

Appel à Propositions de Recherche 2006
du Ministère de l'Écologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement

Programme de Recherche : EMERITAT

Utilisation de modèles d'exposition aux pesticides pour la reconstitution
et la mise en œuvre de scénarios réalistes de contamination de mésocosmes
permettant d'étudier les impacts d'itinéraires techniques
sur les organismes aquatiques

Rapport final

Avril 2011

Coordinateur : Laurent LAGADIC
INRA, Rennes
UMR 985 *Écologie et Santé des Écosystèmes*
Équipe Écotoxicologie et Qualité des Milieux aquatiques

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)
Centre de Recherches de Rennes



Bureau de Recherches
Géologiques et Minières



Arvalis
Institut du Végétal





A. RÉCAPITULATIF DU PROGRAMME

Titre du programme :

Utilisation de modèles d'exposition aux pesticides pour la reconstitution et la mise en œuvre de scénarios réalistes de contamination de mésocosmes permettant d'étudier les impacts d'itinéraires techniques sur les organismes aquatiques.

Acronyme : EMERITAT (Étude Modélisation-Exposition-Risque d'Itinéraires Techniques en milieu AquaTique)

Mots-clés : Modèles d'exposition / Mélange de pesticides / Multiexposition / Itinéraires techniques / Effets écotoxicologiques / Bioessais *ex situ* / Mésocosmes aquatiques

Volet(s) et thème(s) de l'APR concerné(s) :

- Volet 1.2 'Amélioration des procédures d'évaluation des risques a priori',
 - item "comparaison des prévisions des scénarios et modèles mis en oeuvre dans le cadre de l'évaluation a priori avec des observations réelles en vue de la validation ou de l'amélioration des outils de l'évaluation des risques" ;
- Volet 1.3 'Caractérisation des effets des pesticides sur les écosystèmes',
 - item "amélioration de la caractérisation des termes d'exposition des organismes non-cibles et mise en relation avec des effets biologiques à différents niveaux d'organisation".

Coordinateur scientifique :

Laurent LAGADIC
Docteur en Sciences, HDR
Directeur de Recherche (DR2)

UMR 985 INRA-Agrocampus Ouest Écologie et Santé des Écosystèmes (ESE)

Équipe Écotoxicologie et Qualité des Milieux aquatiques
65 rue de Saint-Brieuc – CS 84215 – 35042 Rennes cedex

Tél. : 02.23.48.52.37 – Fax : 02.23.48.54.40 – E-mail : Laurent.Lagadic@rennes.inra.fr

Organismes partenaires :

INRA

Équipe Écotoxicologie et Qualité des Milieux aquatiques
Arnaud Auber, Thierry Caquet, Marie-Agnès Coutellec, Virginie Ducrot, Caroline Gorzerino, Micheline Heydorff, Laurent Lagadic, Marc Roucaute
UMR 985 INRA-Agrocampus Ouest Écologie et Santé des Écosystèmes
65 rue de Saint-Brieuc - CS 84215 - 35042 Rennes cedex
Unité Expérimentale Écologie et Écotoxicologie Aquatique (U3E)
Didier Azam, Alphonse Quemeneur, Martine Ollitrault
65, rue de Saint Brieuc - 35042 Rennes cedex

ARVALIS - Institut du Végétal

Benoît Réal
2 Chaussée Brunehaut - Estrées Mons - BP 70156 - 80203 Péronne Cedex

BRGM

Igor Dubus, Nicolas Surdyk, Anne Togola*
Avenue C. Guillemin - BP 36009 - 45060 Orléans Cedex 2
*Adresse actuelle : FOOTWAYS S.A.S. - 10 avenue Buffon - 45071 Orléans Cedex 2

Durée du programme de recherche : 36 mois

Résumé court

Objectif

Le programme EMERITAT avait pour objectif l'évaluation des risques des produits phytosanitaires sur des organismes aquatiques, dans une démarche de mise en relation entre transferts, exposition et effets. L'étude a pris en compte à la fois la diversité des substances actives et les périodes d'application de l'intégralité des pesticides entrant dans les itinéraires techniques (ITK) préconisés pour la lutte contre les bioagresseurs lors d'une rotation triennale pois/blé/colza.

Principaux résultats

L'ensemble des résultats obtenus a permis de comparer différents scénarios réalistes d'exposition des eaux de surface, représentatifs des systèmes drainés français, selon que la conduite culturale fait appel à des ITK "classiques" ou "bas intrants pesticides".

En termes de transferts, les modèles ont montré que la dérive était la voie majeure de contamination des milieux aquatiques. Ruissellement et drainage ont néanmoins une contribution non négligeable pour des substances appliquées en automne. En ce qui concerne les impacts, l'étude réalisée en mésocosmes pendant deux ans, a montré que :

- (i) les effets directs sur le phytoplancton et le périphyton ont été peu marqués, sans doute du fait de la saison à laquelle ont eu lieu les apports les plus importants en herbicides (automne) ;
- (ii) les deux types d'ITK ont été l'origine d'effets significatifs, bien que décalés dans le temps, sur la structure des communautés d'invertébrés (zooplancton et macroinvertébrés benthiques) et sur un processus fonctionnel (fragmentation de la litière). Ces effets sont à mettre en relation avec l'exposition aux insecticides pyréthrinoïdes et, dans le cas de l'ITK "bas intrants pesticides", au cyprodinil.

Acquis en termes de transfert

Ce programme a mis en évidence l'intérêt du couplage entre modélisation des transferts de pesticides et étude expérimentale des effets écotoxicologiques pour l'évaluation environnementale des pratiques de protection des cultures. De ce point de vue, il apparaît que les ITK "bas intrants pesticides" ne donnent pas encore entière satisfaction en termes de réduction des impacts sur les milieux aquatiques. En outre, les informations sur la toxicité des produits vis-à-vis des organismes aquatiques peuvent être utilisées directement à des fins réglementaires, notamment dans le cadre du suivi post-homologation des substances actives.

Perspectives de transfert

La démarche mise en œuvre dans le cadre du programme EMERITAT vise à améliorer les préconisations fournies par les conseillers agricoles en matière de construction de programmes de protection des cultures permettant de lutter contre la dégradation de la qualité des eaux superficielles.

Résumé long

Objectif

En dépit des avancées réalisées dans le domaine des méthodes d'évaluation des risques des pesticides pour les milieux aquatiques, de nombreuses incertitudes subsistent, notamment en ce qui concerne (i) la caractérisation spatiale et temporelle de l'exposition des organismes et (ii) les effets résultant d'expositions multiples et variables dans le temps. Le programme EMERITAT a été mis en œuvre par un consortium d'équipes spécialisées respectivement dans le conseil en systèmes de culture, l'estimation des transferts de pesticides dans les paysages agricoles au moyen d'outils de modélisation, le suivi du devenir des pesticides en milieu aquatique, et l'évaluation du risque de ces produits pour les communautés de microalgues et d'invertébrés à l'aide de dispositifs expérimentaux de type mésocosmes.

S'inscrivant à l'interface entre les volets 1.2 'Amélioration des procédures d'évaluation des risques *a priori*' et 1.3 'Caractérisation des effets des pesticides sur les écosystèmes' de l'APR 2006, EMERITAT avait pour objectif l'évaluation des risques des produits phytosanitaires sur des communautés d'organismes aquatiques dans des conditions réalistes d'exposition. En effet, l'étude a pris en compte à la fois la diversité des substances actives et les périodes d'application de l'intégralité des pesticides entrant dans les itinéraires techniques (ITK) préconisés pour la lutte contre les bioagresseurs lors d'une rotation triennale pois/blé/colza. Les ITK retenus correspondaient d'une part à une conduite de culture dite "classique" et d'autre part à une stratégie qualifiée de "bas intrants pesticides", basée à la fois sur la réduction du nombre de traitements, sur la diminution de la dose d'emploi de certaines substances et sur la substitution de substances actives. Deux scénarios agropédoclimatiques, correspondant à des sols hydromorphes, ont été définis à partir de deux situations environnementales contrastées, à savoir l'Ouest de la France (site de La Jaillière) et l'Est du Bassin Parisien (site de la Brie), pouvant conduire à des flux de substances actives différents en direction des milieux aquatiques. Le programme EMERITAT a permis d'établir si la mise en place d'une stratégie de type "bas intrants pesticides" permet de réduire à la fois la contamination des milieux aquatiques par les pesticides et les effets de ces derniers sur les communautés de microalgues et d'invertébrés.

Présentation des travaux de recherche

Démarche expérimentale

Sur la rotation culturale triennale pois/blé/colza retenue dans EMERITAT, la conduite de culture "classique" de la succession blé-colza nécessite 10 passages au champ tandis que l'ITK "bas intrants pesticides" n'en nécessite que 6. L'itinéraire "classique" implique l'application de 16 substances actives (correspondant à des IFT de 7,16 et 6,14 pour le blé et le colza, respectivement), tandis que l'itinéraire "bas intrants pesticides" se limite à 12 applications (correspondant à des IFT de 3 et 3,64 pour le blé et le colza, respectivement). Huit de ces molécules sont communes aux deux ITK.

Les substances actives apportées aux cultures sont soumises à divers phénomènes physiques, chimiques et biologiques qui déterminent leur transfert depuis la zone d'application vers l'atmosphère, le sol, les eaux souterraines et les eaux de surface. Dans le cadre d'EMERITAT, les transferts issus d'une parcelle drainée vers une pièce d'eau réceptacle ont été simulés, pour une succession de trois années climatiques moyennes, au moyen de modèles numériques appliqués à des sols hydromorphes présents sur les sites de La Jaillière et de la Brie. Pour chacune de ces deux situations agropédoclimatiques, les transferts simulés sont les pertes par drainage (modèle MACRO), ruissellement (modèle PRZM) et dérive de pulvérisation (abaques de Ganzelmeier). Les concentrations hebdomadaires prédites par ces modèles de transfert ont été utilisées pour contaminer des mares expérimentales (mésocosmes) et étudier, pendant deux années consécutives, les réponses des communautés de microalgues et d'invertébrés à l'exposition aux différentes substances actives.

L'étude a été réalisée dans 16 mésocosmes circulaires d'environ 9 m³, situés à l'air libre, dans les conditions climatiques (température, éclairage, précipitations) naturelles. Trois réplicats sont utilisés pour chaque modalité de traitement (ITK × contexte pédoclimatique), quatre mésocosmes étant utilisés comme témoins. La contamination des mésocosmes a été réalisée avec des préparations commerciales lorsqu'il s'agissait d'apports par dérive, alors que des substances actives pures ont été utilisées lorsque les apports étaient issus du drainage et du ruissellement. La dynamique des substances actives et, pour certaines d'entre elles, de leurs métabolites principaux, dans l'eau a été suivie de façon hebdomadaire sur l'ensemble de la durée d'expérimentation (deux ans, de novembre 2008 à octobre 2010). Le suivi en continu des effets des traitements sur les communautés de microalgues et d'invertébrés des mésocosmes était basé sur des critères structurels (abondance des taxons) et fonctionnels (fragmentation de la litière d'aulne).

Principaux résultats

Les résultats de la modélisation des transferts ont montré que, dans les scénarios étudiés, la dérive était généralement la voie majeure de contamination des milieux aquatiques, suggérant que le type de situation agropédoclimatique considéré était de peu d'importance. Une contribution non négligeable du ruissellement et du drainage a été mise en évidence pour des substances appliquées en automne, comme le diflufenican (DFF), l'isoproturon, le mésosulfuron-méthyl ou le prosulfocarbe. Cette contribution était plus importante dans le cas du scénario "La Jaillière", en cohérence avec les propriétés des sols. Le même type de résultat a été obtenu pour un fongicide appliqué au printemps dans les deux ITK, le boscalide.

La comparaison des concentrations mesurées dans l'eau des mésocosmes avec des valeurs de référence de toxicité aiguë pour les microalgues ou pour *Daphnia magna* a permis d'identifier les substances présentant les risques les plus importants pour les différents compartiments biologiques. Pour les producteurs primaires (microalgues), il s'agit logiquement de certains herbicides : isoproturon, DFF et diméthachlore pour tous les traitements, avec en outre le prosulfocarbe pour la stratégie "bas intrants pesticides". Pour les invertébrés, ce sont les insecticides pyréthrinoïdes qui apparaissent comme les substances les plus à risque quel que soit l'ITK considéré. De plus, dans le cas des itinéraires "bas intrants pesticides", le cyprodinil présentait aussi des valeurs de concentrations susceptibles d'être à l'origine d'un effet négatif sur les macro-invertébrés.

Dans les mésocosmes, les effets directs des traitements sur le phytoplancton et le périphyton ont été de très faible amplitude, sans doute du fait de la saison à laquelle ont eu lieu les apports les plus importants en herbicides (automne) qui ne correspond pas à une période de multiplication très active des microalgues et au fait que les systèmes expérimentaux présentaient une faible disponibilité en nutriments dans l'eau. Des effets indirects ont en revanche été observés au printemps 2009 dans les mésocosmes exposés aux itinéraires "bas intrants pesticides", avec notamment une augmentation temporaire de la biomasse phytoplanctonique. Ceci découle d'une diminution de l'abondance de nombreux invertébrés à la suite de leur exposition au cyprodinil.

Tous les traitements avec des insecticides ont eu un impact négatif sur l'abondance des arthropodes, qu'il s'agisse d'espèces planctoniques ou benthiques. Les crustacés isopodes (aselles) et amphipodes (gammare) ont été les plus affectés, indépendamment du type d'ITK. D'autres groupes, comme les rotifères par exemple, ont bénéficié de la réduction de l'abondance de certains arthropodes. De même, dans les mésocosmes exposés au cyprodinil (itinéraire "bas intrants pesticides"), un effet positif indirect des traitements sur l'abondance des larves de chironomes de différentes sous-familles a été observé, en relation avec la réduction de l'abondance d'autres espèces d'invertébrés. D'un point de vue fonctionnel, tous les traitements ont eu un impact négatif sur la fragmentation de la litière, en raison d'une diminution durable de l'abondance des invertébrés fragmenteurs (aselles et gammare notamment).

Bien que l'impact des traitements a été observé plus tôt dans les mésocosmes utilisés pour l'évaluation de l'ITK "classique", la conduite de culture dite "bas intrants pesticides" s'est également traduite par des effets significatifs sur la structure des différentes communautés et sur un processus écologique (fragmentation de la litière). Dans le cas de l'ITK de protection du blé, ce sont respectivement la bifenthrine (ITK classique) et le cyprodinil (ITK bas intrants pesticides) qui ont entraîné l'essentiel des effets. Pour les deux types d'ITK dans le cas du colza, les impacts sont à mettre en relation avec l'exposition aux insecticides pyréthrinoïdes, ce qui amène à conclure que la mise en œuvre d'ITK destinés à minimiser l'impact environnemental nécessite certaines reconsidérations en ce qui concerne l'utilisation d'insecticides et la mise en œuvre d'une substitution de substances dans le cas des fongicides.

Acquis en termes de transfert

Les résultats issus du programme EMERITAT ont permis de comparer différents scénarios d'exposition des eaux de surface représentatifs des systèmes drainés français, selon que la conduite culturale fait appel à des itinéraires de protection phytosanitaire "classiques" ou "bas intrants pesticides". Il apparaît que les itinéraires techniques "bas intrants pesticides", visant à réduire l'utilisation des pesticides, ne donnent pas encore entière satisfaction en termes de réduction des impacts sur les milieux aquatiques.

Sur un plan plus général, ce programme a mis en évidence l'intérêt du couplage entre modélisation et approches expérimentales en écotoxicologie pour l'évaluation environnementale des pratiques de protection des cultures. En outre, les informations sur la toxicité des produits vis-à-vis des organismes aquatiques peuvent être utilisées directement à des fins réglementaires, notamment dans le cadre de suivis post-homologations des substances actives.

Perspectives de recherche

- Amélioration de la prise en compte des effets indirects sur les organismes aquatiques dans l'évaluation des risques.
- Approfondissement de la démarche de couplage entre modèles de transfert et effets écotoxicologiques.
- Analyses de l'impact environnemental de différents ITK sur des cultures autres que le blé et le colza (à la fois en termes de transferts et d'effets).
- Spatialisation des transferts et des effets pour établir une vision nationale.

Perspectives de transfert

L'exploitation des résultats du programme EMERITAT vise à améliorer les préconisations fournies par les conseillers agricoles afin de prendre en compte de manière réaliste l'impact que peuvent avoir les itinéraires techniques sur les écosystèmes aquatiques et améliorer ainsi la construction de programmes de protection des cultures permettant de lutter contre la dégradation de la qualité des eaux superficielles. Il est à noter qu'une partie de la méthodologie déployée pour la modélisation des transferts de produits phytosanitaires a été valorisée par la start-up FOOTWAYS créée durant le cours du projet par l'un de ses participants

Formation

Thèse de doctorat

Auber A. Évaluation expérimentale de métriques caractérisant les réponses structurelles et fonctionnelles des communautés d'invertébrés aquatiques aux stress induits par des pesticides (METRIX). *Thèse de Doctorat, Ecole Doctorale Vie-Agro-Santé, Agrocampus Ouest Rennes* (débutée le 01/10/2008).

Rapports de stage

Le Bourg C., 2009. Mise au point de tests de toxicité pour l'étude de l'effet des pesticides sur les embryons du mollusque *Lymnaea stagnalis*. *Mémoire de fin d'études, DUT Génie Biologique, UBO, Brest, 35 p.*

Le Gouge A. 2009. Optimisation d'un test de toxicité pour l'étude de l'effet de pesticides sur une algue verte unicellulaire, *Desmodesmus subspicatus* Chodat. *Mémoire de fin d'études, DUT Génie Biologique, UBO, Brest, 20 p (+ 9 annexes).*

Valorisation

Articles scientifiques

Auber A., Roucaute M., Togola A., Caquet Th., 2011. Structural and functional effects of conventional and low pesticide input crop-protection programmes on benthic macroinvertebrate communities in outdoor pond mesocosms. *Ecotoxicology*, en révision favorable.

Auber A., Roucaute M., Togola A., Caquet Th. Use of biological traits for the assessment of pesticide effects on invertebrate community structure and function in outdoor pond mesocosms. *Environmental Pollution*, soumis.

Coutellec M.-A., Collinet M., Caquet Th., 2011. Parental exposure to pesticides and progeny reaction norm to a biotic stress gradient in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Ecotoxicology*, sous presse. DOI 10.1007/s10646-011-0611-7.

Articles techniques

En préparation pour *Perspectives Agricoles* : "Transfert et impacts de produits phytosanitaires dans les écosystèmes aquatiques".

Communications dans des congrès

Communications orales

Auber A., Roucaute M. & Caquet Th., 2010. Effects of realistic exposure to pesticide mixtures on aquatic macroinvertebrate communities and leaf litter breakdown: a mesocosm approach. *SETAC Europe 20th Annual Meeting, Seville, Spain, 23-27 May 2010.*

Auber A., Roucaute M. & Caquet Th., 2010. Using traits to characterize effects of pesticide exposure on aquatic macroinvertebrates and predict leaf breakdown processing. *Joint Congress of the North American Benthological Society and of the American Society of Limnology and Oceanography, Santa Fe NM, USA, 6-11 June 2010.*

Auber A., Roucaute M., Lagadic L. & Caquet Th., 2011. Using functional traits to characterize the effects of pesticides on aquatic macroinvertebrate communities. *SETAC Europe 21st Annual Meeting, Milan, Italy, 15-19 May 2011.*

Roucaute M., Auber A., Caquet Th. & Lagadic L., 2011. SPEAR index adaptation to lentic/outdoor pond mesocosm studies: an assessment of long term vulnerability to pesticides. *SETAC Europe 21st Annual Meeting, Milan, Italy, 15-19 May 2011.*

Posters

Auber A., 2009. Evaluation expérimentale de métriques caractérisant les réponses structurelles et fonctionnelles des communautés d'invertébrés aquatiques aux stress induits par des xénobiotiques. *Journée des doctorants du CAREN, Rennes, France, 19 février 2009.*

Auber A., Roucaute M. & Caquet Th., 2010. Utilisation de traits biologiques et écologiques pour caractériser les effets des pesticides sur les communautés de macroinvertébrés benthiques. *Colloque Ecologie 2010, Montpellier, France, 2-4 Septembre 2010.*

Lagadic L., Auber A., Caquet Th., Togola A., Roucaute M., Réal B., Azam D. & Quemeneur A., 2010. Comparative post-registration study on the impact of conventional and low pesticide input crop protection programs in outdoor pond mesocosms. *SETAC Europe 20th Annual Meeting, Seville, Spain, 23-27 May 2010.*

Surdyk N., Réal B., Dubus I., Togola A., Caquet Th. & Lagadic, L., 2010. Realistic exposure scenarios for post-registration studies on plant protection products in aquatic mesocosms. *SETAC Europe 20th Annual Meeting, Seville, Spain, 23-27 May 2010.*

Togola A., Caquet Th., Surdyk N., Réal B. & Lagadic L., 2010. Development of online SPE/UPLC/MS/MS method for analysis of various pesticides in water. *SETAC Europe 20th Annual Meeting, Seville, Spain, 23-27 May 2010.*

B. SYNTHÈSE DES PRINCIPAUX RESULTATS

VOLET 1. PREDICTIONS DES FLUX DE MATIERES ACTIVES VERS LE RESEAU DE SURFACE

Au sein du projet EMERITAT, le travail du BRGM a consisté à prédire les concentrations journalières et les flux de pesticides susceptibles de rejoindre les eaux de surface par drainage, ruissellement et dérive de pulvérisation. Les travaux de modélisation ont été entrepris pour deux itinéraires techniques ("classique" et "bas intrants pesticides") dans deux situations géographiques contrastées (Ouest de la France, "La Jaillièrre" et Est du Bassin Parisien, "Brie"). Les prédictions des flux hebdomadaires de matières actives vers le réseau de surface ont été utilisées pour définir les quantités de matières actives à apporter aux mésocosmes, afin d'évaluer les effets potentiels des pertes de produits.

