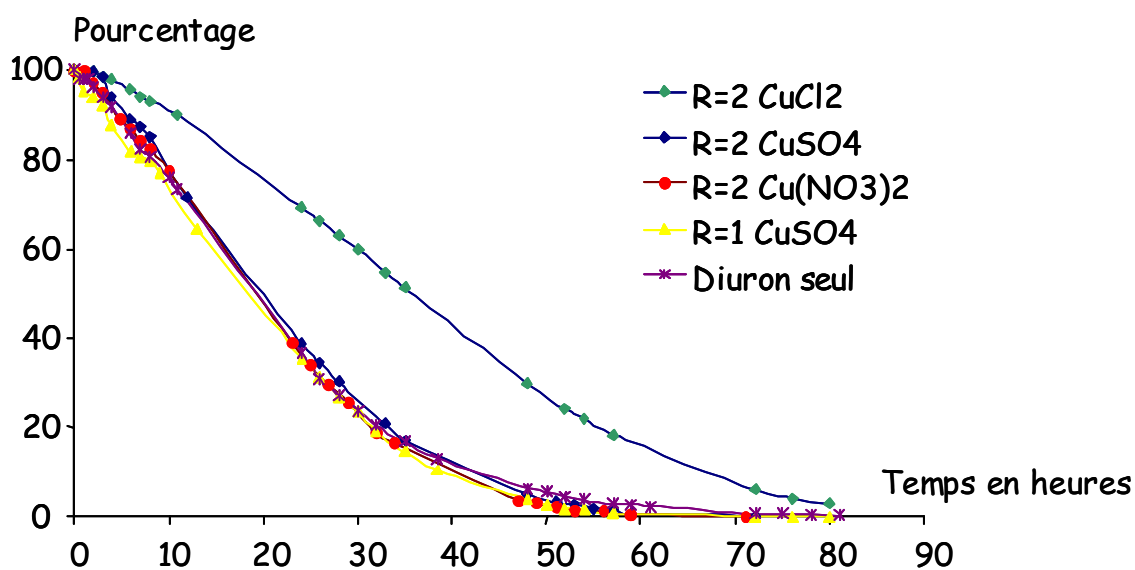


Figure 33: Cinétique de dégradation du Diuron à 20 °C, seul et en présence de sels.

D'autres facteurs interviennent sur cette cinétique: la température, qui accélère fortement la cinétique de dégradation (100% en 8h au lieu de 50h à 20 °C) et la lumière (en présence de lumière naturelle 5% de la solution de Diuron est dégradée en 100 heures contre 0% à l'obscurité).

Durant cette dégradation, l'analyse en chromatographie liquide indique l'existence de plusieurs photoproduits. Si on ne considère que les pics les plus importants, le nombre de photoproduits se réduit à 5 composés dont les temps de rétention sont de 3,7 - 4,5 - 8,0 - 11,1 et 27 min. Leur évolution est très différente en fonction du milieu : la présence ou l'absence de sel de cuivre fait varier les quantités de photoproduits présentes dans la solution. Par exemple, pour T 3,7 et T 4,5, c'est en absence de sel de cuivre que les plus grandes quantités de ces deux composés sont observées. La concentration en produit T 8 (Figure 34) augmente avec la présence de sulfate de cuivre.

Pour identifier les photoproduits, nous avons utilisé un couplage chromatographie liquide spectrométrie de masse après adaptation méthodologique (lyophilisation).

Le chromatogramme (figure 34) présente trois pics majeurs à T 11,1 - T 15,5 (Diuron) et T 27. Le pic à T11,1 correspond aux masses, en mode négatif, de 217, 219, 221 (Masse Molaire 218) et le pic T 27 aux masses de 245, 247, 249 (masse molaire 246). Le T 11,1 (M M 218) est une molécule issue d'une coupure du Diuron (MM 232) alors que le T 27 avec une masse de 246 est issu de l'oxydation du Diuron. Parmi les possibilités, T 11,1 est la DCPMU (3,4-dichlorophénylméthyl urée) ce qui a été vérifié puisque la molécule est commerciale. Pour T 27, la masse de 246 indique une différence de +14 par rapport au Diuron. La possibilité la plus vraisemblable serait une oxydation de l'un des deux groupes méthyles de l'urée en une fonction aldéhyde.

Actuellement, nous avons pu attribuer des masses molaires à bon nombre de pics observés. Des structures associées à ces masses molaires ont pu être élaborées. Cependant, compte tenu des isoméries de position ou de structure, l'identification précise des molécules est en cours.

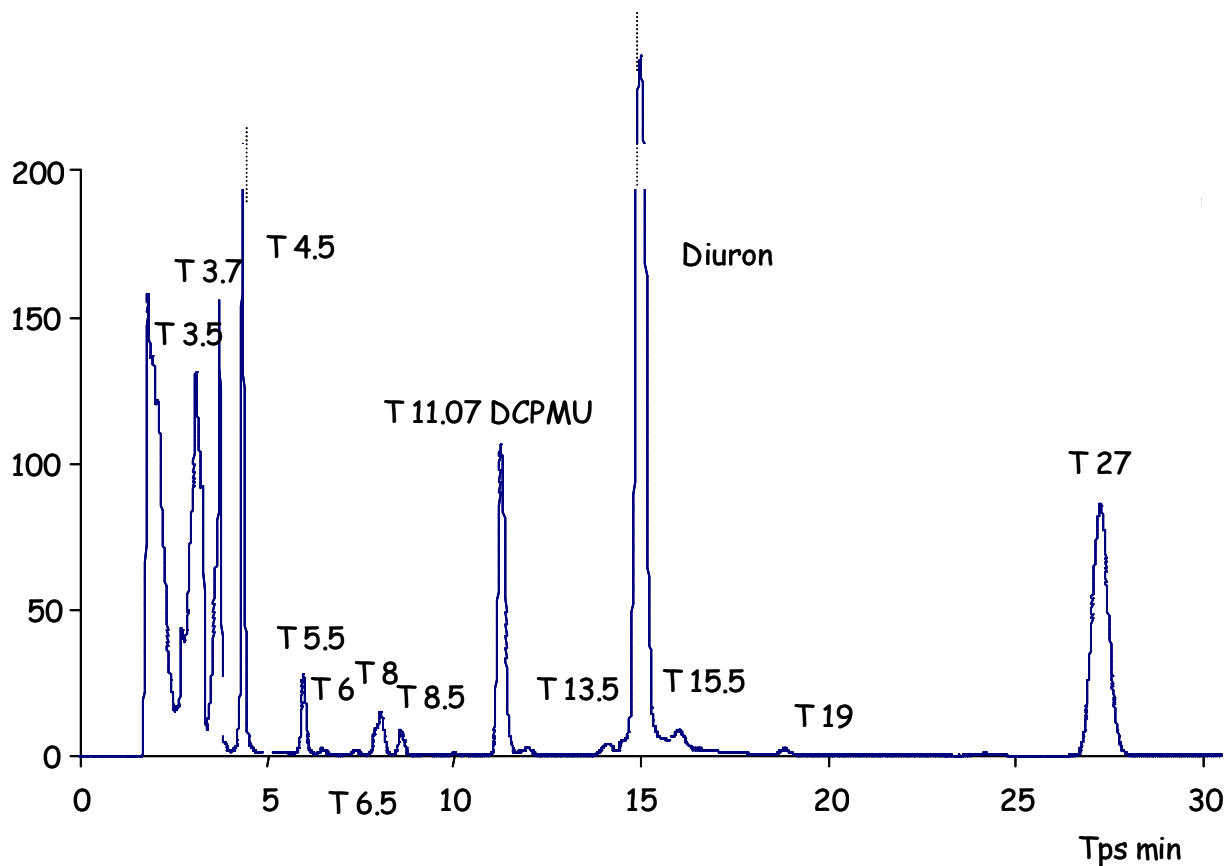


Figure 34: Chromatogramme d'une solution de diuron dégradée à 1 mg/L concentrée par lyophilisation.

Grâce à cet ensemble d'informations qui reste à compléter, nous avançons dans la compréhension des mécanismes de dégradation par photolyse du Diuron, de la DCMU et de leurs sous-produits permettant de proposer des schémas de dégradation (Figures 35 et 36).

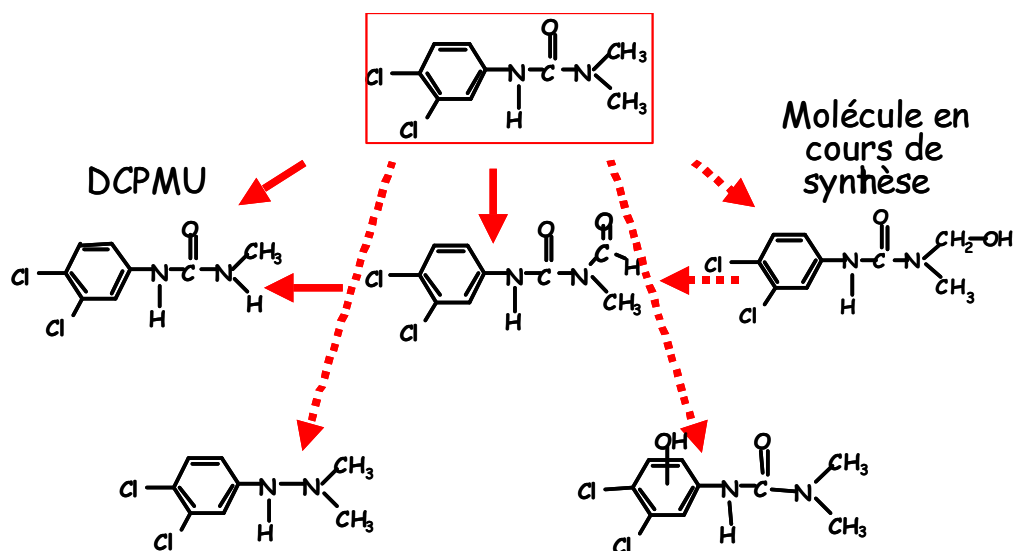


Figure 35: Schéma possible de dégradation par photolyse du Diuron.