1. Choix des itinéraires techniques et des matières actives

1.1. Rotation

Une rotation triennale Pois/Blé/Colza pratiquée sur les deux types de sols étudiés a été sélectionnée. L'année semée en pois n'a fait l'objet d'aucun traitement phytosanitaire dans les simulations, cette culture ayant pour but d'initialiser la partie hydrologique des modèles. Deux itinéraires techniques ont été mis au point pour le blé et deux pour le colza afin de pouvoir présenter une conduite de culture dite "classique" (Figure 1) et une autre dite "bas intrants pesticides" (Figure 2).

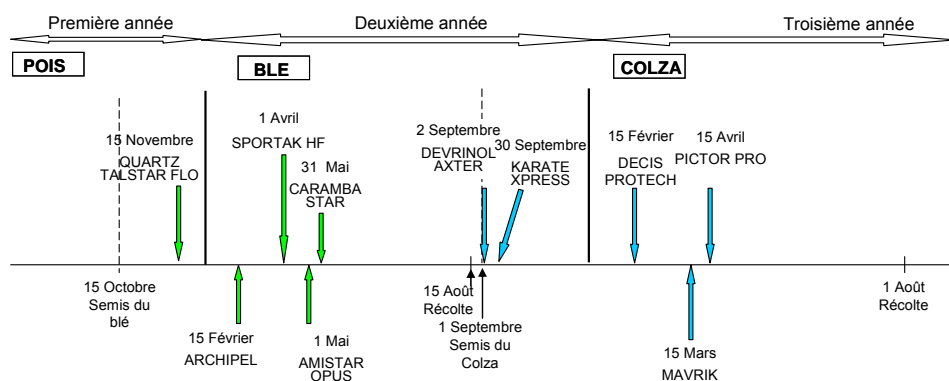


Figure 1. Itinéraire technique "classique".

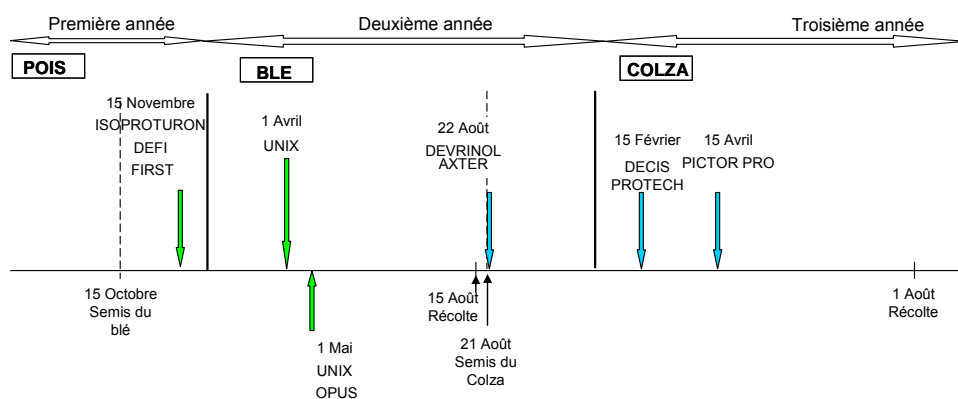


Figure 2. Itinéraire technique "bas intrants pesticides".

1.2. Itinéraire technique du blé

L'itinéraire "classique" de protection des cultures du blé a été mis au point par ARVALIS - Institut du végétal (Figure 1). Il commence avec l'utilisation d'herbicide (QUARTZ ; voir Tableau 1 pour la liste des produits commerciaux et des substances actives correspondantes) suite au semis avant l'hiver. Un insecticide (TALSTAR FLO) est appliqué à la même période pour protéger les semis. Après l'hiver, il se poursuit par un deuxième passage herbicide (ARCHIPEL) de rattrapage. Une première protection antifongique est apportée début avril (SPORTAK) car l'augmentation des températures au printemps entraîne un regain d'activité des champignons. Jusqu'à la fin mai, la protection antifongique se voudra complète puisque deux autres passages sont prévus pour maximiser la période durant laquelle la plante est protégée. Le second passage se fait début mai (CARAMBA STAR) et le troisième fin mai (AMISTAR, OPUS). Les matières actives sont variées pour élargir le spectre de protection. La plupart des produits sont utilisés à leur dose d'homologation ou légèrement en dessous.

L'itinéraire "bas intrants pesticides" a aussi été mis au point par ARVALIS - Institut du végétal. (Figure 2). Il utilise des matières actives différentes de l'itinéraire classique pour tirer parti de molécules au profil environnemental meilleur. Le prosulfocarbe (contenu dans le DEFI) a une plus haute sorption que l'isoproturon (contenu dans le QUARTZ), il est donc moins susceptible d'être transféré. Le DEFI a donc été privilégié en tant qu'herbicide d'hiver sur le blé pour baisser la dose d'utilisation de l'isoproturon. Le remplacement du QUARTZ par le FIRST, dont les trois substances actives ont des petites doses d'application, permet de réduire la dose d'isoproturon appliquée et de diminuer la dose totale d'herbicide utilisée sur la parcelle. Le second passage d'herbicide (en février) a été supprimé car il était appliqué durant une période pendant laquelle les transferts d'eau vers les drains sont particulièrement actifs. Cette suppression peut avoir un impact très important à elle seule. Sur les trois protections antifongiques du printemps seules deux ont été conservées, celles du 1^{er} avril et du 1^{er} mai. Ce changement a été permis grâce à l'utilisation d'une substance active nouvelle, le cyprodinyl (apporté sous forme d'UNIX). Cette nouvelle molécule reste combinée avec un fongicide déjà utilisé (OPUS) pour conserver un spectre d'action large. Cet itinéraire "bas intrants pesticides" peut être jugé comme tout à fait efficace, les années normales, dans les contextes climatiques retenus.

1.3. Itinéraire technique du colza

L'itinéraire "classique" de protection des cultures du colza a été mis au point avec l'aide du CETIOM. Il commence avec l'utilisation d'herbicides (DEVINOL, AXTER) lors du semis dans les premiers jours de septembre. Une première protection insecticide (KARATE XPRESS) est apportée fin septembre pour prévenir les attaques de pucerons. Mi-février et mi-mars, deux autres protections insecticides (DECIS PROTECH et MAVRIK FLO) sont appliquées pour limiter les proliférations de méligèthes et de charançons de la tige lorsque les températures augmentent au début du printemps. Un traitement fongicide (PICTOR PRO) est réalisé à la mi-avril lorsque les températures et l'hydrométrie favorisent les attaques de champignons. La récolte du colza est typiquement prévue début août (Figure 1). La plupart des produits sont utilisés à leur dose d'homologation ou légèrement en dessous.

L'itinéraire "bas intrants pesticides" pour le colza n'utilise pas de nouvelles molécules contrairement à celui du blé. La date de semis est avancée de 15 jours par rapport à l'itinéraire classique pour permettre au colza de mieux s'implanter et de prendre l'avantage sur les adventices. Ce changement de date de semis permet de réduire les doses d'utilisation d'herbicides sans toutefois changer les produits (DEVINOL, AXTER). La date d'application des herbicides a été adaptée à la date de semis et a donc été avancée de 15 jours. Une seule application d'insecticide a été jugée suffisante. L'application de mi-février a

été conservée (DECIS PROTECH) car cette période marque généralement le début des vols de charançons et de méligèthes. La dose ne peut pas être diminuée pour ce produit sous peine de le rendre inefficace. La protection fongique (PICTOR PRO) a été conservée mais la dose a été réduite (Figure 2). L'itinéraire bas intrants pesticides peut être considéré comme relativement risqué du point de vue agronomique car deux traitements ont été supprimés mais cette conduite de culture traduit un itinéraire réaliste. Le décalage du semis et une meilleure utilisation du fongicide permettent de réduire les doses des produits par rapport à l'itinéraire classique.

1.4. Application de matières actives

L'itinéraire technique classique pour le blé et le colza nécessite 10 passages aux champs sur l'ensemble de la rotation tandis que l'itinéraire technique bas intrants pesticides n'en nécessite que 6. Puisqu'il est possible d'apporter plusieurs matières actives en un seul passage (notamment parce que certains produits commerciaux en contiennent plusieurs), l'itinéraire classique contient 16 substances actives tandis que l'itinéraire bas intrants pesticides en contient 12. Huit molécules sont communes aux deux itinéraires.

La quantité de pesticides appliquée à l'hectare se calcule en multipliant la dose de produit commercial appliquée à l'hectare par le dosage en substance active de ce produit (Tableau 1).

2. Simulation des transferts

2.1. Phénomènes simulés et modèles utilisés

Lors de et après l'application d'un produit phytosanitaire, les substances actives sont soumises à divers phénomènes physiques, chimiques et biologiques qui vont conduire à leur transfert depuis la zone d'application vers l'atmosphère et/ou le sol, les eaux souterraines et les eaux de surface. Dans le cadre de ce travail, l'accent a été mis sur les transferts issus d'une parcelle drainée vers une pièce d'eau réceptacle. Les principaux transferts à simuler sont les pertes par drainage, par ruissellement et par dérive.

Les pertes par volatilisation ne vont pas directement influencer la concentration dans le plan d'eau près de la parcelle agricole de même que l'infiltration n'est pas censée avoir une action directe sur les teneurs en produits phytosanitaires de la pièce d'eau. De plus, dans le cas d'une parcelle drainée, ces deux phénomènes n'entraînent normalement pas des flux importants vers les eaux de surface. Il reste toutefois à noter que les pertes par volatilisation et lixiviation peuvent être importantes.

Les modèles utilisés pour cette étude sont MACRO pour simuler le drainage et PRZM pour simuler le ruissellement. Les courbes de Ganzelmeier ont été utilisées pour le calcul de la dérive. Les modèles MACRO et PRZM ont été utilisés car ils sont largement utilisés dans le cadre de l'homologation des produits phytosanitaires et bénéficient d'années d'utilisation et d'amélioration. Les courbes de Ganzelmeier sont aussi utilisées au niveau européen.

2.1.1. Présentation de MACRO

Le modèle MACRO est un modèle 1D décrivant le transport de l'eau et des solutés en régime transitoire dans des milieux stratifiés. Ce modèle a été mis au point par Jarvis (1991) et bénéficie d'améliorations à long terme (Larsbo & Jarvis, 2003). Il utilise des équations physiques ou des schémas de fonctionnement conceptuels pour simuler les différents

transferts d'eau et de solutés dans les sols. La porosité totale du sol est scindée en deux domaines : les micropores et les macropores, chaque domaine étant caractérisé par une cinétique différente pour les transferts d'eau et de solutés. La simulation à l'aide de MACRO permet d'aborder différents phénomènes intervenant dans les transferts dans un sol : l'hydrologie, la climatologie, le développement du couvert végétal, la pédologie et les phénomènes d'atténuation spécifiques aux pesticides (adsorption, dégradation).

Tableau 1. Doses de substances actives appliquées à l'hectare pour les différents itinéraires techniques étudiés.

Produit commercial	Dose de produit à l'hectare	Substance active	Dosage en substance active	Dose de substance active à l'hectare
Blé de l'itinéraire classique				
Amistar	0,5 L	Azoxystrobine	250 g/L	125 g
Archipel	250 g	Iodosulfuron-méthyl-sodium	30 g/Kg	7,5 g
Archipel	250 g	Mesosulfuron-méthyl	30 g/Kg	7,5 g
Caramba Star	0,5 L	Metconazole	90 g/L	45 g
Opus	0,5 L	Epoxiconazole	125 g/L	62,5 g
Quartz	2 L	Isoproturon	500 g/L	1000 g
Quartz	2 L	Diflufenicanil	62,5 g/L	125 g
Sportak HF	1 L	Prochloraze	450 g/L	450 g
Talstar Flo	0,1 L	Bifenthrine	100 g/L	10 g
Blé de l'itinéraire bas intrants pesticides				
Défi	1 L	Prosulfocarbe	800 g/L	800 g
First	0,5 L	Bromoxynil	125 g/L	62,5 g
First	0,5 L	Diflufenicanil	40 g/L	20 g
First	0,5 L	loxynil	75 g/L	37,5 g
Isoproturon	1 L	Isoproturon	500 g/L	500 g
Opus	0,5 L	Epoxiconazole	125 g/L	62,5 g
Unix	0,8 L	Cyprodinyl	75 %	600 g
Colza de l'itinéraire classique				
Axter	2 L	Clomazone	60 g/L	120 g
Axter	2 L	Diméthachlore	500 g/L	1000 g
Decis Protech	0,3 L	Deltaméthrine	1,47 %	4,41 g
Devrinol	2,2 L	Napropamide	450 g/L	990 g
Karate Xpress	0,1 L	Lambda-cyhalothrine	5 %	5 g
Mavrik Flo	0,2 L	Tau-fluvalinate	240 g/L	48 g
Pictor Pro	0,5 L	Boscalid	500 g/L	250 g
Colza de l'itinéraire bas intrants pesticides				
Axter	1,5 L	Clomazone	60 g/L	90 g
Axter	1,5 L	Diméthachlore	500 g/L	750 g
Decis Protech	0,3 L	Deltaméthrine	1,47 %	4,41 g
Devrinol	1,8 L	Napropamide	450 g/L	810 g
Pictor Pro	0,4 L	Boscalid	500 g/L	200 g

Dans MACRO, l'écoulement de l'eau dans les micropores est décrit par l'équation de Richards (Richards, 1931) tandis que la courbe de conductivité hydraulique est simulée par le modèle de Mualem (Mualem, 1976). La courbe de rétention est calculée à partir de l'équation de Van Genuchten (Van Genuchten, 1980). Dans les macropores, l'écoulement de l'eau est essentiellement gravitaire et la conductivité est fonction de la teneur en eau (Larsbo, 2005). MACRO ne définit pas de limite physique de taille entre les macropores et les micropores, mais une teneur en eau maximale à partir de laquelle les transferts sont supposés se faire *via* les macropores. Jusqu'à cette valeur limite, l'eau est considérée comme étant véhiculée dans les micropores. Ainsi dans le cas normal, les micropores se remplissent dans un premier temps, avant que l'eau excédentaire ne passe directement vers les macropores. Dans ces conditions, les macropores d'un horizon inférieur peuvent se remplir avant les micropores. Les échanges entre micropores et macropores sont simulés par une approximation de l'équation de diffusion de l'eau.

Le modèle MACRO a été testé dans de nombreux contextes : dynamique de l'eau, de traceurs, de solutés réactifs ou non réactifs, pour des sols sableux, limoneux et argileux (Jarvis, 1995 ; Ludwig *et al.*, 1999). La modélisation à l'aide de MACRO a été également spécifiquement testée en milieux drainés (Larsson & Jarvis, 1999 ; Brown *et al.*, 2004). Plusieurs études comparatives ont considéré les prédictions de différents modèles à partir des données d'un même site expérimental (Vink *et al.*, 1997 ; Armstrong *et al.*, 2000 ; Gottesbüren *et al.*, 2000 ; Garratt *et al.*, 2002). Le modèle MACRO apparaît à travers ses prédictions comme un modèle obtenant de bons résultats de simulation dans le cadre de transferts d'eau et de solutés mettant en jeu des écoulements préférentiels pour différents types de sols. Le modèle est utilisé pour le calcul des Concentrations Environnementales Prévisibles dans les eaux de surface (PEC_{sw}) à l'aide de modèles de simulation dans le contexte de l'homologation européenne (EEC, 1991 ; FOCUS, 2001).

En règle générale, le modèle prédit de façon correcte le timing et le volume des percolations/drainage. Le modèle est toutefois connu pour être difficile à paramétrer car il nécessite la calibration préalable d'un certain nombre de paramètres. Les analyses de sensibilité et d'incertitudes réalisées sur ce modèle ont cependant montré que les volumes des écoulements étaient de manière générale peu affectés par les changements des valeurs des paramètres d'entrée (Dubus & Brown, 2002).

2.1.2. Présentation de PRZM

Le modèle PRZM (*Pesticide Root Zone Model*, Carsel *et al.*, 1984) est un modèle compartimenté unidimensionnel et non déterministe qui peut être utilisé pour prédire les mouvements chimiques dans les sols insaturés par infiltration chromatographique verticale. Il comporte deux éléments majeurs : l'hydrologie et le transport chimique.

La composante hydrologique permet de calculer le ruissellement et l'érosion basés sur la méthode du "Curve Number" du Service de Conservation des Sols américain. Le "Curve Number" est un paramètre hydrologique utilisé pour décrire le potentiel de ruissellement de l'eau. L'évapotranspiration est divisée entre l'évapotranspiration due à l'interception des cultures, l'évapotranspiration du sol et la transpiration de la culture. Le mouvement de l'eau est simulé en utilisant les paramètres de sol généralisés incluant le point de flétrissement, la capacité au champ et la teneur en eau saturée.

La composante de transport chimique peut simuler les pesticides ou les espèces azotées organiques ou inorganiques. Pour les pesticides, l'élément de transport peut simuler l'application du pesticide sur le sol ou sur les feuilles des plantes. La biodégradation est aussi considérée dans la zone racinaire. Les concentrations des pesticides dissous, adsorbés ou contenus dans la phase vapeur du sol sont estimées en considérant

simultanément les processus de l'assimilation du pesticide par les plantes, le ruissellement de surface, l'érosion, la décomposition, la volatilisation et la dispersion.

2.1.3. Présentation des courbes de Ganzelmeier

Les courbes de Ganzelmeier (Ganzelmeier *et al.*, 1995) sont issues d'un travail expérimental qui a permis de calculer le pourcentage de produits phytosanitaires qui quitte une parcelle par dérive dès l'application pour atteindre une pièce d'eau située dans son voisinage. La quantité de substances actives perdue dépend directement de la quantité de substances actives appliquée et de la distance entre le bord du champ et la surface en eau.

Lors de cette étude expérimentale, de nombreuses données de terrain ont été recueillies et ont permis de réaliser une description statistique des pourcentages de dérive en fonction de quelques paramètres simples. Les travaux de Ganzelmeier ont été ajustés lors du projet FOOTPRINT afin d'obtenir les paramètres de régression de la dérive pour de nombreux centiles (Reichenberger *et al.*, 2008). L'utilisation des courbes de Ganzelmeier impose donc de sélectionner un centile *a priori*. La sélection d'un centile élevé implique que l'utilisateur se place dans des cas rares et des pourcentages de dérive élevés. L'équation de dérive s'écrit :

$$\% \text{ dérive} = A.z^B$$

où % dérive est le pourcentage de la quantité appliquée qui atteindra le plan d'eau considéré, Z est à la distance entre le bord du champ et le plan d'eau, et A et B sont des paramètres de régression de la dérive.

Pour notre étude, le choix s'est porté sur le 50^{ème} centile car il représente le cas médian, c'est-à-dire le cas qui a le plus de possibilité de se réaliser. Une distance de 5 mètres entre le bord du champ et le cours d'eau a été retenue car elle correspond à la zone de non traitement des produits phytosanitaires au champ en France.

2.2. Sélection des paramètres

2.2.1. Données relatives au couvert végétal

Le modèle MACRO permet de prendre en compte le calendrier et l'itinéraire cultural *via* un fichier de paramètres dédié. Les dates de semis, de récolte et de développements maximaux pour le pois, le blé et le colza ont été arrêtées lors de la mise au point des itinéraires techniques (voir §1.1, p.7). et ont été entrées dans MACRO. Les critères de développement des différentes cultures, tels les indices foliaires, le développement racinaire, les valeurs des tensions critiques pour le prélèvement racinaire et la dégénérescence foliaire sont issus des paramètres conseillés par le groupe FOCUS (FOCUS, 2001).

Le modèle PRZM permet aussi de rendre compte d'une certaine évolution des végétaux. Les paramètres les plus difficiles à estimer sont issus du travail du groupe FOCUS (FOCUS, 2001). Les dates clefs du développement des plantes sont celles déterminées par les itinéraires culturaux.