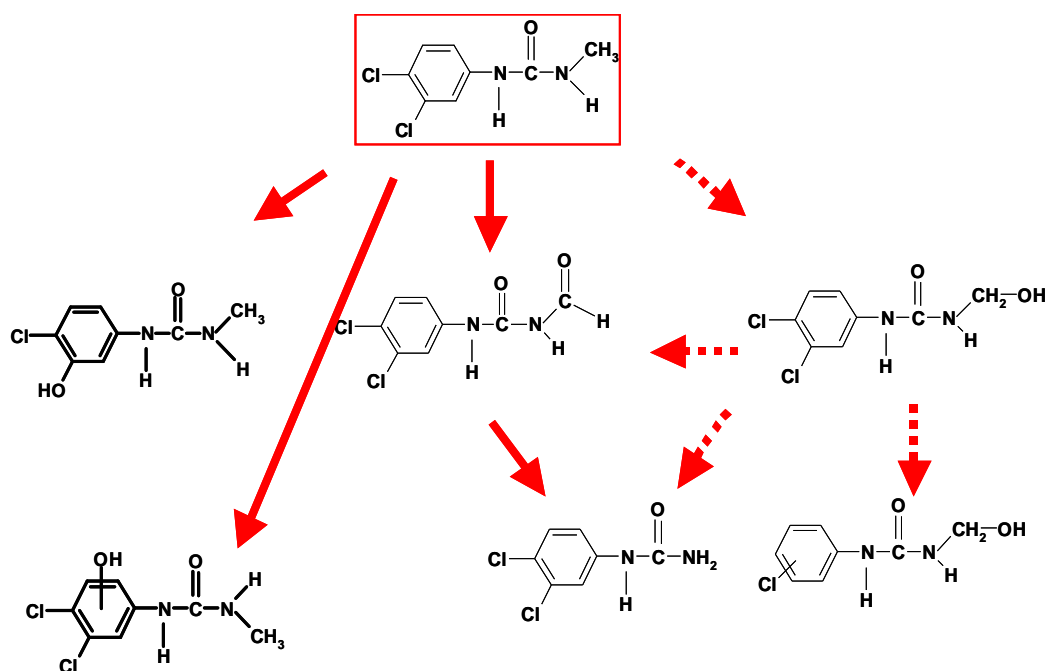


Figure 36 : Schéma possible de dégradation par photolyse de la DCMU.

IV- 3- Traitement « à la ferme »

Les essais de traitement de dégradation de résidus de traitement en mélange (rinçage de cuve, rinçage des matériels d'épandage) sont en cours de réalisation sur le site du Lycée viticole de Bel-Air. Ils ont pour objectif d'évaluer les performances de

deux techniques très différentes : un procédé biologique par boue activée (Aderbio), déjà opérationnel sur plusieurs installations en France, et un procédé physique mettant en œuvre des rayons ultra-violet (Résolution - Alsthrom) encore en phase d'évaluation (figure 37).

Ces essais utilisent le même effluent constitué par des résidus de fond de cuve de traitement, les eaux de rinçage du matériel d'épandage. Les performances des deux systèmes ont été évalués en suivant les prescriptions de fonctionnement fournis par les industriels, sur la base de descripteurs chimiques (DBO, DCO, azote,...) et complétés par des mesures de la toxicité en fin de traitement (Algues et Rotifères), ce qui permettra de faire le lien avec les essais de laboratoire (cf p 54).

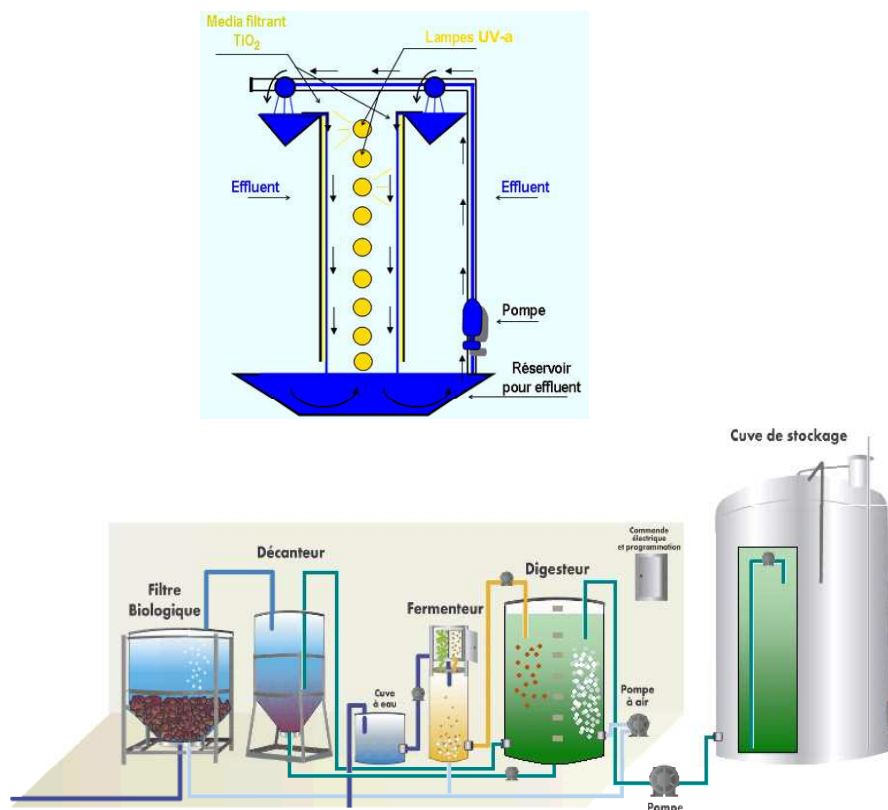


Figure 37 : Schéma des techniques testées pour la dégradation des résidus de phytosanitaires.

V/ Eléments de réponse pour la réduction d'intrants polluants et une amélioration de qualité du milieu aquatique.

V-1/ Données biologiques

Sur un plan expérimental, les résultats acquis ne permettent de tracer que quelques pistes. Les suivis biologiques suite à des opérations de translocation (prévus en année 3) n'ont pu aboutir suite à plusieurs épisodes successifs de crues puis d'étiages

sévères, ayant entraîné la perte des systèmes expérimentaux installés *in situ*. Sur le principe, il s'agissait de prélever des communautés microbiennes de l'épilithon à l'aval de la Morcille, pour les réimplanter à l'amont (St Joseph) de façon à simuler une situation de réduction d'intrants polluants. La caractérisation de la structure des communautés (diversité, abondance relative des populations constitutives) et de quelques unes de leurs fonctions, au cours du temps auraient pu permettre de suivre les cinétiques d'évolution. De nouveaux essais sont en cours depuis Septembre 2006.

Les données biologiques acquises sur les capacités de récupération reposent donc actuellement uniquement sur des essais en microcosme sur les communautés algales de l'épilithon (Villeneuve, 2005).

Des biofilms poussés en microcosmes¹⁷ ont été étudiés à 3 dates (T0, T4 et T15) et selon des scénarios de pollution différents :

- canal A : non pollué (canal de référence pour les essais).
- canal B : simulation de pollution accidentelle (apport du Diuron à 10 μ g/L après développement du biofilm en condition propre)
- canal C : simulation de pollution chronique (le biofilm se développe dès l'origine en présence du polluant à 1 μ g/L)
- canal D : simulation d'arrêt de contamination (un biofilm poussé en condition polluée (10 μ g/L) est remis à des conditions propres : arrêt de la pression de pollution).

Les biofilms ont été caractérisés par plusieurs descripteurs de structure, de diversité et d'activité. Parmi ces indicateurs, la biomasse (matière sèche sans cendre) et de la production primaire (assimilation du ¹⁴C) des biofilms de ces 4 canaux ont mis en évidence une évolution des biofilms dans les deux situations : contamination et restauration. Ils sont présentés ici sous forme d'un différentiel entre les différentes dates de suivi (figure 38).

Dans le canal B, subissant une contamination accidentelle, la biomasse diminue dès 4 jours d'exposition et cette baisse se maintient durant la durée de l'essai. L'activité photosynthétique est également fortement réduite et cette situation est identique à celle du biofilm poussé en milieu contaminé (canal C). Les effets d'une contamination de type accidentel sont donc rapidement équivalents (dès 4 jours d'exposition) à ceux d'une contamination chronique, ce qui témoigne de la sensibilité du périphyton aux résidus d'herbicides. A l'inverse, une situation de restauration de conditions environnementales propres, se traduit par une récupération des fonctions du biofilm (croissance, production primaire) après 15 jours : les descripteurs ont alors retrouvé des valeurs identiques à celle du canal de référence A.

¹⁷ canaux lotiques

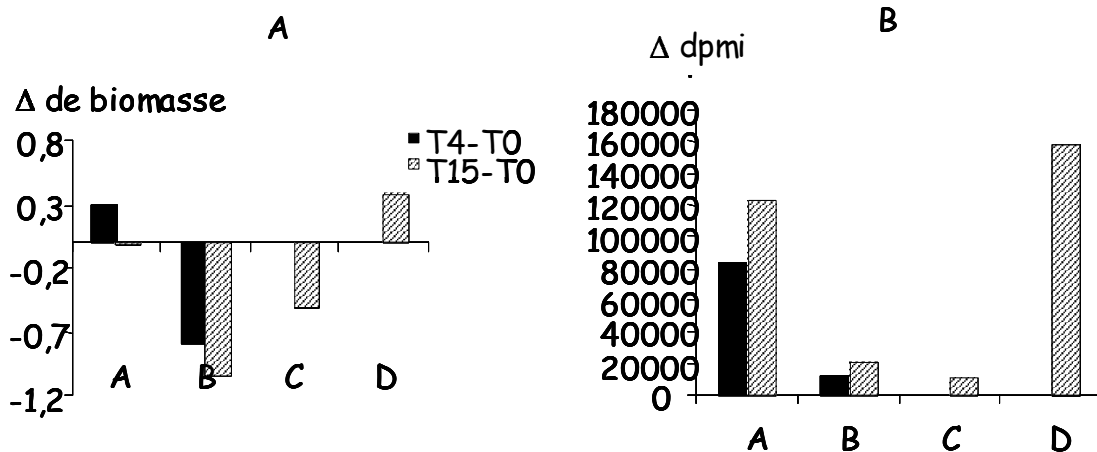


Figure 38: Récupération des biofilms soumis à différentes conditions d'exposition au Diuron (A : témoin ; B : contamination accidentelle, C : pollution chronique ; D : arrêt de pollution. Résultats : évolution de l'indicateur par rapport au T0.

A : évolution de la biomasse (en poids sec de biofilm) ; B : photosynthèse

Ces essais de laboratoire, tout à fait partiels, semblent indiquer une capacité de résilience marquée du biofilm, du moins après les conditions d'intoxication imposées ici (1µg/L de Diuron). Indépendamment de la durée de vie moyenne des biofilms aquatiques (de quelques jours à plusieurs semaines, selon les conditions hydrodynamiques du cours d'eau et le développement des communautés microbiennes du biofilm, Boulêtreau et al., 2006), il semble que le biofilm puisse être un intégrateur des changements rapides de conditions chimiques du milieu. Cette capacité pourrait se révéler intéressante pour suivre des fluctuations de concentrations en contaminants liées à des épisodes pluvieux, ou pour tester des hypothèses d'exposition : continues, séquencées, pics de pollution, ...¹⁸

Une nouvelle expérimentation de translocation au terrain est actuellement en cours de réalisation et les données ne seront disponibles qu'en fin d'année 2006.