Les paramètres des courbes de Ganzelmeier qui ont été utilisés sur blé comme sur colza sont ceux qui ont été déterminés pour les "grandes cultures". En effet, les courbes de Ganzelmeier font assez peu de différence entre les différents types de cultures. Dans le cas de cultures de plein champ, les paramètres de régression de la dérive pour le 50^{ème} centile sont : A = 0,9658 et B = -0,9507. La quantité de pesticides qui dérive et atteint un plan d'eau situé à 5 m du site de traitement correspond environ à 0,21 % de la dose appliquée.

2.2.2. Données relatives aux pesticides

Les dates et les quantités de matières actives appliquées sur les parcelles ont été déterminées à partir des deux itinéraires techniques (voir §1.1).

Aucune mesure de dégradation et de sorption n'étant disponible pour les sites choisis, les temps de demi-vie ont été extraits de la base de données en ligne FOOTPRINT PPDB (<http://eu-footprint.org/fr/ppdb/html>).

Les constantes de dégradation et de sorption ont été calculées à partir des temps de demi-vie et des Koc en tenant compte des températures de mesure et des teneurs en matière organique du site de La Jaillière et du site de Brie. Ces valeurs ont été utilisées dans les modèles MACRO et PRZM. Elles ne sont pas prises en compte dans le calcul de la dérive (courbes de Ganzelmeier).

2.2.3. Données relatives au sol

Des fosses pédologiques ont été ouvertes sur les sites expérimentaux de La Jaillière et de la Brie dans le but de préciser certains paramètres nécessaires pour la simulation. L'ouverture de ces fosses a permis de déterminer les épaisseurs et la composition des horizons pédologiques.

Lors de l'ouverture de la fosse de La Jaillière, quatre horizons différents ont été décrits. Cinq horizons ont été décrits pour la Brie. Un échantillon de sol a été prélevé à peu près au centre de chacun de ces horizons pour réaliser des analyses granulométriques (Tableaux 2 et 3).

Tableau 2. Résultats de l'analyse granulométrique des quatre horizons de La Jaillière.

Parcelle de La Jaillière	Profondeur (cm)	Sables (%)	Limons (%)	Argiles (%)	Matière organique(%)
Horizon 1	0-30	34,6	44,6	20,8	2,61
Horizon 2	30-48	32,8	41,3	25,9	1,96
Horizon 3	48-65	15,5	35,3	49,2	0,60
Horizon 4	65-110	21,5	35,8	42,7	0,39

Tableau 3. Résultats de l'analyse granulométrique des cinq horizons de la Brie.

Parcelle de Brie	Profondeur (cm)	Sables (%)	Limons (%)	Argiles (%)	Matière organique(%)
Horizon 1	0-30	6,0	72,3	21,7	2,66
Horizon 2	30-50	3,3	74,5	22,2	0,82
Horizon 3	50-75	2,5	70,0	27,5	0,54
Horizon 4	75-100	1,7	67,4	30,9	0,31
Horizon 5	100-130	2,9	68,3	28,8	0,21

Les résultats de ces analyses granulométriques ont été utilisés dans les fonctions de pédotransfert de la méthode HYPRES¹ (Wöesten *et al.*, 1999) pour obtenir les paramètres de l'équation de Van Genuchten (Van Genuchten, 1980). Ces paramètres ont permis d'établir des courbes de rétention pour chaque horizon.

La paramétrisation du modèle MACRO nécessite l'attribution de valeurs à de nombreux paramètres qui sont corrélés entre eux. La description des transferts d'eau se base sur la définition de deux domaines d'écoulement, les micropores et les macropores. La limite entre ces deux domaines est définie par trois paramètres hydrologiques (CTEN, KSM, XMPOR). La plupart de ces paramètres d'entrée sont reliés entre eux par la courbe de rétention et la courbe de conductivité hydraulique (**Figure 3**).

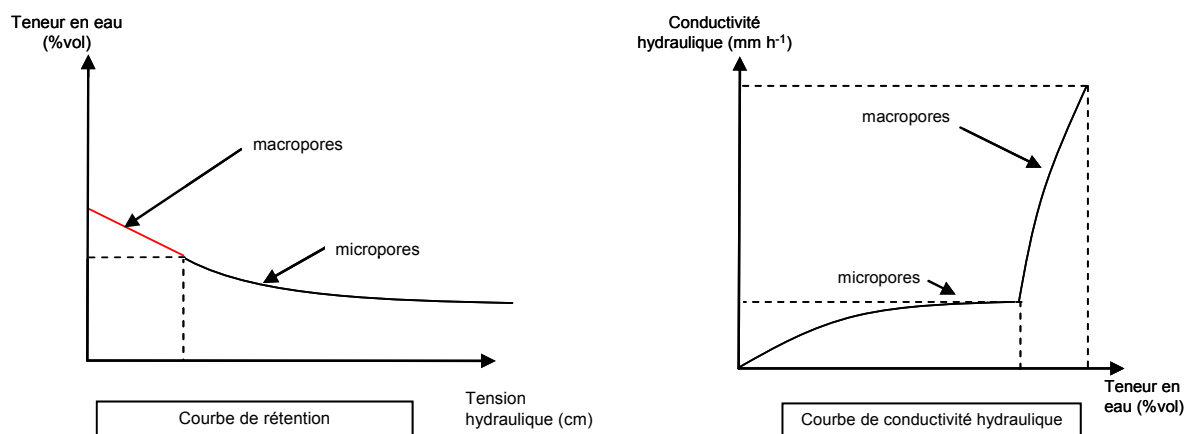


Figure 3. La courbe de rétention (à gauche) et la courbe de conductivité hydraulique (à droite) montrent les interactions entre les différentes variables du modèle.

CTEN étant un paramètre difficilement calculable par des fonctions de pédotransfert, la valeur utilisée comme paramètre d'entrée dans le modèle a été choisie par jugement d'expert. Les valeurs de la plupart des autres paramètres ont pu être déterminées à partir de la valeur de CTEN et de la courbe de rétention. L'opération a été répétée pour chaque horizon. Pour les paramètres qui ne sont pas reliés à la courbe de rétention, comme TPORV (la porosité totale) par exemple, des relations de pédotransfert ont été utilisées.

Le modèle PRZM ne demande pas de paramètres en plus de ceux de l'analyse granulométrique et de certaines valeurs de la courbe de rétention (capacité au champ et point de flétrissement). Aucune courbe de pédotransfert n'a donc été utilisée.

Les courbes de Ganselmeier n'ont pas besoin de prendre en compte les données relatives aux sols.

2.2.4. Données relatives au climat

Les données climatiques utilisées dans la modélisation pour la Jaillière sont issues des mesures réalisées sur le site expérimental et couvrent la période 1993 à 2005. Le modèle nécessite les valeurs des températures minimales et maximales journalières, de précipitations ainsi que les estimations d'évapotranspiration (fournies par Météo France). Les données climatiques utilisées dans la modélisation pour le site de la Brie sont issues des mesures réalisées par la station Météo France de Boissy-le-Châtel et couvrent la période 1993 à 2006.

¹ HYPRES : HYdraulic PProperties of European Soils

Bien que les mesures sur les sites expérimentaux couvrent une longue période, seules trois années sont nécessaires pour les simulations dans le cadre de ce projet. La série de trois années climatiques la plus pertinente a été distinguée en comparant de manière statistique les flux de pesticides drainés à La Jaillière. Le calcul du flux engendré par chacun des 28 pesticides pour chacune des 10 séries de trois années a mené à la réalisation de 280 simulations. Les données quotidiennes de flux de MACRO ont été compilées pour obtenir le flux annuel dans les eaux de drainage de chaque pesticide pour chaque série d'années.

Les ordres de grandeur des sommes des flux étant très différents d'un pesticide à l'autre, les sommes des flux ont été transformées en rang afin de discriminer plus facilement les années. Avec cette méthode, la série d'années la plus représentative de La Jaillière devrait avoir le rang 5 pour tous les pesticides. Les trois séries d'années dont la moyenne des rangs se rapproche le plus de 5 sont 1992/1993/1994, 1993/1994/1995 et 1997/1998/1999. La moyenne de 5,14 de la série 1993/1994/1995 cache une grande hétérogénéité avec 11 pesticides se classant premier ou deuxième et 9 pesticides se classant neuvième ou dixième. Cette disparité ne fait pas de cette série d'années la période adéquate pour les simulations. Les séries 1992/1993/1994 et 1997/1998/1999 ont respectivement une moyenne de 4,61 et 5,64. Cependant, la série 1997/1998/1999 a été sélectionnée car elle a le plus faible écart-type des deux séries restantes et car elle est plutôt homogène au niveau des rangs.

Les mêmes simulations de drainage ont été réalisées pour le site de la Brie pour vérification et la série d'année 1997/1998/1999 était aussi moyenne. L'intégralité de ces travaux sera présentée dans le rapport final.

Ainsi pour le reste des simulations, les paramètres de précipitation, d'ETP et de température des années 1997/1998/1999 seront entrés dans le modèle. Les données Météo France ont été traduites dans les formats de fichiers MACRO et PRZM. Les courbes de Ganzelmeier n'utilisent pas de données météorologiques.

2.2.5. Autres paramètres

Les paramètres ne pouvant pas être mesurés et nécessaires à l'utilisation des modèles PRZM (fonte des neiges, pourcentage de matière active intercepté par les feuilles...) et MACRO (fonte des neiges, profondeur de mélange entre pluie et humidité du sol...) ont été renseignés en utilisant les valeurs par défaut du scénario "Châteaudun" données dans la documentation réalisée par le groupe de travail FOCUS.

2.3. Résultats des simulations de transfert

2.3.1. Résultats des simulations pour le drainage

Étant donné que la période d'application de l'isoproturon est pluvieuse et que celui-ci a une rétention moyenne sur la matière organique, les transferts de cette matière active sont importants juste après l'application (Figure 4). La courte demi-vie de l'isoproturon explique que l'on ne le retrouve pas dans les eaux drainées un an après l'application.

Dans le cas particulier de cette simulation, le flux total transféré est d'environ 6440 mg/ha (soit 0,64 % de la dose appliquée). Cette valeur est du même ordre de grandeur que les données expérimentales obtenues sur le site de La Jaillière qui sont comprises entre 181 et 31829 mg/ha (Réal, 2006). Les résultats de la simulation sont donc réalistes.

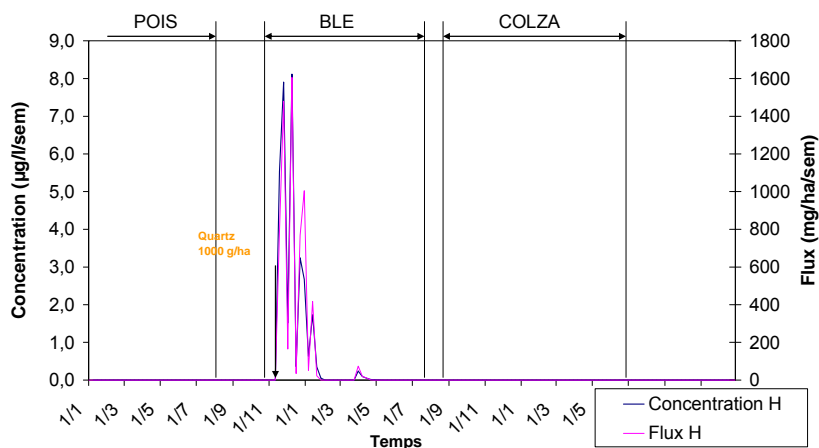


Figure 4. Exemple de résultats de modélisation obtenus - Simulation des flux et des concentrations hebdomadaires en fonction du temps pour l'isoproturon dans les eaux de drainage de La Jaillière.

A La Jaillière, le produit phytosanitaire conduisant aux pertes les plus importantes par drainage en termes de flux est l'isoproturon en itinéraire classique tandis qu'en termes de pourcentage, c'est le mesosulfuron. Le sol de Brie donne lieu à très peu de transfert par drainage, probablement à cause des caractéristiques massives du premier horizon. Les différences entre les deux sites sont dues aux sols et aux conditions météorologiques. Des épisodes orageux/pluvieux pouvant varier suivant le site considéré, les flux sont très variables pour une même année. Le passage en itinéraire bas intrants pesticides permet de réduire les flux pour toutes les substances actives (Tableau 4).

Tableau 4. Flux et pourcentages de la dose appliquée transférés par le drainage à La Jaillière et en Brie. Les "-" indiquent des valeurs de flux inférieures à 1 mg/ha/an.

Produit	Culture	Dose appliquée en g/ha	La Jaillière		Brie	
			Flux en mg/ha	En % de la dose appliquée	Flux en mg/ha	En % de la dose appliquée
Azoxystrobine	Blé	125	6	0,00%	-	-
Bifenthrine	Blé	10	-	-	-	-
Boscalid Bas intrants	Colza	200	1528	0,76%	9	0,00%
Boscalid Classique	Colza	250	1934	0,77%	12	0,00%
Bromoxynil	Blé	62,5	-	-	-	-
Clomazone Bas intrants	Colza	90	-	-	-	-
Clomazone Classique	Colza	120	-	-	-	-
Cyprodinil	Blé	1200	-	-	-	-
Deltaméthrine	Colza	4,41	-	-	-	-
Diflufenicanil Bas intrants	Blé	20	64	0,32%	-	-
Diflufenicanil classique	Blé	125	399	0,32%	-	-
Diméthachlore Bas intrants	Colza	750	-	-	-	-
Diméthachlore Classique	Colza	1000	-	-	-	-
Epoxiconazole	Blé	62,5	14	0,02%	-	-
Iodosulfuron	Blé	7,5	-	-	-	-
Ioxynil	Blé	37,5	-	-	-	-
Isoproturon Bas intrants	Blé	500	2637	0,53%	46	0,01%
Isoproturon Bas Classique	Blé	1000	6440	0,64%	127	0,01%
Lambda cyhalothrine	Colza	5	-	-	-	-
Mesosulfuron	Blé	7,5	60	0,80%	3	0,04%
Metconazole	Blé	45	26	0,06%	1	0,00%
Napropamide Bas intrants	Colza	810	17	0,00%	-	-
Napropamide Classique	Colza	990	45	0,00%	-	-
Prochloraze	Blé	450	-	-	-	-
Prosulfocarbe	Blé	800	1446	0,18%	27	0,00%
Tau-Fluvalinate	Colza	48	-	-	-	-

L'ensemble des flux quotidiens de drainage a été utilisé pour le calcul des transferts de molécules phytosanitaires vers le plan d'eau.

2.3.2. Résultats des simulations pour le ruissellement

La période de transfert d'isoproturon par ruissellement est assez courte et les quantités ruisselées sont élevées (Figure 5). Le transfert d'isoproturon a lieu sur une période de quelques mois après son application. Ceci s'explique par la faible demi-vie de cette substance. Les transferts durant cette période sont plus faibles que ceux observés pour le drainage. Ceci est probablement dû à la faible adsorption de la substance active, elle a tendance à être entraînée par les flux d'eau et elle ne reste pas en surface. Le diflufenicanil, qui a une capacité de sorption plus importante et une demi-vie plus longue, a une période de ruissellement plus longue.

Les résultats de cette simulation donnent une somme des flux d'isoproturon transférés par ruissellement d'environ 339 mg/ha (soit 0,03 % de la dose appliquée). Cette valeur est du même ordre de grandeur que les résultats expérimentaux obtenus sur le site de La Jaillière qui sont compris entre 31 et 10806 mg/ha (Réal, 2006). Les résultats de la simulation sont donc réalistes.

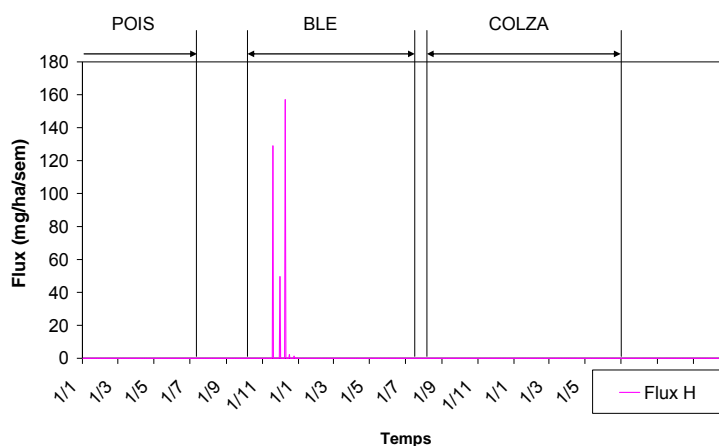


Figure 5. Exemple de résultats de modélisation obtenus - Simulation des flux hebdomadaires en fonction du temps pour l'isoproturon dans les eaux de ruissellement de La Jaillière.

A La Jaillière, le produit phytosanitaire conduisant aux pertes par ruissellement les plus importantes en termes de flux est le diméthachlore en itinéraire classique tandis qu'en termes de pourcentage c'est le boscalid en itinéraire classique. En Brie, le produit phytosanitaire conduisant aux transferts les plus importants en termes de flux est la clomazone en itinéraire classique tandis qu'en termes de pourcentage, c'est l'iodosulfuron. Le passage en itinéraire bas intrants pesticides permet de réduire les flux pour toutes les substances actives (Tableau 5).

L'ensemble des flux quotidiens de ruissellement a été utilisé pour le calcul du transfert de molécules phytosanitaires vers le plan d'eau.

2.3.3. Résultats des simulations pour la dérive

Les courbes de Ganzelmeier ne prenant en compte ni le sol ni le climat, les résultats pour les deux sites sont identiques (Tableau 6).

Le produit phytosanitaire conduisant aux pertes par dérive les plus importantes en termes de flux est le cyprodynil. Le pourcentage de la dose appliquée est toujours le même puisque c'est le principe de l'utilisation des courbes de Ganzelmeier.

Les flux de dérive n'interviennent qu'une seule fois, lors de la date d'application des produits.

Tableau 5. Flux et pourcentages de la dose appliquée transférés par le ruissellement à La Jaillièrre et en Brie. Les "-" indiquent des valeurs de flux inférieures à 1 mg/ha/an.

Produit	Culture	Dose appliquée en g/ha	La Jaillièrre		Brie	
			Flux en mg/ha	En % de la dose appliquée	Flux en mg/ha	En % de la dose appliquée
Azoxystrobine	Blé	125	1	0,00%	11	0,01%
Bifenthrine	Blé	10	2	0,02%	-	-
Boscalid Bas intrants	Colza	200	357	0,18%	446	0,22%
Boscalid Classique	Colza	250	583	0,23%	466	0,19%
Bromoxynil	Blé	62,5	-	-	7	0,01%
Clomazone Bas intrants	Colza	90	27	0,03%	19	0,02%
Clomazone Classique	Colza	120	155	0,13%	34	0,03%
Cyprodinil	Blé	1200	797	0,07%	775	0,06%
Deltaméthrine	Colza	4,41	-	-	-	-
Diflufénicanil Bas intrants	Blé	20	32	0,16%	32	0,16%
Diflufénicanil classique	Blé	125	270	0,22%	199	0,16%
Dimétachlore Bas intrants	Colza	750	140	0,02%	64	0,01%
Dimétachlore Classique	Colza	1000	1627	0,16%	157	0,02%
Epoxiconazole	Blé	62,5	21	0,03%	18	0,03%
Iodosulfuron	Blé	7,5	-	-	21	0,28%
Ioxynil	Blé	37,5	1	0,00%	3	0,01%
Isoproturon Bas intrants	Blé	500	89	0,02%	169	0,03%
Isoproturon Bas Classique	Blé	1000	339	0,03%	177	0,02%
Lambda cyhalothrine	Colza	5	-	-	-	-
Mesosulfuron	Blé	7,5	3	0,04%	2	0,03%
Metconazole	Blé	45	2	0,00%	36	0,08%
Napropamide Bas intrants	Colza	810	192	0,02%	415	0,05%
Napropamide Classique	Colza	990	1418	0,14%	567	0,06%
Prochloraze	Blé	450	366	0,08%	310	0,07%
Prosulfocarbe	Blé	800	416	0,05%	551	0,07%
Tau-Fluvalinate	Colza	48	-	-	-	-

Tableau 6. Flux et pourcentages de la dose appliquée transférés par dérivation à Brie et La Jaillièrre.

Produit	Culture	Dose appliquée en g/ha	La Jaillièrre		Brie	
			Flux en mg/ha	En % de la dose appliquée	Flux en mg/ha	En % de la dose appliquée
Azoxystrobine	Blé	125	261	0,21%	261	0,21%
Bifenthrine	Blé	10	20	0,20%	20	0,20%
Boscalid Bas intrants	Colza	200	418	0,21%	418	0,21%
Boscalid Classique	Colza	250	522	0,21%	522	0,21%
Bromoxynil	Blé	62,5	131	0,21%	131	0,21%
Clomazone Bas intrants	Colza	90	188	0,21%	188	0,21%
Clomazone Classique	Colza	120	250	0,21%	250	0,21%
Cyprodinil	Blé	1200	2509	0,21%	2509	0,21%
Deltaméthrine	Colza	4,41	9	0,20%	9	0,20%
Diflufénicanil Bas intrants	Blé	20	41	0,21%	41	0,21%
Diflufénicanil classique	Blé	125	261	0,21%	261	0,21%
Dimétachlore Bas intrants	Colza	750	1568	0,21%	1568	0,21%
Dimétachlore Classique	Colza	1000	2091	0,21%	2091	0,21%
Epoxiconazole	Blé	62,5	131	0,21%	131	0,21%
Iodosulfuron	Blé	7,5	15	0,20%	15	0,20%
Ioxynil	Blé	37,5	78	0,21%	78	0,21%
Isoproturon Bas intrants	Blé	500	1046	0,21%	1046	0,21%
Isoproturon Bas Classique	Blé	1000	2091	0,21%	2091	0,21%
Lambda cyhalothrine	Colza	5	10	0,20%	10	0,20%
Mesosulfuron	Blé	7,5	15	0,20%	15	0,20%
Metconazole	Blé	45	94	0,21%	94	0,21%
Napropamide Bas intrants	Colza	810	1694	0,21%	1694	0,21%
Napropamide Classique	Colza	990	2070	0,21%	2070	0,21%
Prochloraze	Blé	450	941	0,21%	941	0,21%
Prosulfocarbe	Blé	800	1673	0,21%	1673	0,21%
Tau-Fluvalinate	Colza	48	100	0,21%	100	0,21%

2.3.4. Compilation des résultats des simulations de transfert

Les flux quotidiens de chaque phénomène de transfert ont été additionnés pour obtenir le flux total de produits phytosanitaires dans le plan d'eau. Le calcul des concentrations en substance active a été réalisé en supposant que le plan d'eau était un réceptacle de 30 000 L (1m × 100 m × 0,3 m). L'eau apportée par le ruissellement et par le drainage est supposée sortir du réceptacle après chaque épisode. Les concentrations inférieures à 0,02 µg/L n'ont pas été prises en compte lors des phases expérimentales.

VOLET 2. ANALYSE DES EFFETS DES PESTICIDES TRANSFERES AU PLAN D'EAU SUR LES ORGANISMES AQUATIQUES

1. Expérimentation conduite dans les mésocosmes lentiques de la plate-forme expérimentale de l'INRA de Rennes

1.1. Situation

Les mésocosmes lentiques sont situés sur la plate-forme expérimentale de l'Unité Expérimentale d'Écologie et Écotoxicologie Aquatique (U3E) de l'INRA, localisée sur le site d'Agrocampus Rennes (Figure 6). Ils sont placés à l'air libre, dans les conditions climatiques (température, éclairage, précipitations) naturelles.



Figure 6. Mésocosmes lentiques de la plate-forme expérimentale de l'Unité Expérimentale Écologie et Écotoxicologie Aquatique de l'INRA de Rennes (U3E ; cliché F. Lagadic).

Les expérimentations sont réalisées dans 16 mésocosmes circulaires de 3,2 m de diamètre (volume maximal : 9 m³) organisés en 2 rangées parallèles. Le niveau de l'eau et son renouvellement sont principalement dépendants du cycle précipitation/évaporation. Un système de trop-plein permet d'éviter le débordement des bassins en cas de fortes pluies, et d'assurer un niveau maximal constant (0,9 m), identique entre tous les mésocosmes. En cas d'évaporation trop importante, il est possible de compléter le niveau de l'eau dans les mésocosmes avec de l'eau du réseau.

1.2. Plan expérimental

La figure 7 présente une vue d'ensemble du plan expérimental mis en œuvre. Trois réplicats sont utilisés pour chaque modalité (itinéraire technique × contexte pédoclimatique), quatre mésocosmes étant utilisés comme témoins.

Le plan expérimental a été défini en tenant compte des contraintes suivantes :

- Deux mésocosmes témoins par rangée,
- Pas tous les réplicats d'un même traitement dans une même rangée,
- Pas de réplicats d'un même traitement dans des mésocosmes contigus,
- Répartition des 5 modalités de traitement au sein de 3 groupes de mésocosmes (+ 1 mésocosme témoin supplémentaire) homogènes d'un point de vue environnemental (température, pH, concentrations en nutriments et en chlorophylle *a* dans l'eau, couverture par les macrophytes, abondance des macro-invertébrés benthiques).

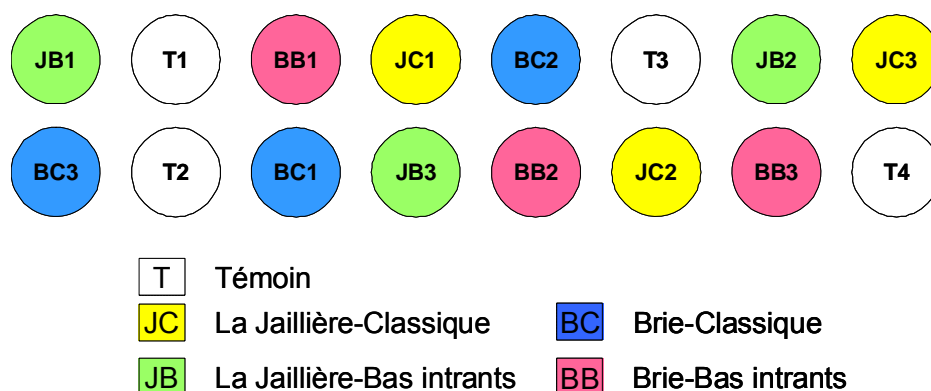


Figure 7. Répartition des traitements entre les différents mésocosmes de la plate-forme expérimentale de l'INRA de Rennes.

1.3. Mise en place

La mise en place des systèmes a débuté en Avril 2008. Une couche de sédiments d'environ 10 cm d'épaisseur a été introduite dans les mésocosmes. Cette couche de sédiments est constituée d'un mélange de sable de Loire (60 %), de bentonite (10 %) et de sédiments naturels (30 %) provenant d'étangs situés sur le site du Rheu (35) de l'U3E et utilisés pour des expérimentations sans contaminants. Des plantes vasculaires (*Glyceria maxima*), implantées dans des jardinières afin de limiter leur expansion, ont également été introduites dans les systèmes expérimentaux, en Mai 2008. Les mésocosmes ont été remplis (niveau initial : 0,9 m) avec de l'eau du réseau d'eau potable de la ville de Rennes.

Du plancton (phytoplancton et zooplancton) provenant de mares et d'étangs utilisés en aquaculture (site du Rheu, U3E) et de pièces d'eau du Parc des Gayeulles (Rennes) a été introduit dans les systèmes en Mai 2008. Des individus de diverses espèces de macro-invertébrés à faible mobilité provenant d'élevages (*Lymnaea stagnalis*) ou de populations naturelles vivant dans des milieux naturels *a priori* non pollués de la région de Rennes (*Asellus aquaticus* et *Proasellus* sp.) ont été introduits en Juin-Juillet 2008.

Suite à la mise en place des mésocosmes, une phase de maturation de 4 mois a permis la colonisation spontanée des systèmes, notamment par diverses espèces d'insectes, et le développement de l'ensemble des communautés. Cette colonisation s'est déroulée à la fois par l'intermédiaire des plantes introduites dans les mésocosmes et par l'arrivée d'imagos

provenant de milieux aquatiques voisins. Diverses espèces de plantes aquatiques (*Zanichellia palustris*, *Myriophyllum* sp., *Elodea* sp.) se sont aussi développées spontanément, sans doute à partir de graines présentes dans les sédiments naturels.

1.4. Contamination

La contamination des mésocosmes est réalisée en fonction des résultats des modélisations effectuées par l'équipe du BRGM (cf. volet 1). Les traitements sont toujours effectués le lundi en début d'après-midi. Lorsqu'un apport par dérive est prévu, la contamination est réalisée à l'aide du produit commercial contenant la substance active concernée. Lorsque que les modélisations prévoient un apport par ruissellement ou par drainage, les solutions de contamination sont préparées à partir de solutions de substances actives pures (solutions aqueuses ou acétoniques en fonction de la substance).

Les solutions de traitement (1 L) sont injectées juste sous la surface de l'eau à l'aide d'un pulvérisateur portatif équipé d'une rampe de 0,80 m de large (Figure 8). Cette méthode de traitement permet de limiter les phénomènes de volatilisation et les risques de contamination croisée entre mésocosmes.



Figure 8. Préparation et application des solutions de traitement (Clichés F. Lagadic).

1.5. Suivi analytique

Des échantillons d'eau destinés à l'analyse des résidus sont prélevés à l'aide de tubes en chlorure de polyvinyle (PVC ; \varnothing : 32 mm, longueur : 1,3 m ; Figure 9) munis à leur extrémité inférieure d'un clapet anti-retour et permettant d'échantillonner l'intégralité de la colonne d'eau (Roucaute & Quemeneur, 2007).

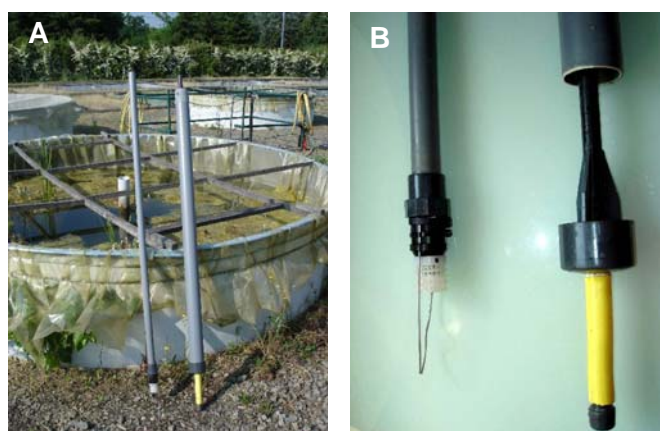


Figure 9. Préleveurs de colonne d'eau utilisés au cours des expérimentations en mésocosmes. A: Vue d'ensemble des deux types de préleveurs (à gauche préleveur à clapet, à droite préleveur à tube coulissant). B : Détail des extrémités des deux types de préleveurs (clichés M. Roucaute).

Les prélèvements sont réalisés dans tous les mésocosmes traités 24 h après la contamination et dans tous les mésocosmes toutes les 3 semaines. Trois échantillons sont prélevés dans chaque mésocosme et réunis en un échantillon composite. Les échantillons sont ensuite placés dans des bouteilles en verre ambré, puis congelés (-20°C) avant transfert au laboratoire du BRGM pour analyse.

Une partie de l'eau prélevée dans les mésocosmes 24 h après les traitements est utilisée pour la réalisation de bioessais *ex situ* (cf. § 2).

1.6. Caractéristiques environnementales

Un suivi permanent de la température de l'air et de l'eau, de la pluviométrie, de la luminosité et du rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) est assuré *in situ*.

La température, le pH, la concentration en oxygène dissous et la conductivité sont mesurés chaque semaine dans l'eau des mésocosmes. Ces mesures sont effectuées au moyen de sondes portables (Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten pour le pH, la concentration en oxygène dissous et Hach pour la concentration en oxygène dissous). Les sondes sont introduites dans un prélèvement d'eau réalisé dans chaque mésocosme au moyen d'un pot en verre (un pot par mésocosme, afin d'éviter les contaminations croisées). Les mesures sont toujours réalisées entre 10 et 11 h le matin afin d'assurer l'homogénéité des données compte tenu de la possibilité de variations diurnes de ces paramètres.

Des prélèvements d'eau sont réalisés une fois par mois afin de déterminer les concentrations en ammonium, en nitrates et en orthophosphates à l'aide de méthodes colorimétriques en utilisant les kits Spectroquant® (Ammonium test 1.14752.0001, Nitrates test 1.14773.0001, Phosphates test 1.14848.0001; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) et un spectrophotomètre WTW (Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten, Champagne au Mont d'or).

1.7. Compartiments biotiques

1.7.1. Producteurs primaires

1.7.1.1. Phytoplancton

La concentration en chlorophylle *a* dans l'eau est déterminée chaque semaine à partir d'échantillons prélevés depuis le 21 octobre 2008 dans la colonne d'eau à l'aide des préleveurs à clapet préalablement décrits (Figure 9; Roucaute & Quemeneur, 2007). Des échantillons sont collectés en 8 points répartis régulièrement dans chacun des mésocosmes puis regroupés dans des bouteilles en polyéthylène opaque de 1,5 L. Des sous-échantillons sont ensuite filtrés sur des filtres en fibre de verre Whatman GF/C (\varnothing : 47 mm, porosité 1,2 μm ; Whatman, International, Maidstone, UK). Les filtres sont placés individuellement dans des tubes en verre dans lesquels 5 mL d'une solution d'acétone et d'eau distillée (90 :10, v/v) sont introduits afin d'extraire les pigments chlorophylliens. Après 12 à 18 h d'extraction à l'obscurité et à 4°C, les concentrations en chlorophylle *a* et en phéopigments dans les extraits sont déterminées par la méthode de Lorenzen (1967). Les mesures d'absorbance des extraits sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre SPECORD 205 (analytikjena).

Des prélèvements sont effectués dans la colonne d'eau des mésocosmes toutes les semaines depuis le 21 octobre à l'aide de préleveurs spécifiquement fabriqués par l'U3E (Figure 9; Hanson *et al.*, 2007; Roucaute et Quemeneur, 2007). Des échantillons d'eau sont prélevés en 6 à 8 points répartis régulièrement dans chaque mésocosme et regroupés dans un container de 30 L pour former un échantillon composite de 10 L qui sert à la fois pour l'étude du phytoplancton et du zooplancton. Un sous-échantillon de 125 mL est prélevé dans

un flacon en verre ambré et fixé par ajout de Lugol. L'abondance des différents groupes taxonomiques est déterminée par identification et comptage des cellules algales dans des sous-échantillons placés dans des cuves à sédimentation et analysés grâce à un microscope inversé couplé à une caméra numérique.

1.7.1.2. Périphyton

Des prélèvements de périphyton sont effectués à l'aide de lames de verre pour microscopie (Figure 10A et B ; surface totale 19,8 cm²). Ces lames sont disposées sur un support en PVC et suspendues à 20 cm sous la surface de l'eau. Trois supports comportant chacun 5 lames (Figure 10B) sont disposés dans chacun des mésocosmes. Après 3 semaines d'immersion, les lames sont collectées et conservées à -20°C. Elles sont alors remplacées par de nouvelles lames.

Une des faces de chacune des lames de verre sera utilisée afin de mesurer la concentration en chlorophylle *a* et en phéopigments du périphyton tandis que l'autre face sera utilisée pour mesurer le poids sec sans cendres du périphyton (APHA, 1975).

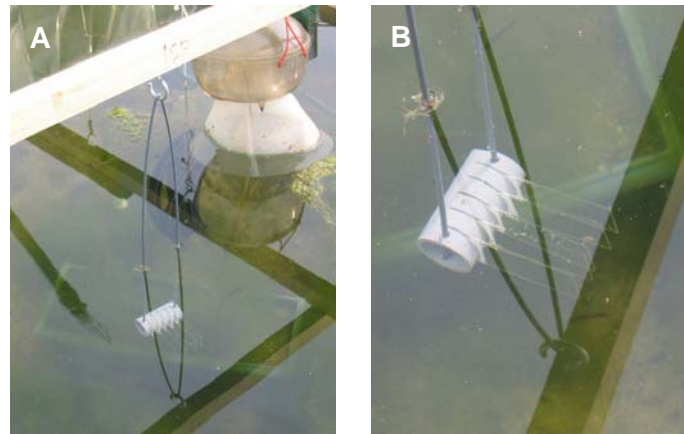


Figure 10. Dispositifs utilisés pour l'échantillonnage du périphyton (clichés Th. Caquet). A: Échantillonneur pour le périphyton suspendu dans la colonne d'eau ; B : Vue rapprochée de l'échantillonneur.

1.7.2. Zooplancton

Des prélèvements sont effectués dans la colonne d'eau des mésocosmes toutes les semaines depuis le 21 octobre comme décrit précédemment. Après agitation pour l'homogénéiser et prélèvement du sous-échantillon destiné à l'analyse taxonomique du phytoplancton, la totalité de l'échantillon est filtrée au travers d'un filet en nylon de 30 µm de vide de maille. Le contenu du filet est ensuite été placé dans un flacon en polyéthylène de 50mL et fixé par ajout d'une solution aqueuse neutralisée de formaldéhyde (4 %, v/v), contenant du sucrose (40 g/L) et du rose Bengale (250 µg/L).

Les organismes présents dans les échantillons sont dénombrés et identifiés par observation à la loupe binoculaire (grossissement maximal × 75).

1.7.3. Macro-invertébrés

La communauté de macro-invertébrés est étudiée grâce à la mise en œuvre d'un échantillonnage stratifié basé sur l'emploi de substrats artificiels et de pièges à émergence (Caquet *et al.*, 2007). L'utilisation de ce type de pièges dans les mésocosmes mis en œuvre pour cette étude a été validée lors d'expérimentations précédentes (Caquet *et al.*, 2001). Les organismes vivant à la surface des sédiments sont échantillonnés à l'aide de 3 substrats artificiels constitués de 5 plaques d'ardoise (surface totale d'échantillonnage : 0,4 m²). Les organismes vivant au voisinage ou à la surface des macrophytes sont, quant à eux, échantillonnés avec trois dispositifs composés de 4 tubes en polyéthylène (diamètre externe : 2,5 cm ; 40 cm de longueur ; Figure 11). Toutes les 3 semaines depuis le 28 octobre 2008, les deux types de substrats artificiels sont collectés, lavés avec de l'eau sous pression sur un tamis de vide de maille de 500 µm afin de récupérer les organismes présents à leur surface, puis réintroduits dans le mésocosme d'où ils proviennent.

En complément, les imagos d'insectes à larve aquatique et stade adulte aérien sont échantillonnés à l'aide de 3 pièges à émergence (Figure 11) disposés dans chaque mésocosme. Le contenu des pièges est récupéré toutes les semaines.

Les organismes présents dans l'eau de lavage des substrats artificiels sont fixés et conservés dans une solution aqueuse neutralisée d'éthanol 70% (v/v). Au laboratoire, les invertébrés sont dénombrés et identifiés à l'aide d'une loupe binoculaire (grossissement maximum : × 40) à l'aide de divers ouvrages (Bertrand, 1954 ; Henderson, 1990 ; Wallace *et al.*, 1990 ; Nilson, 1996 ; Tachet, 2000), jusqu'au niveau de la famille ou de la sous-famille.



Figure 11. Piège à émergence (à gauche) et piège en tubes (à droite) pour l'échantillonnage des macro-invertébrés dans les mésocosmes lenticques.

1.7.4. Dégradation de la litière

Afin d'évaluer les effets des traitements sur la fonctionnalité écologique des systèmes expérimentaux, une étude de la dynamique de la dégradation de la litière d'aulne a été mise en place. Trois expérimentations, ou campagnes, ont été réalisées à différentes saisons : campagne n°1 en automne 2008, campagne n°2 au printemps 2009 et campagne n°3 en automne 2009, chacune d'elle durant 4 semaines.

Pour chaque campagne, des lots de masse connue ($3 \pm 0,1$ g) de feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*) collectées en automne et séchées à l'air libre ont été pesés et introduits dans deux types de pochettes (Figure 12), des pochettes à grandes mailles (filets en polyéthylène, vide de maille 5 mm) et des pochettes à mailles fines (filets en nylon, vide de maille 0,25 mm).

Dans le premier type de pochettes, la dégradation de la litière est supposée être liée à la fois à l'action des macro-invertébrés détritivores et des micro-organismes tandis que dans le second type la dégradation est uniquement liée aux micro-organismes.



Figure 12. Pochettes à grandes mailles (à gauche) et à petites mailles (à droite) utilisées pour l'étude de la dégradation de la litière d'aulne en mésocosmes.



Figure 13. Collecte des pochettes de feuilles mortes ; ouverture des pochettes ; découpage de sous-échantillons ; collecte des invertébrés présents (clichés F. Lagadic).

Au début de chaque campagne, 9 pochettes de chaque type ont été déposées délicatement au fond de chaque mésocosme. Trois pochettes de chaque type ont ensuite été collectées 2, 3 puis 4 semaines après immersion puis ramenées au laboratoire pour en analyser le contenu (Figure 13). Les restes de feuilles ont soigneusement récupérés et rincés à l'eau distillée. Des sous-échantillons (\varnothing 10 mm) ont été prélevés à l'aide d'un emporte-pièce et placés à -80°C ; ils ont été utilisés pour l'estimation de la biomasse de champignons hyphomycètes *via* la mesure de la concentration en ergostérol (voir 1.7.5). Le reste des

feuilles a été séché à l'étuve à 60°C et pesé. Les macro-invertébrés présents dans les pochettes ont été récupérés et fixés en vue de leur dénombrement et de leur identification.

La vitesse de fragmentation des feuilles a été estimée par le coefficient k (j^{-1}) de la fonction exponentielle négative qui relie la biomasse de feuilles et le temps (Chauvet, 1987). L'estimation du coefficient k a été obtenue par régression non-linéaire faisant appel aux moindres carrés ordinaires comme critère d'ajustement :

$$B(t) = B_i \times e^{-k.t}$$

où B_i est la biomasse initiale de feuilles (g), t correspond à la durée de l'expérimentation (j).