V-2/ Approche de la remédiation *in situ* : éléments de réflexion et de perspective

Les principaux problèmes identifiés comme éléments de dégradation du milieu aquatique de ce petit bassin versant sont, d'une part, liés aux teneurs en éléments toxiques, métaux ou produits organiques phytosanitaires, résidus du traitement des vignes, et d'autre part liés à la conjonction du régime hydrologique et de la nature érosive du substratum, qui provoquent des crues très brutales avec des flux de MES très importants.

L'identification et l'évaluation de l'importance de ces facteurs reposent sur l'utilisation de mesures biologiques *in situ* et de bioessais complémentaires (diversité microbienne, invertébrés, survie embryolaire de truites).

Si l'on considère qu'un facteur important de mortalité des œufs de truite est un problème de MES en période de crue, la restauration d'une population de truite dans la

¹⁸ Ce type de question est abordé en 2006-2007, par un travail de Master 2, dans la suite de ces travaux.

Morcille assurant son propre recrutement (c'est à dire pérenne) nécessiterait en fait de réaménager les parties en pente du bassin versant pour limiter l'importance des crues et des flux de MES en diminuant le ruissellement sur les parcelles de vigne. La création des zones tampons permettant à l'eau de pluie de se stocker dans des marais pour diminuer l'importance des crues et des étiages semble difficilement réalisable, même si il existe déjà, le long de la Morcille de petits étangs, partiellement en connexion avec la Morcille. Ce problème de contrôle des crues est d'une façon générale, un problème complexe et général sur l'ensemble du Beaujolais¹⁹. Cependant, des études plus anciennes ont montré que, sur l'Ardières (dans laquelle se jette la Morcille), les populations autochtones de truites ont disparu après 1978, et ce nettement en amont de la confluence avec la Morcille, en lien avec l'intensification des traitements viticoles (SREA, 1987). L'hypothèse d'une conjonction des deux facteurs, crues et physico chimie de l'eau, expliquant la disparition des truites fario apparaît donc vraisemblable.

La réduction des impacts liés aux ruissellements des phytosanitaires est une voie d'amélioration de la qualité des eaux, à côté de sélection de produits, moins rémanents, avec une toxicité moindre. Dans l'idéal, la mise en oeuvre de pratiques culturales permettant de maintenir la pratique viticole, sa production qualitative et quantitative tout en limitant les conséquences environnementale serait un gain évident pour la qualité écologique de la rivière et sa valeur patrimoniale et touristique ;

On peut suggérer des mesures relativement simples et peu coûteuses, sans ou avec peu de conséquences sur les modes de production viticole de cette région :

- rendre effectives les bandes enherbées ou arborées qui existent en fond de vallée et forment un cordon rivulaire presque continu le long de la Morcille. Pour cela, une solution serait la reprise des drains et fossés qui débouchent directement sur le cours d'eau en les faisant déboucher à l'amont des bandes enherbées pour favoriser au maximum l'infiltration de l'eau de ruissellement issues des parcelles de vigne avant que celle ci rejoigne la Morcille.

- L'aménagement des zones de rives effondrées ou creusées par les crues, en y plantant des fascines boisées permettrait de consolider les berges, de recréer des habitats diversifiés , tout en permettant la repousse de végétaux arborés.

- Le maintien d'une mosaïque de « paysages aquatiques » (succession de mouilles et de radiers, qui permettrait de maintenir une diversité biologique accrue mieux à même de garantir une stabilité à ce système écologique (sous réserve quand même d'une certaine réduction de la pollution toxique). Certains petits étangs creusés le long de la Morcille pourrait être plus nettement reconnectés avec la Morcille.

D'autres mesures ont un coût certain, mais sont pour certaines rendues obligatoires par la réglementation ou par l'évolution économique régionale:

- la mise en place de la collecte des résidus de traitement et de lavages des cuves ou du matériel agricole, avec installation de station de traitement regroupant plusieurs producteurs (décret en vigueur).

¹⁹ Son corollaire est également la perte de terres arables voire de pans de vignobles arrachés lors des orages. Certains vigneronns récupèrent d'ailleurs les dépôts de sols entraîné en bas des parcelles pour les réintroduire sur le haut des parcelles de vignes.

- la déprise viticole et l'arrachage de certaines parcelles de vignes, l'extensification de la viticulture sur certaines parcelles, par exemple, avec un enherbement dans l'inter rang, qui permet de surcroît de recréer de la biodiversité en milieu terrestre, sont des facteurs qui conduiront à une réduction des tonnages de substances actives utilisées sur le bassin versant et donc à la réduction des excédents lessivés vers les milieux aquatiques.

Au final, et compte tenu de la faible longueur de la Morcille et son régime hydraulique, il est hors de question de considérer une quelconque capacité d'autoépuration du système permettant de réduire les charges en composés chimiques avant la confluence avec l'Ardières, puis de la Saône. La Morcille, comme tout les petits cours d'eau, est exportatrice de contaminants vers l'aval : l'Ardières, puis la Saône. Ceci est montré par les analyses chimiques réalisées à St Jean D'Ardières (point du Réseau National de Bassins). Il est très vraisemblable que l'ensemble des petits bassin versants viticoles du Beaujolais et, plus au nord, du Mâconnais et de Bourgogne, et dont l'exutoire est la Saône, aient également une dynamique exportatrice de résidus de phytosanitaires.

VI/ Conclusions :

Ce programme a permis d'acquérir des résultats en terme de connaissances « théoriques » et de connaissances « appliquées ».