1.7.5. Quantification de l'ergostérol, indicateur de la biomasse fongique présente sur les feuilles d'aulne

L'ergostérol (3 β -Hydroxy-5,7,22-ergostatriène ou Provitamine D₂) est un stérol de la paroi cellulaire mycélienne, couramment utilisé comme indicateur de la biomasse fongique. Dans le cadre du programme EMERITAT, la quantification de l'ergostérol a permis d'estimer la biomasse fongique présente sur les feuilles d'aulnes immergées dans les différents mésocosmes (voir 1.7.4).

Après avoir ouvert les pochettes grandes mailles et petites mailles, récupéré puis rincé les feuilles d'aulnes, des disques de feuilles ont été prélevés à l'aide d'un emporte-pièce. Les échantillons ainsi prélevés ont été placés au congélateur jusqu'à leur utilisation. Préalablement à l'analyse, les échantillons ont été lyophilisés pendant 24 h afin de pouvoir exprimer la quantité d'ergostérol présente en μ g/gramme de feuille.

Pour l'extraction de l'ergostérol, pouvant se trouver sous forme estérifiée, il est nécessaire de réaliser une étape de saponification. L'extraction-saponification a été réalisée dans une solution de KOH à 8 g/L dans le méthanol et s'est déroulée en 2 temps : d'abord à froid (4°C) et à l'obscurité pendant toute une nuit, puis à chaud (80°C) pendant 30 min. Après refroidissement de l'extrait obtenu, une purification a été réalisée par extraction en phase solide (SPE) sur des cartouches de type Oasis[®] HLB (Waters). L'extrait ainsi purifié a été analysé par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un détecteur à barrette de diodes. L'ergostérol est caractérisé à la fois par son temps de rétention et par l'allure de son spectre d'absorption.

1.8. Synthèse et interprétation des résultats de l'étude en mésocosmes

1.8.1. Caractéristiques physico-chimiques de l'eau des mésocosmes

Les valeurs moyennes de température, de concentration en oxygène dissous, de pH, de conductivité, et de concentrations en nutriments azotés (nitrates et ammonium) et phosphorés (PO₄³⁻) dans l'eau des mésocosmes sont présentées dans les tableaux 7 et 8 pour les itinéraires techniques de protection du blé et du colza, respectivement.

L'analyse de ces données montre que les caractéristiques physico-chimiques de l'eau n'ont été affectées ni par les traitements, ni par les variations saisonnières interannuelles (période d'application des pesticides correspondant à l'itinéraire technique de protection du blé : novembre 2008-juillet 2009 ; période d'application des pesticides correspondant à l'itinéraire technique de protection du colza : septembre 2009-août 2010).

Tableau 7. Moyenne (ES) et intervalle de variation (min-max) des paramètres physico-chimiques mesurés dans l'eau des mésocosmes pour les 5 modalités de traitement correspondant à l'itinéraire technique de protection du blé (J.CLA: Jaillière classique ; B.CLA: Brie classique ; J. BIP: Jaillière bas intrants pesticides ; B.BIP: Brie bas intrants pesticides).

Paramètre	Unité	Témoïn		J.CLA		B.CLA		J.BIP		B.BIP	
		Moyenne (ES ^a)	min-max ^b	Moyenne (ES ^a)	min-max	Moyenne (ES ^a)	min-max	Moyenne (ES ^a)	min-max	Moyenne (ES ^a)	min-max
Température	C°	13.5 (0.4)	4.5-26.2	13.5 (0.5)	4.4-25.9	13.6 (0.5)	4.3-26.2	13.5 (0.5)	4.3-25.8	13.6 (0.5)	4.2-26.1
[Oxygène dissous]	mg/L	12 (0.18)	4.7-17.2	11.86 (0.15)	5.9-14.5	12.1 (0.14)	5.18-13.9	12 (0.18)	4.7-15.7	11.9 (0.2)	4.5-14.9
pH		9.14 (0.04)	7.4-10.1	9.11 (0.04)	7.9-10.1	9.2 (0.04)	8.11-9.9	9.1 (0.05)	7.6-10.3	9.18 (0.05)	7.6-10
Conductivité	µS/cm	291.9 (2.7)	228-401	303.4 (3.8)	233-430	309 (3.5)	247-409	301 (3.81)	238-424	300 (3)	237-390
[NO ³⁻]	mg/L	4.81 (1.32)	0.9-15.3	6.12 (2)	1.1-6.5	4.61 (1.02)	0.5-33.9	3.97 (0.75)	1.1-27.9	4.21 (1.09)	1.3-40.2
[PO ₄ ³⁻]	mg/L	0.02 (0.003)	ND ^c -0.06	0.01 (0.003)	ND-0.02	0.01 (0.003)	ND-0.06	0.01 (0.003)	ND-0.07	0.01 (0.003)	ND-0.07
[NH ₄ ⁺]	mg/L	0.02 (0.005)	ND-0.29	0.019 (0.002)	ND-0.05	0.02 (0.001)	ND-0.009	0.02 (0.002)	ND-0.08	0.02 (0.001)	ND-0.04

^a ES = erreur standard de la moyenne.

^b Intervalle (minimum au maximum) pour l'ensemble de la période Blé.

^c ND = non détecté.

Tableau 8. Moyenne (ES) et intervalle de variation (min-max) des paramètres physico-chimiques mesurés dans l'eau des mésocosmes pour les 5 modalités de traitement correspondant à l'itinéraire technique de protection du colza (J.CLA: Jaillière classique ; B.CLA: Brie classique ; J. BIP: Jaillière bas intrants pesticides ; B.BIP: Brie bas intrants pesticides).

Paramètre	Unité	Témoïn		J.CLA		B.CLA		J.BIP		B.BIP	
		Moyenne (ES ^a)	min-max ^b	Moyenne (ES ^a)	min-max	Moyenne (ES ^a)	min-max	Moyenne (ES ^a)	min-max	Moyenne (ES ^a)	min-max
Température	C°	14.7 (0.4)	3.5-24.5	14.7 (0.4)	3.7-24.4	14.8 (0.4)	3.8-24.6	14.7 (0.4)	3.5-24.6	14.7 (0.4)	3.3-24.6
[Oxygène dissous]	mg/L	12.7 (0.17)	4.9-19.6	11.4 (0.18)	5.5-18.5	11.7 (0.26)	1.39-20	12.3 (0.21)	3.4-18.6	11.7 (0.19)	6.3-18.5
pH		9.26 (0.04)	7.6-10.56	8.79 (0.05)	7.6-10.5	8.9 (0.07)	7.57-10.8	9.18 (0.06)	7.5-10.7	8.9 (0.07)	7.5-10.5
Conductivité	µS/cm	294.46 (3.83)	138-466	317.2 (3.34)	167-414	319.4 (4.36)	188-448	292.58 (4.3)	144-434	319.4 (4.22)	162-440
[NO ³⁻]	mg/L	1.437(0.222)	ND-1.388	1.456 (0.259)	ND-4.1	1.363 (0.247)	ND-3.9	1.48 (0.265)	ND-4	1.365 (0.231)	ND-3.8
[PO ₄ ³⁻]	mg/L	0.029 (0.003)	ND-0.06	0.0226 (0.003)	ND-0.06	0.029 (0.003)	ND-0.07	0.032 (0.004)	ND-0.09	0.026 (0.003)	ND-0.08
[NH ₄ ⁺]	mg/L	0.022 (0.001)	0.009-0.062	0.021 (0.002)	0.01-0.052	0.023 (0.002)	0.01-0.059	0.027 (0.005)	0.01-0.16	0.021 (0.001)	0.009-0.042

^a ES = erreur standard de la moyenne.

^b Intervalle (minimum au maximum) pour l'ensemble de la période Colza.

^c ND = non détecté.

1.8.2. Evolution au cours du temps des concentrations en résidus dans l'eau

1.8.2.1. Temps de demi-vie

Les valeurs de concentration en résidus mesurées dans la colonne d'eau des mésocosmes contaminés ont été utilisées pour déterminer le temps de demi-vie des différentes substances dans l'eau. En première approximation, nous avons retenu l'hypothèse selon laquelle la substance active formulée et la substance active pure présentent la même cinétique de disparition à partir de la phase aqueuse. Le modèle suivant a été ajusté aux données par la méthode des moindres carrés non linéaires :

$$C_j(t) = \sum_{i=1}^n a_i e^{-\left[\frac{\ln(2)}{t_{0.5}}\right](t-t_i)}$$

où : $C_j(t)$ est la concentration du pesticide j au temps t , n est le nombre total de traitements, t_i est le temps écoulé entre le premier traitement et le traitement i ($t_i=0$), $t_{0.5}$ est le temps de demi-vie et a_i est la concentration introduite au temps i .

Sur la base des valeurs correspondantes du coefficient de détermination, l'ajustement de l'équation aux données expérimentales était de très bonne qualité pour la plupart des substances (Tableau 9).

Dans le cas des pyréthrinoïdes, les résultats sont à considérer avec précaution car ces substances sont en général très fugaces en phase aqueuse. Compte tenu du plan d'échantillonnage retenu, les données exploitables sont souvent peu nombreuses. Le cas extrême est celui de la deltaméthrine pour laquelle aucune concentration mesurable n'a été quantifiée 24 h après l'application (seules des traces ont été détectées), ce qui est cohérent avec les données disponibles sur le devenir de cette molécule dans les milieux aquatiques (voir par exemple Hanson *et al.*, 2007).

Tableau 9. Moyenne (\pm ES) des valeurs du coefficient de détermination (r^2) obtenues pour l'ajustement du modèle décrivant la dynamique des résidus des différentes substances utilisées (- : substance non utilisée ; B.BIP : Brie bas intrants pesticides ; B.CLA : Brie classique ; J. BIP : Jaillière bas intrants pesticides ; J.CLA : Jaillière classique ; NC : non calculé).

Substance	B.BIP	B.CLA	J.BIP	J.CLA
Azoxystrobine	-	0,964 \pm 0,008	-	0,914 \pm 0,039
Bifenthrine	-	0,921 \pm 0,010	-	0,963 \pm 0,002
Boscalide	0,834 \pm 0,037	0,771 \pm 0,086	0,843 \pm 0,048	0,550 \pm 0,063
Bromoxynil	0,944 \pm 0,018	-	0,956 \pm 0,015	-
Clomazone	0,958 \pm 0,011	0,974 \pm 0,003	0,979 \pm 0,006	0,965 \pm 0,027
Cyprodinil	0,974 \pm 0,006	-	0,983 \pm 0,006	-
Deltaméthrine	NC	NC	NC	NC
Diflufénicanil	0,847 \pm 0,055	0,916 \pm 0,012	0,748 \pm 0,038	0,816 \pm 0,016
Diméthachlore	0,978 \pm 0,004	0,912 \pm 0,078	0,976 \pm 0,014	0,958 \pm 0,027
Epoxiconazole	0,880 \pm 0,030	0,961 \pm 0,012	0,902 \pm 0,021	0,963 \pm 0,019
Iodosulfuron CH3	-	0,774 \pm 0,112	-	0,764 \pm 0,015
Ioxynil	0,869 \pm 0,053	-	0,954 \pm 0,013	-
Isoproturon	0,955 \pm 0,023	0,981 \pm 0,004	0,977 \pm 0,006	0,988 \pm 0,002
Lambda cyhalothrine	-	0,677 \pm 0,052	-	0,935 \pm 0,014
Mesosulfuron CH3	-	0,831 \pm 0,037	-	0,893 \pm 0,015
Metconazole	-	0,961 \pm 0,015	-	0,958 \pm 0,026
Napropamide	0,999 \pm 0	0,999 \pm 0	0,999 \pm 0	0,999 \pm 0
Prochloraz	-	0,960 \pm 0,023	-	0,968 \pm 0,008
Prosulfocarbe	0,952 \pm 0,02	-	0,917 \pm 0,046	-
Tau-fluvalinate	-	0,714 \pm 0,267	-	0,974 \pm 0,013

Les résultats obtenus pour les substances utilisées dans les itinéraires techniques de protection du blé et du colza sont présentés dans les figures 14 et 15, respectivement. Les valeurs moyennes de temps de demi-vie ont été comparées entre elles à l'aide d'une analyse de variance à 1 (substances utilisées uniquement dans un type d'itinéraire technique ; facteur = situation agropédoclimatique) ou 2 facteurs (substances utilisées dans tous les itinéraires techniques ; facteurs = type d'itinéraire technique, situation agropédoclimatique et interaction entre les deux).

Pour la majorité des substances, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différentes modalités expérimentales. Pour la bifenthrine, la lambda-cyhalothrine, le prochloraz et le prosulfocarbe, l'ANOVA à un facteur a mis en évidence une différence significative entre situations agropédoclimatiques. Pour le diflufénicanil, l'ANOVA à deux facteurs a mis en évidence un temps de demi-vie significativement plus élevé pour l'itinéraire bas-intrants pesticides par rapport à l'itinéraire classique. En revanche, aucun effet de la situation agropédoclimatique n'a été montré.

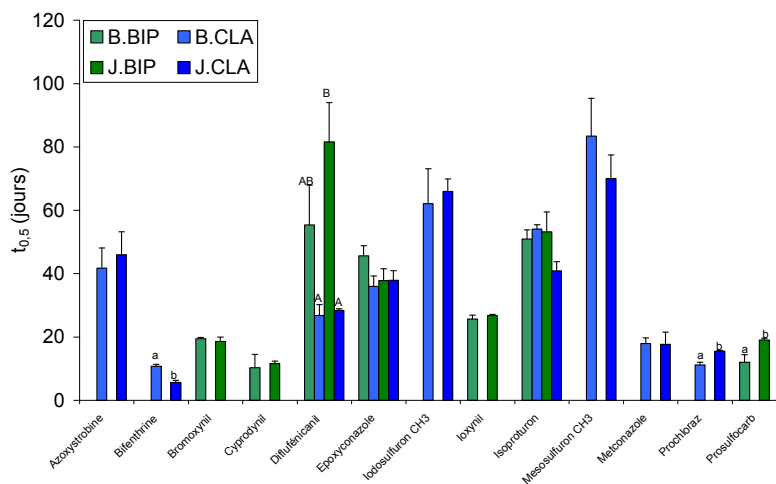


Figure 14. Temps de demi-vie ($t_{0,5}$, en jours) moyen (+ ES) des substances utilisées dans les itinéraires techniques de protection du blé (B.BIP : Brie bas intrants pesticides ; B.CLA : Brie classique ; J. BIP : Jaillière bas intrants pesticides ; J.CLA : Jaillière classique ; les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes entre situations agropédoclimatiques dans le cas des lettres minuscules et entre itinéraires techniques dans le cas des lettres majuscules).

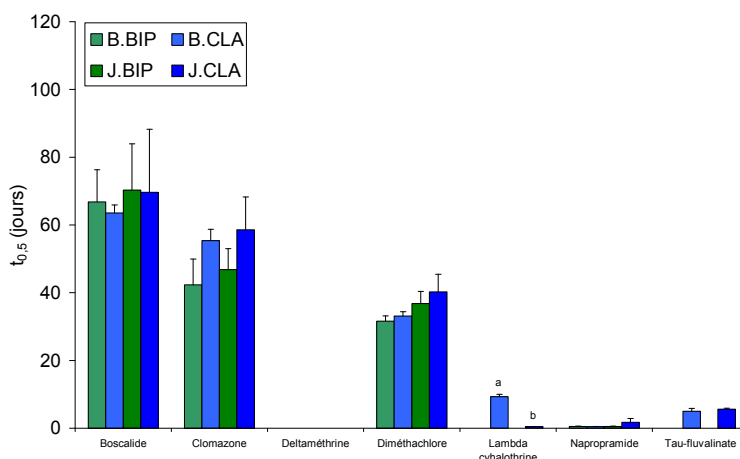


Figure 15. Temps de demi-vie moyen ($t_{0,5}$, en jours) (+ ES) des substances utilisées dans les itinéraires techniques de protection du colza (B.BIP : Brie bas intrants pesticides ; B.CLA : Brie classique ; J. BIP : Jaillière bas intrants pesticides ; J.CLA : Jaillière classique ; les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes entre situations agropédoclimatiques).

Selon la classification proposée par la Footprint Pesticide Properties Database (FPPDB), quatre catégories peuvent être définies pour la stabilité d'une substance active sur la base d'expérimentations réalisées en laboratoire, exprimée par son temps de demi-vie ($t_{0,5}$) dans la phase aqueuse d'un système eau-sédiments :

- A : $t_{0,5} < 1$ j = Dégradation rapide
- B : $1 < t_{0,5} < 14$ j = Dégradation modérément rapide
- C : $14 < t_{0,5} < 30$ j = Dégradation lente
- D : > 30 j = Stable

Le tableau 10 présente la comparaison des résultats obtenus au cours de ce programme avec les données de la Footprint Pesticide Properties Database. Pour quatre des substances étudiées au cours de ce programme (boscalide, clomazone, diflufenicanil et lambda-cyhalothrine), aucune donnée de ce type n'est disponible dans la base de données.

Tableau 10. Stabilité dans l'eau des substances utilisées au cours de ce programme selon la Footprint Pesticide Properties Database (FPPDB) et selon les données expérimentales obtenues en mésocosmes (voir le texte pour la définition des différentes catégories de stabilité ; B.BIP : Brie bas intrants pesticides ; B.CLA : Brie classique ; J. BIP : Jaillière bas intrants pesticides ; J.CLA : Jaillière classique ; - : données non disponibles).

Substance	FPPDB	B.BIP	B.CLA	J.BIP	J.CLA
Azoxystrobine	D	-	D	-	D
Bifenthrine	B	-	B	-	B
Boscalide	-	D	D	D	D
Bromoxynil	B	C	C	C	C
Clomazone	-	D	D	D	D
Cyprodinil	B	B	B	B	B
Deltaméthrine	B	A	A	A	A
Diflufénicanil	-	D	C	D	C
Diméthachlore	B	D	D	D	D
Epoxiconazole	D	D	D	D	D
Iodosulfuron CH3	C	-	D	-	D
Ioxynil	B	C	-	C	-
Isoproturon	D	D	D	D	D
Lambda cyhalothrine	-	-	B	-	B
Mesosulfuron CH3	D	-	D	-	D
Metconazole	B	-	C	-	C
Napropamide	C	A	A	A	B
Prochloraze	D	-	B	-	B
Prosulfocarbe	B	B	-	B	-
Tau-fluvalinate	B	-	B	-	B

Même si les conditions dans lesquelles les essais en système eau-sédiment ont été réalisés sont très différentes de celles qui règnent en mésocosmes, il y a une très bonne cohérence entre les deux types de données pour l'azoxystrobine, la bifenthrine, le cyprodinil, l'époxiconazole, l'isoproturon, le mésosulfuron-méthyl, le prosulfocarbe et le tau-fluvalinate. Le bromoxynil, le diméthachlore, l'iodosulfuron-méthyl et le metconazole ont présenté des temps de demi-vie en mésocosmes supérieurs aux données issues des dossiers réglementaires. A l'inverse, le napropamide a disparu très rapidement ($t_{0,5}$ moyenne \pm ES = 0,804 \pm 0,29 j) alors que cette substance est considérée comme moyennement stable ($t_{0,5}$ de 28 j dans l'eau d'un système eau-sédiment selon la FPPDB). Cette différence est vraisemblablement liée en grande partie au fait que le napropamide est très sensible à la photolyse ($t_{0,5} \approx 7$ min mesuré en conditions d'ensoleillement naturel en juin ; Donaldson & Miller, 1996). Le boscalide est une substance non sensible à l'hydrolyse et à la photolyse en conditions de laboratoire (Pesticide Expert Committee, 2004), ce qui est cohérent avec le temps de demi-vie long ($t_{0,5}$ moyen \pm ES = 50,8 \pm 3,6 j) déterminé au cours de ce programme. En ce qui concerne la clomazone ($t_{0,5}$ moyen \pm ES = 67,6 \pm 5,4 j), des essais réalisés en rizières ont permis de déterminer un temps de demi-vie dans l'eau de 5 j pour cette substance (California Department of Pesticide Regulation, 2003). Les informations présentes dans le dossier de l'Efsa consacré au diflufénicanil (EFSA, 2007) indiquent des valeurs de temps de demi-vie dans la phase aqueuse de systèmes eau-sédiment comprises entre 20 et 104 j, qui encadrent la valeur moyenne mesurée dans les mésocosmes utilisés ici ($t_{0,5}$ moyen \pm e.s. = 48,0 \pm 7,8 j). Dans une étude menée dans des canaux expérimentaux mésotrophes et eutrophes, Roessink *et al.* (2005) ont mis en évidence un taux de disparition de la lambda-cyhalothrine à partir de la colonne d'eau identique dans les deux cas, avec

seulement 30 % de la concentration nominale restant dans la phase aqueuse 1 jour après l'application. Ce résultat est du même ordre de grandeur que celui obtenu au cours de cette étude ($t_{0,5}$ moyen \pm ES = $4,9 \pm 1,4$ j).

1.8.2.2. Estimation de l'exposition

Afin de caractériser l'exposition des communautés aux différentes substances, la concentration pondérée d'exposition de chaque substance (*Average Exposure Concentration* – AEC) a été calculée selon la formule suivante (van Wijngaarden *et al.*, 1996) :

$$AEC_j = \frac{\sum_{i=1}^n \bar{c}_{i,j} \times \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n \Delta t_i}$$

où : j est la substance considérée, i est la date d'échantillonnage, $c_{i,j}$ est la concentration dans l'eau de la substance j au temps t_i et $\bar{c}_i = (c_i + c_{i-1})/2$, $\Delta t_i = t_i - t_{i-1}$.

Les résultats obtenus pour les substances utilisées dans les itinéraires techniques de protection du blé et du colza sont présentés dans les figures 16 et 17. Les valeurs moyennes de concentration pondérée d'exposition ont été comparées entre elles à l'aide d'une analyse de variance à 1 (substances utilisées uniquement dans un type d'itinéraire technique ; facteur = situation agropédoclimatique) ou 2 facteurs (substances utilisées dans tous les itinéraires techniques ; facteurs = type d'itinéraire technique, situation agropédoclimatique et interactions entre les deux).

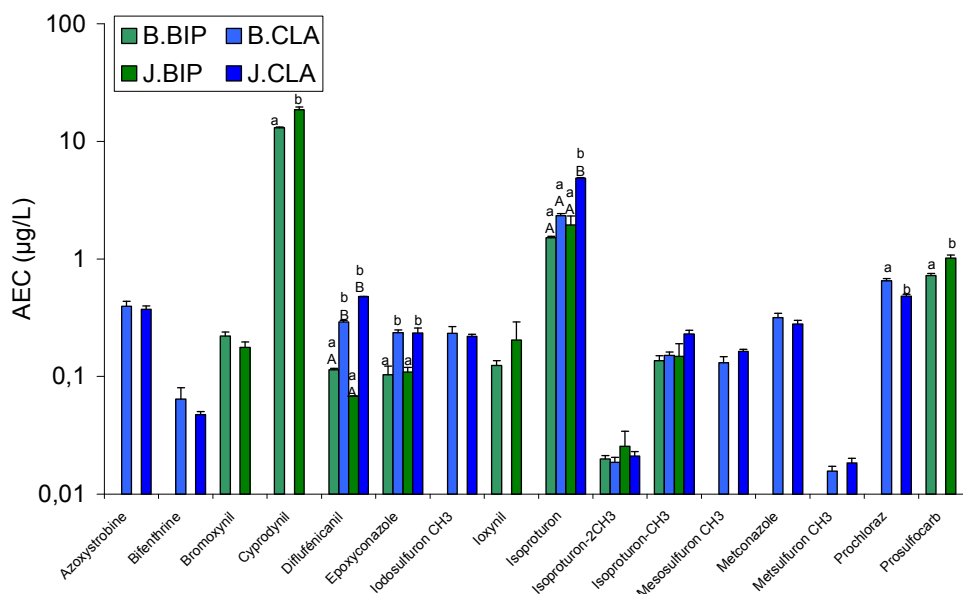


Figure 16. Valeurs moyennes (+ ES) des concentrations pondérées d'exposition (AEC, en µg/L) des différentes substances utilisées dans les itinéraires techniques de protection du blé et de certains de leurs produits de dégradation (B.BIP : Brie bas intrants pesticides ; B.CLA : Brie classique ; J. BIP : Jaillièrre bas intrants pesticides ; J.CLA : Jaillièrre classique ; les lettres différentes indiquent des valeurs moyennes significativement différentes entre situations agropédoclimatiques dans le cas des lettres minuscules et entre itinéraires techniques dans le cas des lettres majuscules).

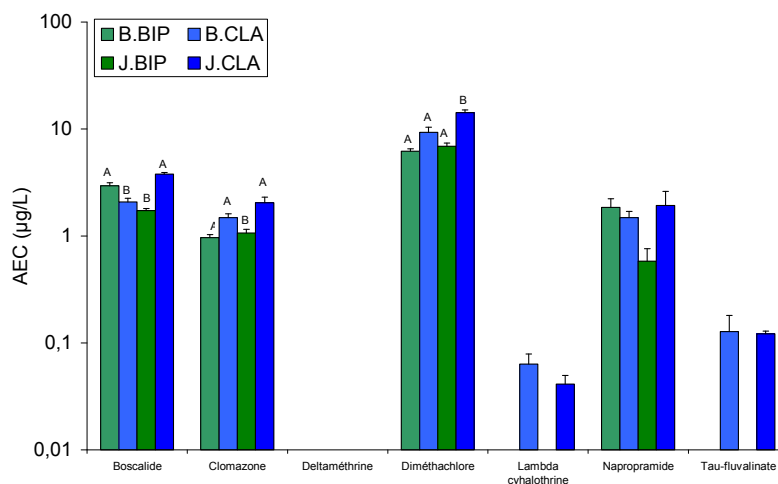


Figure 17. Valeurs moyennes (+ ES) des concentrations pondérées d'exposition (AEC, en µg/L) des différentes substances utilisées dans les itinéraires techniques de protection du blé et de certains de leurs produits de dégradation (B.BIP : Brie bas intrants pesticides ; B.CLA : Brie classique ; J. BIP : Jaillière bas intrants pesticides ; J.CLA : Jaillière classique ; les lettres différentes indiquent des valeurs moyennes significativement différentes entre situations agropédoclimatiques dans le cas des lettres minuscules et entre itinéraires techniques dans le cas des lettres majuscules).

Pour la majorité des substances, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différentes modalités expérimentales. Pour le cyprodinil, le prochloraz et le prosulfocarbe, l'ANOVA à un facteur a montré une différence significative entre situations agropédoclimatiques (AEC plus élevée dans la situation "Jaillière" pour le cyprodinil et le prosulfocarbe ; AEC plus élevée dans la situation "Brie" pour le prochloraze). Pour la clomazone, le diflufenicanil, le diméthachlore et l'époxyconazole, l'ANOVA à deux facteurs a mis en évidence une AEC significativement plus élevée pour l'itinéraire classique, sans influence de la situation agropédoclimatique. Pour l'isoproturon, des valeurs d'AEC significativement plus élevées ont été mesurées dans les mésocosmes exposés à la modalité de traitement "Jaillière Classique".

1.8.2.3. Niveau de risque théorique associé aux substances utilisées

Les valeurs de concentrations en résidus mesurées dans la colonne d'eau des mésocosmes contaminés ont été utilisées pour estimer, à chaque date d'échantillonnage, le niveau de risque associé (Unités Toxiques UT) pour les producteurs primaires et les invertébrés aquatiques a été déterminé selon la formule :

$$UT_{i,j,t} = \frac{C_{i,t}}{CE50_{i,j}}$$

où : i est la substance considérée, j est l'espèce ou le groupe de référence (*Pseudokirchneriella subcapitata* ou une autre algue verte pour les producteurs primaires, *Daphnia magna* pour les invertébrés aquatiques), t est la date d'échantillonnage, $C_{i,t}$ est la concentration moyenne dans l'eau de la substance i au temps t pour les trois répliquats d'une même modalité de traitement et $CE50_{i,j}$ est la concentration de référence pour la toxicité aiguë de la substance i pour le groupe j .

Le tableau 11 regroupe les valeurs de référence utilisées au cours de ce travail pour la détermination des valeurs d'Unités Toxiques. Lorsque plusieurs valeurs étaient disponibles pour une même espèce de référence, c'est la moyenne géométrique de ces valeurs qui a été utilisée. Les figures 18 à 25 présentent les résultats correspondants.

Tableau 11. Valeurs de référence de toxicité aiguë (à 24 ou 72 h) pour les algues vertes et *Daphnia magna* utilisées pour la détermination des valeurs d'UT (sources : Agritox et Footprint PPDB).

Substance	CE ₅₀ Algues vertes (µg/L)	CE ₅₀ <i>Daphnia magna</i> (µg/L)
Azoxystrobine	360 ^a	280
Bifenthrine	50000 ^b	0,11
Boscalide	1340 ^a	5330
Bromoxynil	220 ^a	46
Clomazone	2900 ^a	5200
Cyprodinil	2600 ^a	33
Deltaméthrine	9100 ^c	0,56
Diflufénicanil	2,44 ^b	240
Diméthachlore	53 ^b	14200
Epoxiconazole	1190 ^a	8690
Iodosulfuron CH3	70 ^a	10000
loxynil	4600 ^b	11
Isoproturon	35 ^a	580
Lambda cyhalothrine	300 ^a	0,487
Mésosulfuron CH3	200 ^a	10000
Metconazole	1700 ^a	4200
Napropamide	3400 ^a	24000
Prochloraze	577,2 ^a	630
Prosulfocarbe	113 ^b	1300
Tau-fluvalinate	2200 ^b	25,8

^a : *Pseudokirchneriella subcapitata* ; ^b : *Scenedesmus subspicatus* ; ^c : autre espèce d'algue verte.

Sur la base de l'analyse d'études en mésocosmes, Brock *et al.* (2000a, 2000b) ont proposé des seuils pour les valeurs d'Unités Toxiques au-delà desquels des effets sont susceptibles de se produire pour les producteurs primaires ou les invertébrés aquatiques :

- pour les producteurs primaires : $UT_{\text{Algues vertes}} > 0,1$,
- pour les invertébrés aquatiques : $UT_{\text{Daphnia}} > 0,01$ ou 0,1, selon les substances.

1.8.2.3.1. Itinéraire technique "classique"

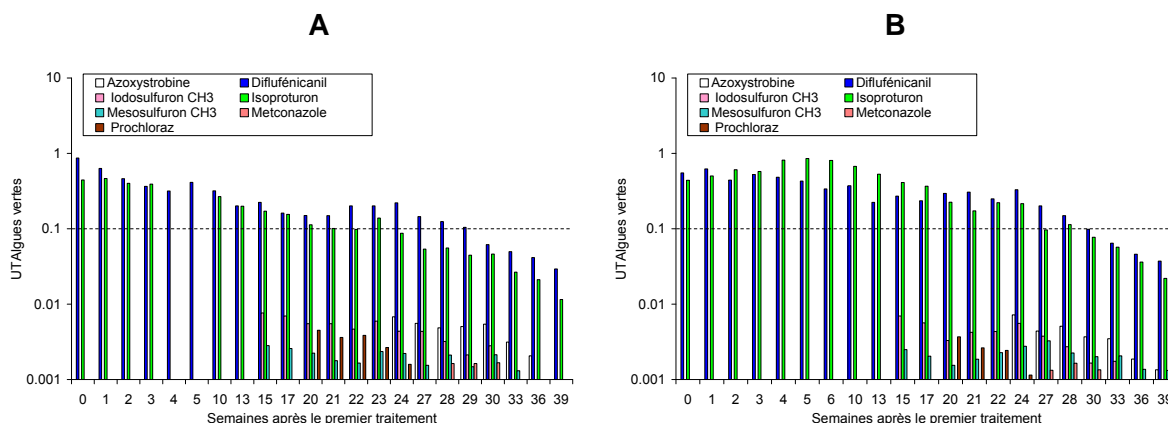


Figure 18. Valeurs moyennes des UT pour les microalgues vertes dans le cas de l'itinéraire technique "classique" de protection du blé pour les deux situations agropédoclimatiques. A. Brie. B. La Jaillière. Seules les valeurs supérieures à 0,001 sont indiquées. La ligne horizontale correspond à la valeur seuil au-delà de laquelle des effets sur les producteurs primaires aquatiques sont susceptibles d'être observés (d'après Brock *et al.*, 2000a).

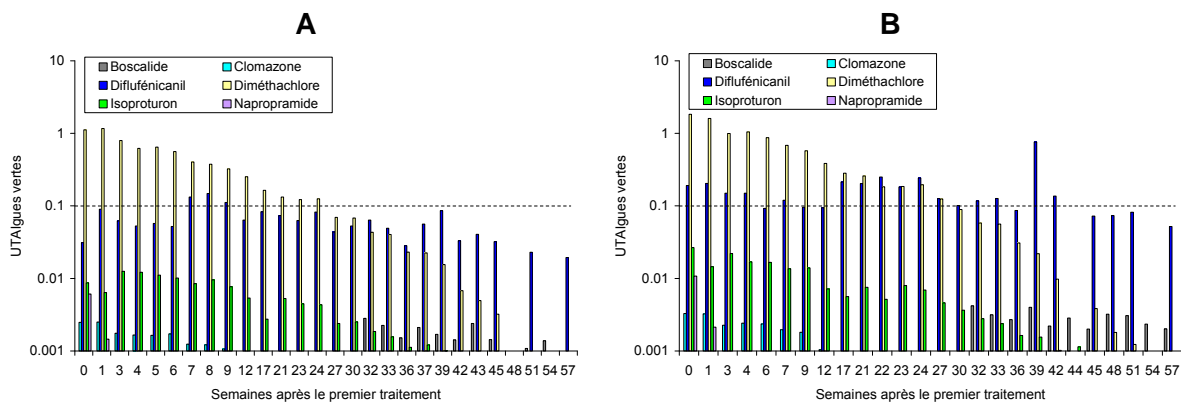


Figure 19. Valeurs moyennes des UT pour les microalgues vertes dans le cas de l'itinéraire technique "classique" de protection du colza pour les deux situations agropédo-climatiques. A. Brie. B. La Jaillière. Seules les valeurs supérieures à 0,001 sont indiquées. La ligne horizontale correspond à la valeur seuil au-delà de laquelle des effets sur les producteurs primaires aquatiques sont susceptibles d'être observés (d'après Brock et al., 2000a).

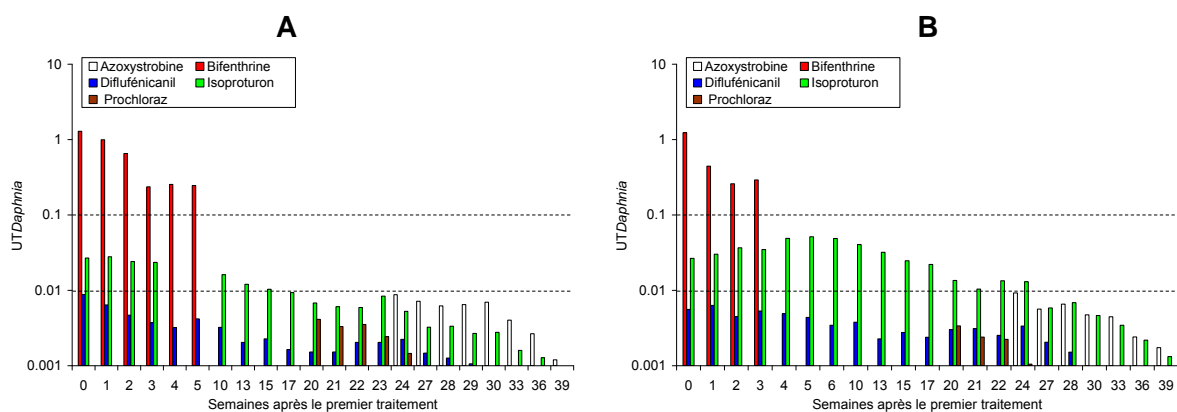


Figure 20. Valeurs moyennes des UT pour *Daphnia magna* dans le cas de l'itinéraire technique "classique" de protection du blé pour les deux situations agropédo-climatiques. A. Brie. B. La Jaillière. Seules les valeurs supérieures à 0,001 sont indiquées. Les lignes horizontales correspondent aux valeurs seuils au-delà desquelles des effets sur les invertébrés aquatiques sont susceptibles d'être observés (d'après Brock et al., 2000b).

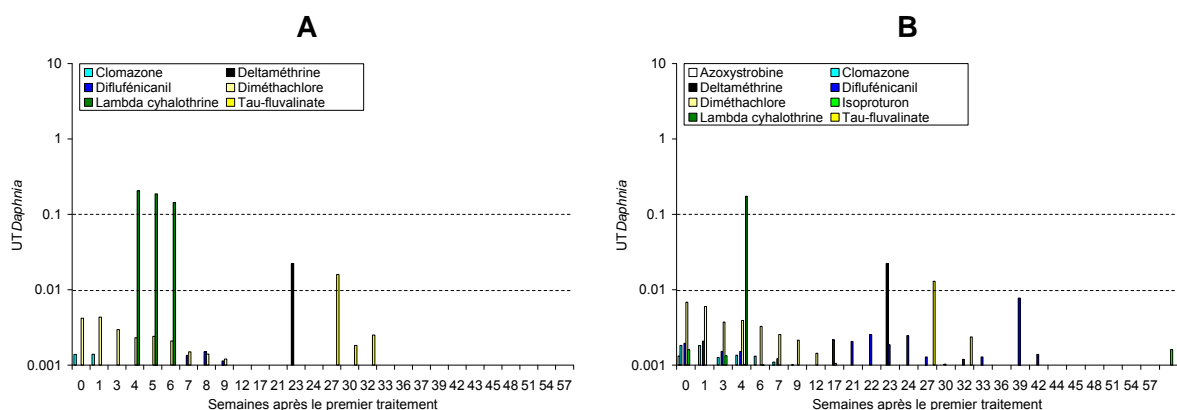


Figure 21. Valeurs moyennes des UT pour *Daphnia magna* dans le cas de l'itinéraire technique "classique" de protection du colza pour les deux situations agropédo-climatiques. A. Brie. B. La Jaillière. Seules les valeurs supérieures à 0,001 sont indiquées. Les lignes horizontales correspondent aux valeurs seuils au-delà desquelles des effets sur les invertébrés aquatiques sont susceptibles d'être observés (d'après Brock et al., 2000b).

1.8.2.3.2. Itinéraire technique "bas intrants pesticides"

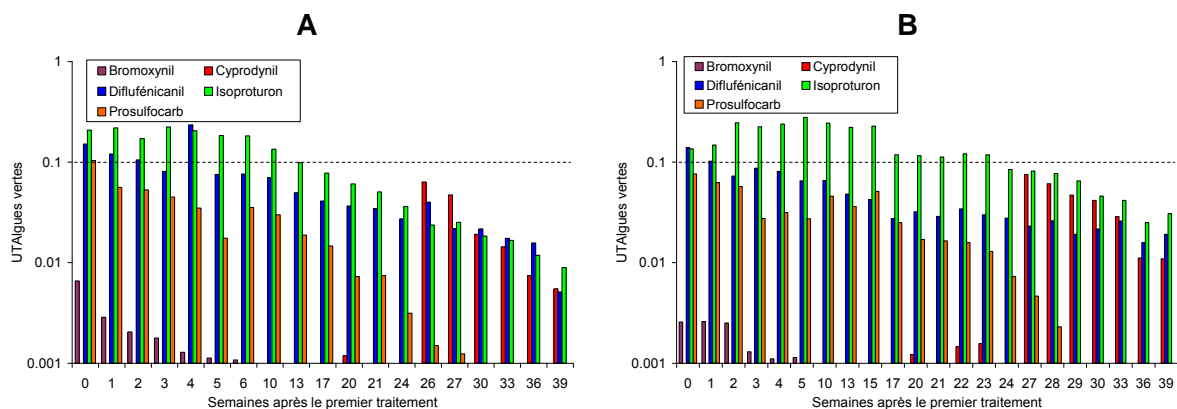


Figure 22. Valeurs moyennes des UT pour les microalgues vertes dans le cas de l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" de protection du blé pour les deux situations agropédoclimatiques. A. Brie. B. La Jaillière. Seules les valeurs supérieures à 0,001 sont indiquées. La ligne horizontale correspond à la valeur seuil au-delà de laquelle des effets sur les producteurs primaires aquatiques sont susceptibles d'être observés (d'après Brock et al., 2000a).

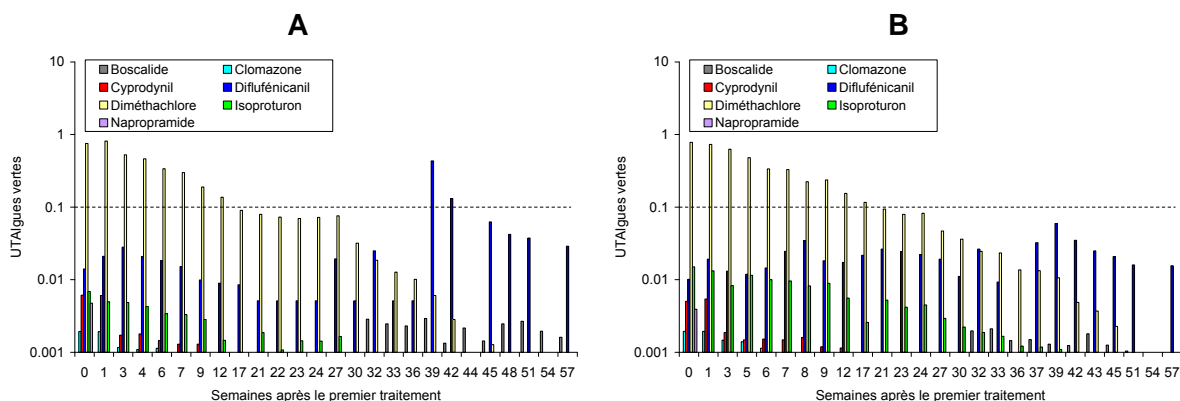


Figure 23. Valeurs moyennes des UT pour les microalgues vertes dans le cas de l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" de protection du colza pour les deux situations agropédoclimatiques. A. Brie. B. La Jaillière. Seules les valeurs supérieures à 0,001 sont indiquées. La ligne horizontale correspond à la valeur seuil au-delà de laquelle des effets sur les producteurs primaires aquatiques sont susceptibles d'être observés (d'après Brock et al., 2000a).