Si on replace ces résultats dans le cadre du schéma DPSIR, chacun des compartiments de ce modèle a été renseigné et les éléments acquis concourent, à leur niveau, à une meilleure appréhension du fonctionnement du système bassin versant (figure 39).

En ce qui concerne l'état écologique du cours d'eau drainant le bassin versant, les différents descripteurs ont indiqués de manière complémentaire les effets associés aux matières organiques, aux nutriments et aux toxiques : perte de diversité, modifications des fonctions microbiennes impliquées dans le fonctionnement écologique du cours d'eau. Ces données, complétées par les suivis de qualité chimique, sont, pour l'essentiel, explicables par l'organisation du bassin versant: structure géologique, occupation des sols, organisation des parcelles en culture, habitat dispersé non raccordé,...

Cette étude semble également confirmer que les stades embryolarvaires de salmonidés sont de bons organismes sentinelles pour évaluer la qualité des petits cours d'eau et pour mettre en évidence les conséquences biologiques des pollutions ou de phénomènes hydrauliques marqués (crues, fort charriage de MES), comme cela avait été observé préalablement en Haute-Savoie (par association des deux descripteurs, le taux de survie et la génotoxicité) (AQUAE, 2004).

Enfin, concernant les problèmes associés aux résidus de produits phytosanitaires, les techniques de dégradation mises en œuvre dans ce projet étaient surtout abordées à un niveau d'essais de laboratoire. Ces travaux ont permis de mieux comprendre les schémas réactionnels de la dégradation d'un phytosanitaire, les cinétiques et les rendements de dégradation, les formations de sous-produits et leur identification. Les essais en grandeur réelle de traitement de résidus phytosanitaires (formulations

commerciales, mélanges) ont permis de compléter ces informations en disposant de données sur la faisabilité technique et la performance du traitement « à la ferme ».

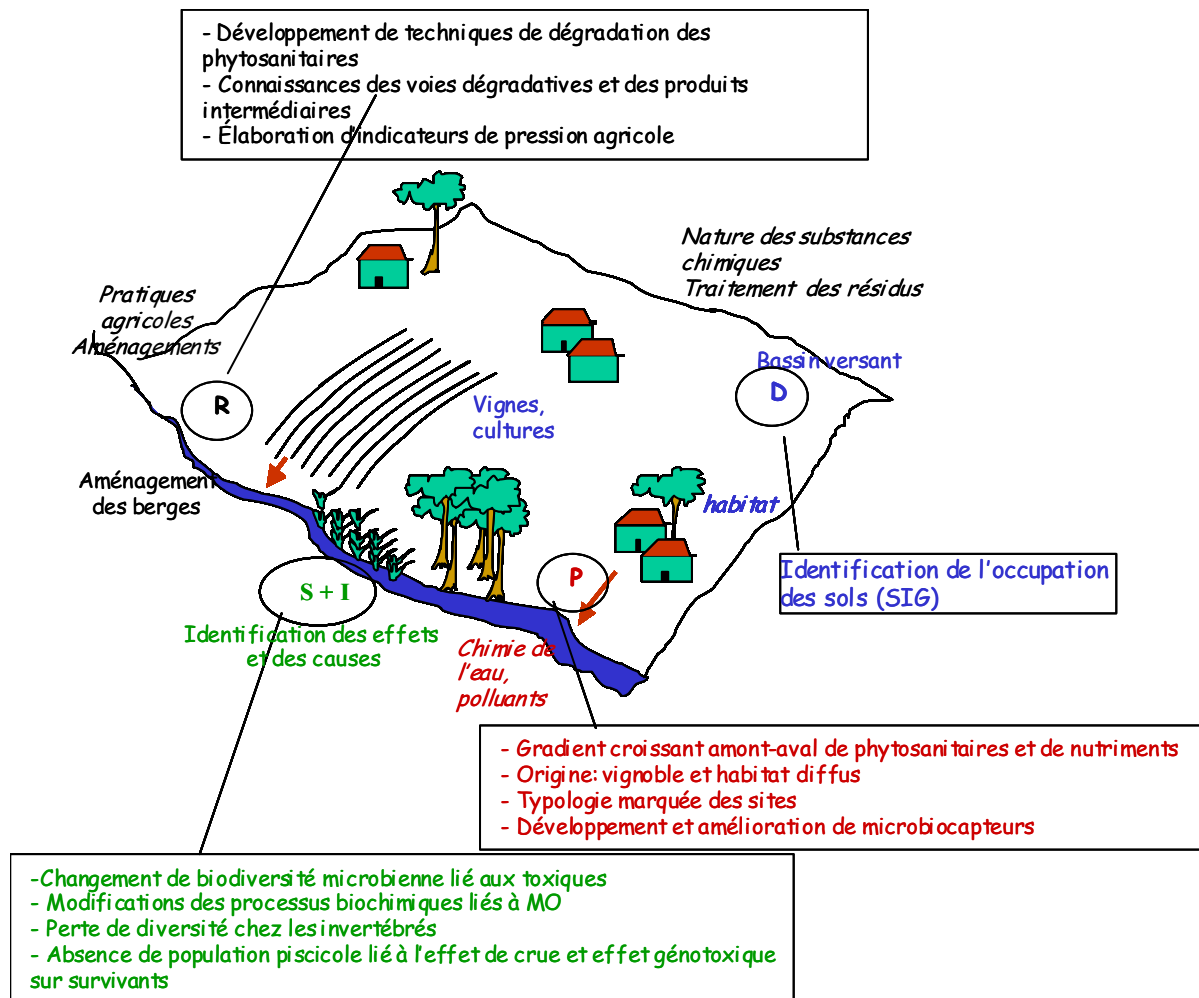


Figure 39: Eléments acquis par ce programme de recherche. Chaque couleur symbolise un des éléments de la démarche DPSIR.