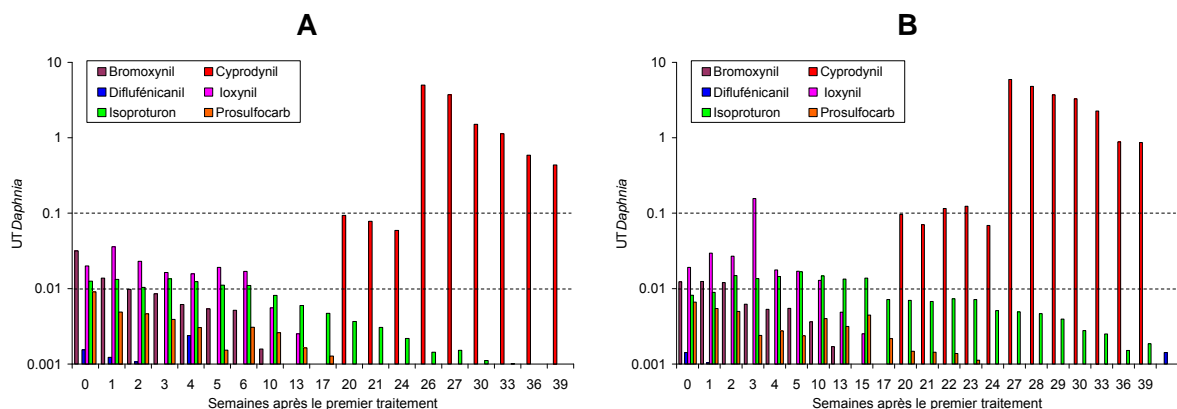


Figure 24. Valeurs moyennes des UT pour *Daphnia magna* dans le cas de l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" de protection du blé pour les deux situations agropédoclimatiques. A. Brie. B. La Jaillière. Seules les valeurs supérieures à 0,001 sont indiquées. Les lignes horizontales correspondent aux valeurs seuils au-delà desquelles des effets sur les invertébrés aquatiques sont susceptibles d'être observés (d'après Brock et al., 2000b).

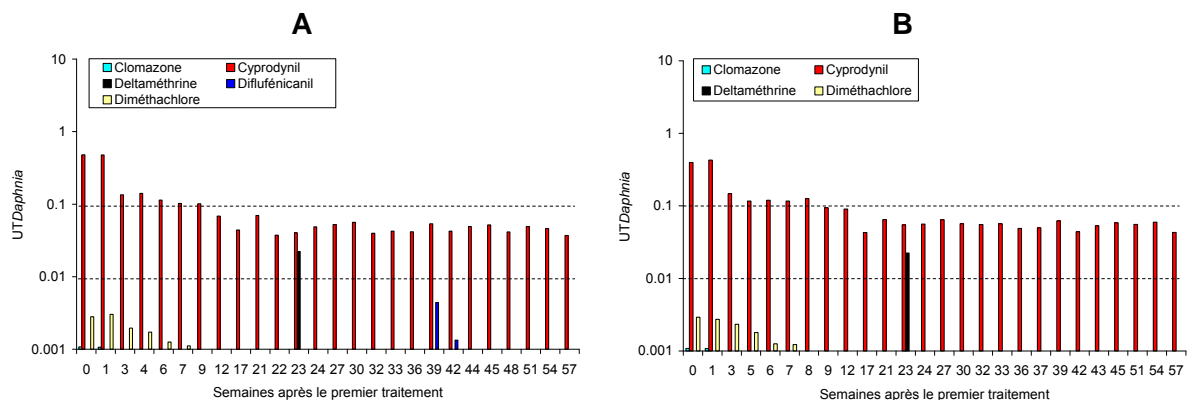


Figure 25. Valeurs moyennes des UT pour *Daphnia magna* dans le cas de l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" de protection du colza pour les deux situations agropédoclimatiques. A. Brie. B. La Jaillière. Seules les valeurs supérieures à 0,001 sont indiquées. Les lignes horizontales correspondent aux valeurs seuils au-delà desquelles des effets sur les invertébrés aquatiques sont susceptibles d'être observés (d'après Brock et al., 2000b).

1.8.3. Mesures des concentrations en résidus dans les sédiments

Certaines des substances utilisées au cours de ce programme sont susceptibles de s'adsorber sur les particules en suspension et sur les sédiments. Afin d'avoir des informations sur la présence de résidus dans les sédiments des mésocosmes, des échantillons ont été prélevés à la fin de l'expérimentation en octobre 2010. Les analyses ont été réalisées par le BRGM. Les résultats correspondants sont présentés dans le tableau 12 avec des informations sur les propriétés des substances concernées. Seules les substances pour lesquelles les concentrations mesurées étaient supérieures à la limite de quantification sont indiquées.

Tableau 12. Valeurs moyennes \pm ES des concentrations en résidus dans les sédiments des mésocosmes et données complémentaires sur les substances concernées (/: donnée non disponible).

Substance	Concentration moyenne \pm ES ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Log K_{ow}	K_{oc} (mL/g)	DT50 sédiments ^a (j)	NOEC _{28j} chironome ($\mu\text{g}/\text{kg}$ sed)
Azoxystrobine	0,8 \pm 0,01	2,5 ^{b,c}	423 ^d [207-594] ^e	205 ^b	23 000 ^c
Boscalide	20,9 \pm 3,45	2,96 ^{b,c}	809 ^b [750-1200] ^b	/	/
Diflufenicanil	9,7 \pm 2,7	4,2 ^b 4,9 ^c	1989 ^d [1622-3186] ^e	175 ^b	2 000 ^b
Cyprodinil	61,0 \pm 13,1	4 ^{b,c}	1706 ^d [1536-2012] ^e	142 ^d [106-178] ^e	80 000 ^c
Metconazole	5,0 \pm 0,93	3,85 ^{b,c}	1116 ^d [726-1718] ^e	465 ^b	/
Prochloraze	2,0 \pm 0,90	3,53 ^b 4,06 ^c	4970 ^d [4170-5540] ^e	319 ^b	/
Prosulfocarbe	1,3 \pm 0,18	4,48 ^b 4,65 ^c	1367 ^c 1693 ^b	264 ^d [147-381] ^e	/

^a Déterminée en laboratoire dans des systèmes eau-sédiments ; ^b Données Footprint PPDB ; ^c Données Agritox ; ^d Moyenne arithmétique des valeurs disponibles dans Agritox ; ^e Gamme des valeurs recensées dans Agritox.

Seules 7 des substances introduites dans les mésocosmes ont été identifiées dans les échantillons de sédiments. Hormis le boscalide, il s'agit de substances appliquées au cours de la première année de l'étude, ce qui suggère une persistance importante de ces dernières dans les sédiments. Ce constat est en conformité avec les données disponibles dans les bases de données Agritox et Footprint PPDB, notamment en ce qui concerne les valeurs de DT50 mesurées dans des systèmes eau-sédiments. Il existe peu de données sur la toxicité

des résidus de ces substances lorsqu'ils sont associés à des sédiments. Les valeurs de $NOEC_{28j}$ de l'azoxystrobine, du diflufénicanil et du cyprodinil déterminées pour les chironomes suggèrent que le risque pour les invertébrés benthiques associé à la présence des résidus de ces trois substances dans les sédiments est très faible (rapport entre la concentration moyenne mesurée et la $NOEC_{28j}$ compris entre $3,5 \cdot 10^{-5}$ pour l'azoxystrobine et $4,9 \cdot 10^{-3}$ pour le diflufénicanil).

1.8.4. Effets des pesticides sur les communautés de microalgues

1.8.4.1. Effets sur le phytoplancton

La figure 26 présente l'évolution au cours du temps de la concentration moyenne en chlorophylle a du phytoplancton dans l'eau des mésocosmes.

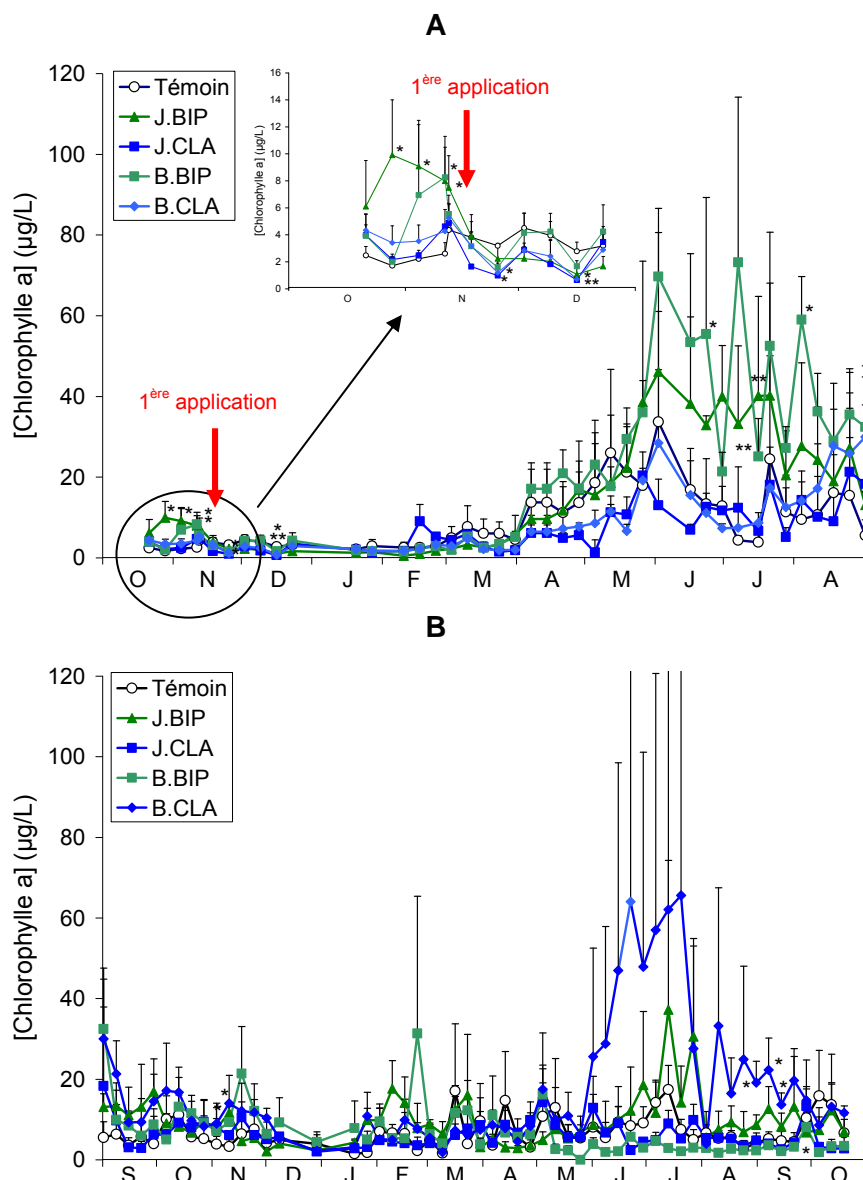


Figure 26. Valeurs moyennes (+ e.s.) de la concentration en chlorophylle a dans l'eau (en $\mu\text{g/L}$) des mésocosmes témoins et contaminés. A : Itinéraire technique de protection du blé. B : Itinéraire technique de protection du colza. Différence significative par rapport au témoin (ANOVA à un facteur sur données transformées par transformation Box-Cox suivie d'un test post-hoc de Dunnett : + : $0,10 > p > 0,05$; * : $0,05 > p > 0,01$; ** : $0,01 > p > 0,001$; *** : $p < 0,001$).

Dans le cas des traitements "classiques", des différences significatives ont été mises en évidence ponctuellement lors de l'automne 2008 entre mésocosmes contaminés et mésocosmes témoins, suggérant un impact négatif transitoire des traitements. Au regard des valeurs d' $UT_{\text{Algues vertes}}$, ces effets sont vraisemblablement la conséquence des apports en isoproturon et en diflufenicanil. Avant le début de la phase de contamination, la biomasse chlorophyllienne phytoplanctonique était significativement plus élevée dans les mésocosmes destinés aux traitements "bas intrants pesticides" que dans les mésocosmes témoins. Immédiatement après le premier traitement, plus aucune différence significative n'a été détectée. Ceci pourrait découler d'un effet négatif des 5 herbicides introduits dans les mésocosmes lors de la toute première application, et plus particulièrement de l'isoproturon, du diflufenicanil et du prosulfocarbe pour lesquels les valeurs d' $UT_{\text{Algues vertes}}$ étaient supérieures à 0,1 (Fig. 18). A cette saison, l'abondance du phytoplancton dans les mésocosmes témoins est naturellement faible en raison des conditions de température et de lumière. De plus, la disponibilité des nutriments dans l'eau des mésocosmes était faible. Ceci pourrait expliquer l'absence de différences entre systèmes témoins et contaminés au cours des mois qui ont suivi. L'hypothèse d'une sélection d'espèces/génotypes tolérants au sein des communautés algales exposées de manière répétée aux herbicides dans les mésocosmes contaminés n'est pas non plus à exclure. En effet, les herbicides inhibiteurs du photosystème II tels que l'isoproturon sont connus pour induire ce genre de réponse chez les microalgues d'eau douce (*Pollution-Induced Community Tolerance* ou PICT ; Blanck *et al.*, 1988, Bérard *et al.*, 2002). Des analyses détaillées de la composition taxonomique du phytoplancton sont en cours. Les résultats permettront de tester l'hypothèse d'une modification de la composition taxonomique des communautés en réponse aux traitements.

Une augmentation de la concentration en chlorophylle *a* dans l'eau a été observée en été 2009 dans l'ensemble des mésocosmes, en particulier ceux soumis aux traitements "bas intrants pesticides". En dépit d'une forte variabilité entre réplicats, des différences significatives par rapport aux mésocosmes témoins ont été mises en évidence de manière ponctuelle. Cette augmentation de la biomasse du phytoplancton est vraisemblablement une conséquence indirecte des impacts négatifs observés à cette période sur certains groupes d'invertébrés du zooplancton et du benthos suite aux traitements au cyprodinil (voir 1.8.5).

Quel que soit le type d'itinéraire technique, aucun effet négatif des traitements n'a été mis en évidence au cours de la seconde année de l'étude, bien que des valeurs élevées ($> 0,1$) d' $UT_{\text{Algues vertes}}$ aient été observées pour le diméthachlore. En août et septembre 2010, des concentrations en chlorophylle *a* significativement plus élevées ont été mesurées dans l'eau des mésocosmes utilisés pour les traitements "Brie Classique" par rapport aux témoins, sans qu'il soit possible d'établir une relation de causalité entre ce constat et les traitements.

1.8.4.2. Effets sur le périphyton

Les figures 27 et 28 présentent respectivement l'évolution au cours du temps des valeurs moyennes du poids sec sans cendres et de la concentration en chlorophylle *a* du périphyton échantillonné à la surface des lames de verre introduites dans les mésocosmes.

Une augmentation significative des deux paramètres a été observée à la mi-juin 2009 dans les mésocosmes exposés aux itinéraires techniques "bas intrants pesticides" de protection du blé. Une tendance similaire a été observée en juillet mais uniquement au sein de la modalité "Jaillièrè Bas intrants pesticides". Comme dans le cas du phytoplancton, cette augmentation est à mettre en relation avec les effets négatifs observés à la même période sur le zooplancton et sur les macroinvertébrés, notamment les Mollusques Gastéropodes, suite aux traitements avec le cyprodinil.

En ce qui concerne les itinéraires techniques de protection du colza, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre mésocosmes témoins et contaminés.

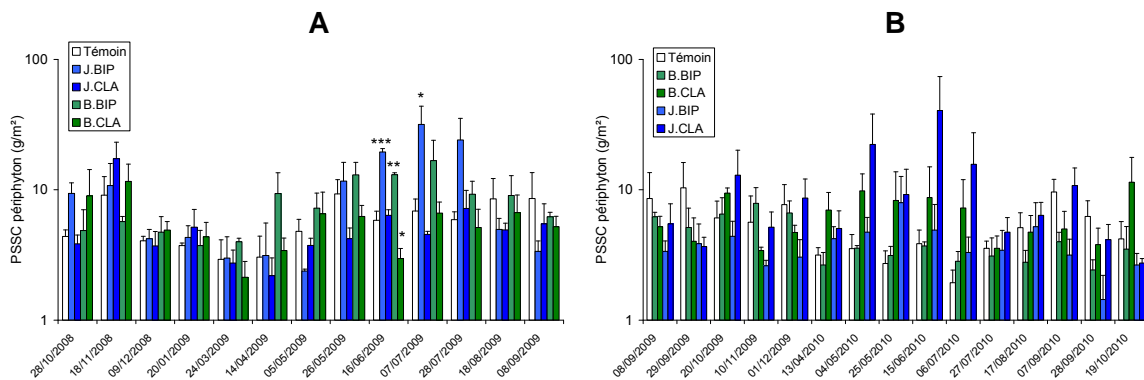


Figure 27. Valeurs moyennes (+ ES) du poids sec sans cendres (PSSC, en g/m²) du périphyton échantillonné à la surface des lames de verres immergées pendant trois semaines dans les mésocosmes. Les dates en abscisse correspondent à la date de retrait des lames. A. Itinéraire technique de protection du blé. B. Itinéraire technique de protection du colza. Différence significative par rapport au témoin (ANOVA à un facteur sur données transformées par Box-Cox suivie d'un test post-hoc de Dunnett : + : 0,10>p>0,05 ; * : 0,05>p>0,01 ; ** : 0,01>p>0,001 ; *** : p<0,001).

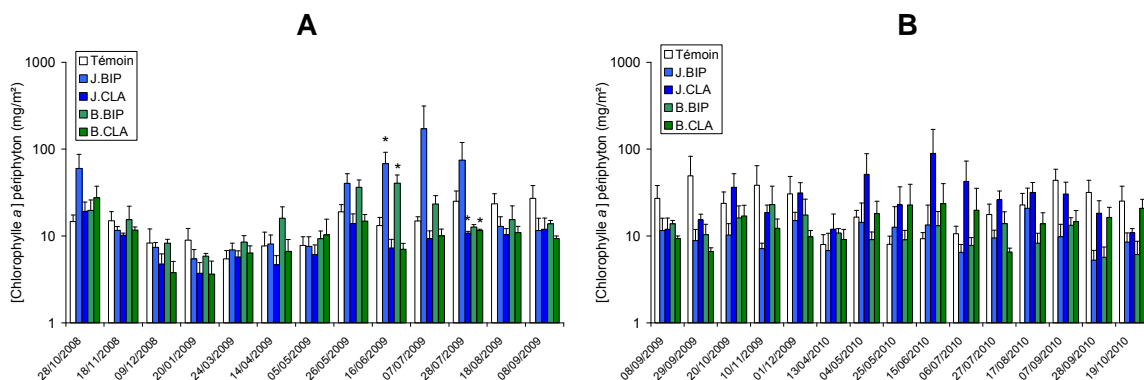


Figure 28. Valeurs moyennes (+ e.s.) de la concentration en chlorophylle a (en mg/m²) du périphyton échantillonné à la surface des lames de verres immergées pendant trois semaines dans les mésocosmes. Les dates en abscisse correspondent à la date de retrait des lames. A. Itinéraire technique de protection du colza. B. Itinéraire technique de protection du blé. Différence significative par rapport au témoin (ANOVA à un facteur sur données transformées par Box-Cox suivie d'un test post-hoc de Dunnett : + : 0,10>p>0,05 ; * : 0,05>p>0,01 ; ** : 0,01>p>0,001 ; *** : p<0,001).

1.8.5. Effets des pesticides sur les communautés d'invertébrés

1.8.5.1. Effets sur le zooplancton

Les effets des traitements sur les communautés zooplanctoniques des mésocosmes ont été analysés en utilisant la méthode de la première courbe de réponse principale (*Principal Response Curve* ou *PRC* ; van den Brink & ter Braak, 1999). Des analyses séparées ont été réalisées pour les deux années agronomiques (blé et colza) et pour les itinéraires "classiques" d'une part et "bas intrants pesticides" d'autre part (Figures 29 à 32). Le tableau 13 résume les résultats obtenus en présentant les niveaux de significativité statistique associés aux PRC et les pourcentages de la variabilité totale des données liés au temps et aux traitements, respectivement.