En terme de perspective, les résultats acquis orientent les travaux futurs (à un moyen terme de 2-3 ans environ) selon plusieurs axes :

- métaux et biodisponibilité : les charges en éléments métalliques au sein des sédiments de la Morcille, y compris sur le site amont, et particulièrement en Cu et en As, sont susceptibles de générer des effets. Les mécanismes physico-chimiques susceptibles de moduler leur toxicité sont des éléments importants pour comprendre le rôle des contaminants métalliques dans la qualité biologique des organismes benthiques en particulier.

- un approfondissement de la connaissance du rôle du paysage sur les flux d'eau et de polluants dans un bassin versant : le déterminisme des flux polluants est particulièrement influencé par les réseaux de fossés, de drains, de voies de circulation...

Une connaissance approfondie de ces mécanismes et une modélisation des flux, du niveau parcellaire jusqu'à l'échelle du bassin versant, est une étape indispensable pour proposer un mode de gestion optimale de ces flux.

- l'étude du poids respectif des facteurs exogènes et endogènes au cours d'eau dans la partition (eau, MES, sédiment) et le transfert des contaminants vers l'aval. L'évaluation des variations d'exposition des organismes (en intensité, en durée, en fréquence) en relation avec les variations des flux, permettra de caractériser les effets des expositions aiguës (crue, forte concentration, courte durée) et des expositions chroniques (étiage, faible concentration, longue durée).

- la difficulté de réaliser des opérations de remédiation à l'échelle du bassin versant, rend nécessaire la poursuite des expérimentations de translocations, complétés par des essais de laboratoire.

Concrètement, ces perspectives trouveront, au moins partiellement un début de réponses, dans le cadre des nouveaux programmes de recherche qui seront réalisés sur le site: Ecoger (Papier - 2005-2008), Ecco (Padya - 2006-2009), Accéléra (bilan STEP) , ANR Biodiversité (InBioProcess - 2007- 2010).

A plus long terme (5 ans), il est envisageable :

- dans le cadre du Site Atelier Ardières Morcille, d'élargir les études vers les systèmes terrestres et les aspects socioéconomiques (en particulier dans le contexte de déprise agricole et d'arrachage de vigne),
- d'élargir ces approches sur l'ensemble du bassin versant Ardières- Morcille et, au delà, d'en faire un modèle d'étude pour l'ensemble de la façade ouest de la Saône.

VII - Références

- AFNOR, 1993, Indice biologique global normalisé IBGN, guide technique, NF T 90-350, Min de l'environnement, CSP, Agences de l'Eau, 69p.
- AQUAE, 2004, Bassin versant et qualité biologique des cours d'eau : Effet de la gestion des bassins versants sur les transferts particuliers et dissous et sur la qualité biologique des eaux de surface en zone d'élevage, J.M. Dorioz et D. Ombredane (Eds), Rapport de fin d'étude INRA-Cemagref, 51p.
- Bacher A., 2005, Réponses de communautés d'invertébrés benthiques d'un cours d'eau du Beaujolais à un gradient de contamination par les pesticides. Rapport de Master 2, Université de Franche Comté - Cemagref Lyon, 35p.
- Bas P-E, 2005, Nitrification et dénitrification en sédiment, BTS Anabiotec, 32p
- Boulêtreau S., Garabetian F., Sauvage S., Sanchez-Perez JM, 2006, Assessing the importance of self-generated detachment process in river biofilms models, *Freshwater Biology*, 51, 901-912.
- Canle Lopez M., Fernandez MI., Rodriguez S., Santaballa JA., Steeken S., Vulliet E., 2005, Mechanisms of direct and TiO₂ photocatalysed UV degradation of phenylurea herbicides. *Chem. Phys. Chem.* 6: 1-11
- Corcoll-Cornet N., 2006, Réponse de processus microbiens sédimentaires à un gradient de pollution en rivière , Master 2 Recherche INSA Lyon, 42p.

- Devaux A, Flammarion P, Bernardon V, 1998, Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P450 1A induction in chub (*Leuciscus cephalus*), *Marine Environmental Research*, 46 (1-5): 257-262.
- Durrieu C., Chouteau C., Barthet L., Chovelon J.M. & Tran-Minh C., 2004, A bi-enzymatic whole-cell algal biosensor for monitoring pollution of freshwater ecosystems, *Analytical Letters*, 37, 1589-99
- Escot G., 2005. Contribution à l'évaluation des potentialités de transfert des phytosanitaires vers les eaux de surface sur un petit bassin fortement anthropisé, à travers l'intégration de l'ensemble des voies de circulation superficielles d'origine anthropique (fossés, chemins, buses) au sein du Système d'Information Géographique existant. Master 1^{er} année « Aménagement, option gestion des risques dans les collectivités territoriales », Université Jean Moulin-Cemagref Lyon,
- Flammarion P, Devaux A, Nehls S, 2002, Multiobiomarker responses in fish from the Moselle river (France), *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51 (2): 145-153
- Friberg N., Lindstrøm M., Kronvang B. & Larsen S.E., 2003. Macro-invertebrate/sediment relationships along a pesticide gradient in Danish streams. *Hydrobiologia*, 494, 103-110.
- Gouy V., Nivon C, 2005, Protection des Eaux en Beaujolais, Caractérisation et suivi de la qualité de l'eau sur la bassin versant de la Morcille sur la période 2001-mi 2005, Rapport technique, Cemagref - Chambre d'Agriculture du Rhône - Agence de l'Eau RMC, 59p
- Hassani K., 2005, Effet de mélanges phytosanitaires sur les communautés microbiennes aquatiques, Master 2 recherche INSA Lyon.
- IFEN, 2005, L'utilisation de Corine Land Cover 2000, Institut Français de l'Environnement, 15p.
- INRA, 2006, Agritox : base de données sur les substances actives phyto - pharmaceutiques , <http://www.inra.fr/agritox>.
- Leonard A.W., Hyne R.V., Lim R.P., Pablo F., Van den Brink P.J., 2000. Riverine endosulfan concentrations in the Namoi River, Australia: link to cotton field runoff and macroinvertebrate population densities. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1540-1551.
- Lévêque C., Muxart T., Abbadie L., Weill A., van der Leeuw S., 2003, L'anthroposystème : entité structurelle et fonctionnelle des interactions sociétés-milieus, in « *Quelles natures voulons-nous ?* », Elsevier, pp 110-129
- Liess M., Schulz R., Liess M. H.-D., Rother B., Kreuzig R., 1999. Determination of insecticide contaminations in agricultural headwater streams. *Wat. Res.* 33, 239-247.
- Marsilli-Libelli S., Betti F., Cavalieri S, 2003, Introducing river modelling in the implementation of DPSIR scheme of the Water Framework Directive,
- MEDD & Agence de l'Eau, 1999. Système d'évaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau. Grille d'évaluation SEQ-Bio (version 0). Agence de l'Eau.
- MEDD, Agence de l'Eau, 2003, Système d'évaluation de la qualité des cours d'eau, Grille d'évaluation , version 2, 40p
- Montuelle B., Leboulanger C., Lefranc M., Humbert J-F, Bouchez A., Boisson JC., 2005, Evaluation de la toxicité de phytosanitaires sur la composition et la diversité de biofilms périphytiques, Actes du 1^{er} Colloque ECCO, Toulouse, 5-7 Décembre, pp 55-60.
- Neumann M., Liess M., Schulz R., 2003. An expert system to estimate the pesticides contamination of small streams using benthic macroinvertebrates as bioindicators. *Ecological Indicators* 2 379-401.
- Neumann M.,, Dudgeon D., 2002. The impact of agricultural runoff on stream benthos in Hong Kong, China. *Water Research* 36:3103-3109.
- Nick K, Schoeler, H. 1996, Photochemical degradation of herbicides in water by UV-radiation generated by low-pressure arcs. *Vom Wasser*, 86: 57-72.

- Nogaro G., Mermillod-Blondin F., Montuelle B., Boisson JC, Bedell JP, Ohannessian A, Volat B. , Gibert J., Influence of a stormwater particle deposit on microbial and biogeochemical processes in infiltration porous media, *Environmental Pollution*, soumis.
- Observatoire des Données de l'Environnement, 2000, Structuration de l'information environnementale: le modèle DPSIR et son adaptation au milieu urbain. Approche méthodologique et application à la Région Bruxelles-Capitale, Rapport technique IBGE, 24p.
- Okamaru H., 2002, Photodegradation of the antifouling compounds Irgarol 1051 and diuron released from a commercial antifouling paint. *Chemosphere*, 48: 43-50.
- Petat B., 2004. Contribution à l'évaluation de la pression polluante liée aux pollutions diffuses au sein d'un petit bassin versant viticole (Beaujolais) et impacts correspondants sur la qualité des eaux de surface. DESS Ingénierie des Hydrosystèmes Continentaux en Europe, Université François Rabelais, Tours - Cemagref Lyon.
- Probst M., Berenzen N., Lentzen-Godding A., Schulz R., Liess M., 2005. Linking land use variables and invertebrate taxon richness in small and medium-sized agricultural streams on a landscape level. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60:140-146.
- SSM, 2004, Evaluation du risque environnemental des produits phytosanitaires, Rapport de la Commission d'Etude de la Toxicité des produits antiparasites à usage agricole et des produits assimilés, Révision 6-5, 145p.
- SRAE, 1987, Bilan sur l'évolution de la qualité d'une rivière beaujolaise : l'Ardières, affluent de la Saône (Rhône), SRAE Rhône-Alpes, Août 87, JFP/RMB, 52p.
- Thiere G., Schulz R., 2004. Runoff-related agricultural impact in relation to macro-invertebrate communities of the Lourens River, South Africa. *Water Research* 38:3092-3102.
- Villeneuve A., 2005, Rôle de la biodiversité dans la résistance et la résilience de communautés microbiennes expérimentales soumises à des perturbations par un herbicide, Master 2 Biodiversité et Fonctionnement des Ecosystèmes , Université Blaise Pascal - INRA Thonon, 43p.
- Virtual Centre, 2006, Modèle pression-Etat-Réponse et indicateurs environnementaux, <http://www.virtualcentre.org/fr/dec/toolbox>, 8p.
- Xuejiang W., 2005, Development of conductometric biosensors for environmental monitoring, Rapport de stage de post doctorat, Université Claude Bernard - CNRS (LACE), Ref 0402051901/E048185616/WAN010, 29p.

Annexe 1:
Situation géographique du Site Atelier Ardières- Morcille et localisation des points
d'échantillonnage.