Tableau 13. Résumé des résultats de l'analyse par PRC appliquée aux données d'abondance du zooplancton dans la colonne d'eau des mésocosmes utilisés pour l'étude des différents scénarios de contamination.

Scénario	Blé		Colza	
	Classique	Bas intrants pesticides	Classique	Bas intrants pesticides
Significativité de l'effet des traitements	$P = 0,042$	$P = 0,01$	$P = 0,021$	$P = 0,018$
Significativité de la première PRC	$P = 0,042$	$P = 0,005$	$P = 0,055$	$P = 0,018$
Pourcentage de la variabilité totale des données lié au temps	37,5 %	32,2 %	41,7 %	40,3 %
Pourcentage de la variabilité totale des données lié aux traitements (Pourcentage associé à la première PRC)	17,3 % (32,4 %)	24,4 % (52,9 %)	16,7 % (27,5 %)	18,3 % (31,9 %)

En ce qui concerne le blé (Fig. 29 et 30), des effets statistiquement significatifs des deux types d'itinéraires techniques de protection ont été mis en évidence, mais avec des patrons temporels différents.

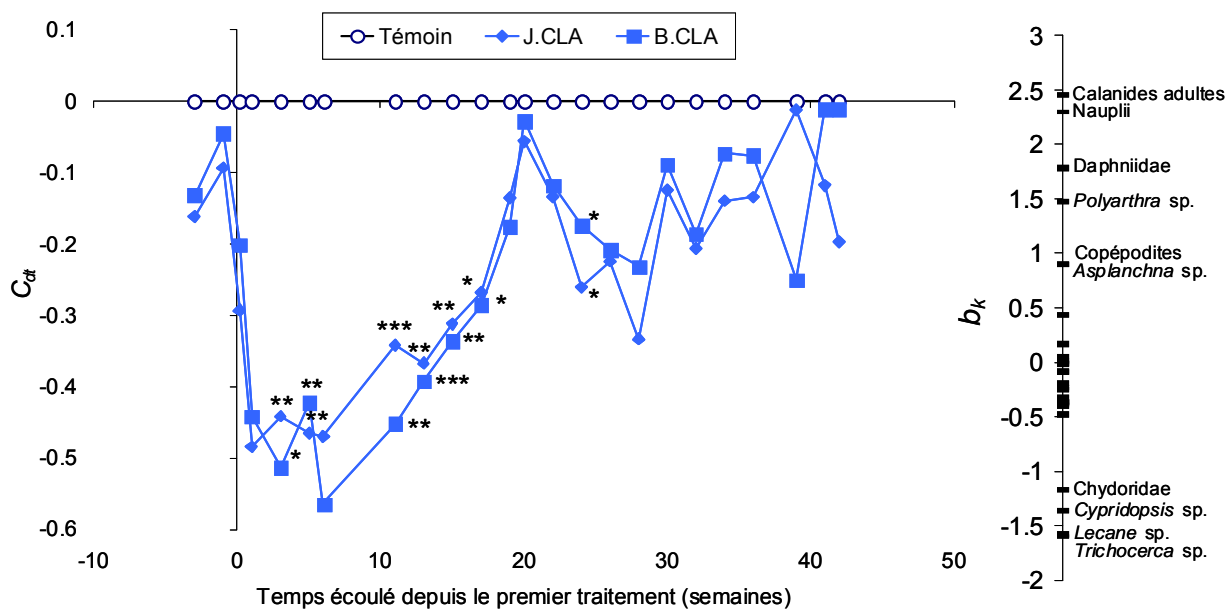


Figure 29. Première Courbe de Réponse Principale (PRC) obtenue pour la réponse des communautés zooplanctoniques à l'itinéraire technique "classique" de protection du blé pour les deux situations agropédoclimatiques (pour plus de lisibilité, seules les espèces présentant une valeur de b_k supérieure à 0,5 ou inférieure à -0,5 ont été représentées ; différence significative par rapport aux témoins : * : $0,01 < P < 0,05$, ** : $0,001 < P < 0,01$, *** : $P < 0,001$).

Dans le cas de l'itinéraire "classique" (Fig. 29), un effet significatif a été observé dès la deuxième semaine après le premier traitement, quelle que soit la situation agropédoclimatique considérée. Cet effet a persisté pendant 12 semaines, la restauration du zooplancton (définie comme le moment où plus aucun effet significatif n'a été observé pour deux dates successives) étant observée 20 semaines après le premier traitement. Par la suite, seule une différence ponctuelle a été mise en évidence, 24 semaines après le premier traitement. L'analyse des poids (b_k) des différents groupes du zooplancton a permis de

mettre en évidence un impact négatif des traitements sur certains groupes de microcrustacés (Calanides adultes et stades larvaires – copépodites et nauplii – de copépodes, Cladocères Daphniidae) et sur deux genres de rotifères, *Polyarthra* sp. et *Asplanchna* sp. Inversement, deux groupes de Crustacés (Cladocères Chydoridae et Ostracodes du genre *Cypridopsis*) ont vu leurs abondances augmenter dans les mésocosmes contaminés.

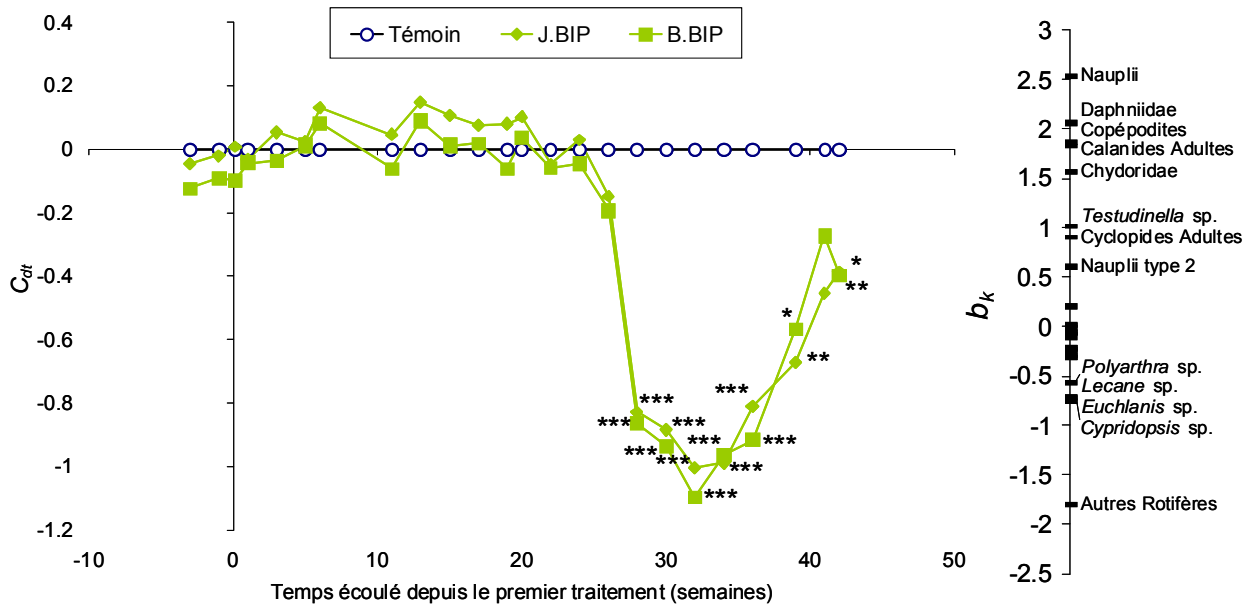


Figure 30. Première Courbe de Réponse Principale (PRC) obtenue pour la réponse des communautés zooplanctoniques à l'itinéraire "bas intrants pesticides" de protection du blé pour les deux situations agropédoclimatiques (pour plus de lisibilité, seules les espèces présentant une valeur de b_k supérieure à 0,5 ou inférieure à -0,5 ont été représentées ; différence significative par rapport aux témoins : * : $0,01 < P < 0,05$, ** : $0,001 < P < 0,01$, *** : $P < 0,001$).

Dans le cas de l'itinéraire "bas intrants pesticides" (Fig. 30), un effet significatif a été observé 28 semaines après le début des traitements pour les deux situations agropédoclimatiques. Cet effet a persisté 6 semaines. L'analyse des poids (b_k) des différents groupes du zooplancton a permis de mettre en évidence un impact négatif des traitements sur certains groupes de microcrustacés (Calanides et Cyclopides adultes et stades larvaires – copépodites et nauplii – de copépodes, Cladocères Daphniidae et Chydoridae) et sur un genre de rotifères, *Testudinella* sp. Inversement, divers groupes de Rotifères (*Polyarthra* sp., *Lecane* sp., *Euchlanis* sp., Autres Rotifères) et les Ostracodes du genre *Cypridopsis* ont vu leur abondance augmenter dans les mésocosmes contaminés.

En ce qui concerne les programmes de protection phytosanitaire du colza (Fig. 31 et 32), des différences significatives entre systèmes traités et témoins ont été mises en évidence.

Dans le cas de l'itinéraire technique "classique" (Fig. 31), des différences significatives ponctuelles entre les systèmes témoins et les systèmes exposés au traitement "Brie-Classique" ont été observées entre 6 et 14 semaines après le premier traitement du colza. Ces effets ont été suivis d'une restauration 20 semaines après le début des traitements. Pour les deux situations agropédoclimatiques, un effet significatif des traitements a été observé de 23 à 30 semaines après la première application relative au colza, suivi d'une restauration. Sur la base du critère de restauration défini précédemment, la restauration du zooplancton n'a été observée que 51 semaines après le début des traitements. L'analyse d'échantillons complémentaires actuellement en cours devrait permettre d'affiner l'évaluation de la date de restauration. L'analyse des poids (b_k) des différents groupes du zooplancton dans l'analyse a

permis de mettre en évidence un impact négatif des traitements sur certains groupes de microcrustacés (Calanides adultes et stades larvaires – copépodites et nauplii – de copépodes, Cladocères Daphniidae). Inversement, les Cladocères Chydoridae, les Ostracodes du genre *Cypridopsis* et les Autres Rotifères ont vu leurs abondances augmenter dans les mésocosmes contaminés.

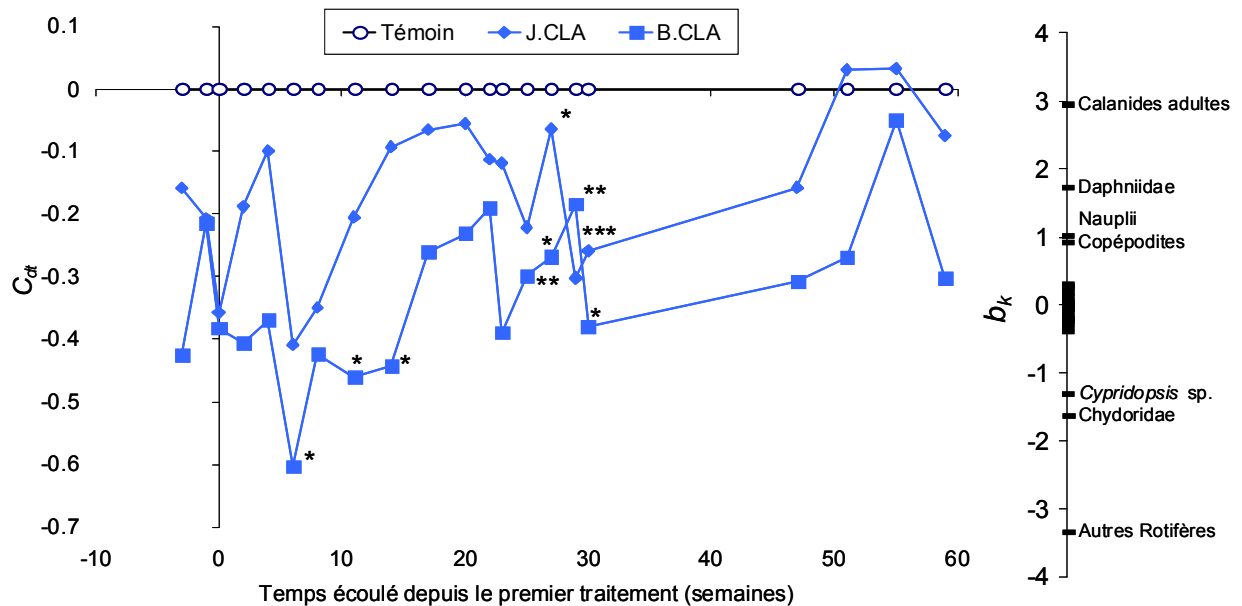


Figure 31. Première Courbe de Réponse Principale (PRC) obtenue pour la réponse des communautés zooplanctoniques à l'itinéraire "classique" de protection du colza pour les deux situations agropédoclimatiques (pour plus de lisibilité, seules les espèces présentant une valeur de b_k supérieure à 0,5 ou inférieure à -0,5 ont été représentées ; différence significative par rapport aux témoins : * : $0,01 < P < 0,05$, ** : $0,001 < P < 0,01$, *** : $P < 0,001$).

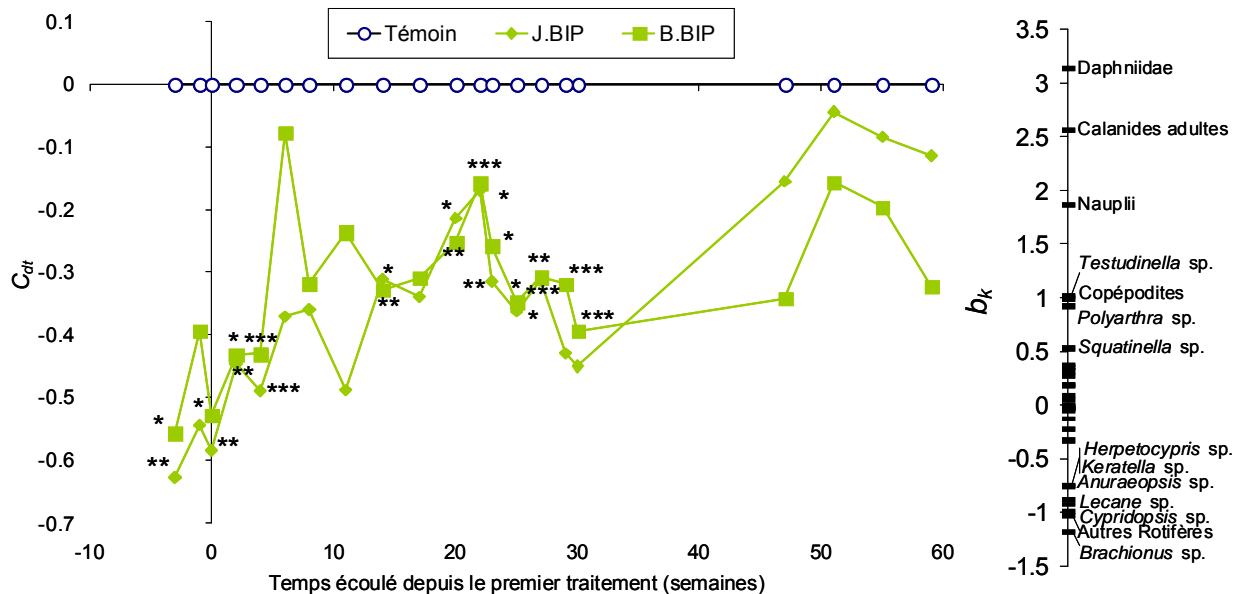


Figure 32. Première Courbe de Réponse Principale (PRC) obtenue pour la réponse des communautés zooplanctoniques à l'itinéraire "bas intrants pesticides" de protection du colza pour les deux situations agropédoclimatiques (pour plus de lisibilité, seules les espèces présentant une valeur de b_k supérieure à 0,5 ou inférieure à -0,5 ont été représentées ; différence significative par rapport aux témoins : * : $0,01 < P < 0,05$, ** : $0,001 < P < 0,01$, *** : $P < 0,001$).

L'analyse des effets des itinéraires techniques "bas intrants pesticides" de protection du colza (Fig. 32) est rendue délicate par l'existence avant le début des traitements de différences significatives entre systèmes témoins et traités liés aux traitements réalisés au cours de l'année précédente dans le cadre de l'itinéraire technique de protection du blé. Toutefois, l'absence de différences entre 6 et 11 semaines après le premier traitement suggère l'existence d'une phase de restauration. Des différences significatives ont de nouveau été mises en évidence pour les deux situations agropédoclimatiques entre les semaines 14 et 30. Comme dans le cas des traitements "classiques", la restauration du zooplancton n'a été observée qu'entre 47 (La Jaillière) et 51 semaines (Brie) après le début des traitements. Un impact négatif des traitements a été mis en évidence sur certains groupes de microcrustacés (Calanides adultes et stades larvaires – copépodites et nauplii – de copépodes, Cladocères Daphniidae) et sur plusieurs genres de Rotifères (*Testudinella* sp., *Polyarthra* sp., *Squatinella* sp.). Inversement, les Ostracodes des genres *Cypridopsis* et *Herpetocypris* et de nombreux groupes de Rotifères (*Keratella* sp., *Anuraeopsis* sp., *Lecane* sp., *Brachionus* sp. et Autres Rotifères) ont vu leur abondance augmenter dans les mésocosmes contaminés.

Les réponses des communautés zooplanctoniques aux pesticides combinent des effets directs (effets létaux engendrant une diminution de l'abondance des espèces/groupes sensibles) et des effets indirects (augmentation de l'abondance des espèces non sensibles, du fait de modifications de phénomènes de compétition, de relations proies-prédateurs, etc.). Il existe à ce propos une littérature très abondante, notamment en ce qui concerne les insecticides (Brock *et al.*, 2000b), qui ont permis de mettre en évidence des réponses relativement génériques :

- effet négatif direct sur les crustacés, en particulier les Cladocères.
- effet positif indirect sur les microalgues du phytoplancton ("bloom" algal) par diminution du broutage par les Cladocères.
- effet positif indirect sur les Rotifères par diminution de la compétition pour les ressources alimentaires avec les Cladocères.
- effet négatif indirect sur les prédateurs de Cladocères.

Par ailleurs, la restauration des communautés zooplanctoniques s'effectue essentiellement à partir d'individus survivants et de formes de durée (individus en dormance, œufs de durée, etc.) présentes dans les sédiments (Hanson *et al.*, 2007).

Dans le cas des traitements "classiques" de protection phytosanitaire du blé, les valeurs d' $UT_{Daphnia}$ suggèrent que les effets négatifs observés au début de l'étude sont liés à l'introduction de bifenthrine dans les mésocosmes traités. Lors d'une étude de courte durée réalisée en mésocosmes, Drenner *et al.* (1993) ont mis en évidence un impact négatif rapide de la bifenthrine (concentrations nominales testées comprises entre 0,090 et 7,75 µg/L) sur l'abondance des larves nauplii de copépodes, accompagné d'une augmentation de l'abondance des Rotifères. Dans une autre étude de 14 jours en mésocosmes, Hoagland *et al.* (1993) ont aussi mis en évidence des effets de ce type sur le zooplancton (y compris un effet négatif sur les copépodites) et ceci dès la concentration nominale de 0,039 µg/L. Au cours de ce programme, les concentrations maximales moyennes (\pm ES) en bifenthrine mesurées étaient de 0,141 (\pm 0,019) et 0,136 (\pm 0,023) µg/L pour les mésocosmes "Brie Classique" et "Jaillière Classique", respectivement. Les observations réalisées sur le zooplancton sont donc cohérentes avec l'hypothèse d'un impact négatif de la bifenthrine sur les Crustacés, suivi d'un effet positif indirect sur certains Rotifères. L'impact négatif des traitements sur les Rotifères prédateurs du genre *Asplanchna* pourrait être une conséquence indirecte de la diminution de l'abondance de certaines de leurs proies (nauplii).

La vitesse de restauration observée ici est sensiblement supérieure à celle mesurée dans les mêmes systèmes expérimentaux suite à un traitement ponctuel avec de la deltaméthrine (15

semaines ; Hanson *et al.*, 2007). Cette différence découle sans doute en partie de dates de traitement différentes (novembre dans le cas du programme Emeritat, avril dans le cas de Hanson *et al.*, 2007) et aussi vraisemblablement d'une différence de persistance entre ces deux substances dans les mésocosmes, en particulier au niveau des sédiments.

L'absence d'effets négatifs des traitements "bas intrants pesticides" au début de la période d'étude conforte l'hypothèse du rôle de la bifenthrine dans les effets observés sur le zooplancton dans le cas des traitements "classiques", cet insecticide n'ayant pas été utilisé dans les traitements "bas intrants". Elle suggère aussi que les herbicides appliqués à l'automne n'ont pas eu d'effet sur ce compartiment.

Dans le cas de l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" de protection du blé, les valeurs d' $UT_{Daphnia}$ suggèrent que les effets négatifs observés à partir de 28 semaines après le premier traitement sont liés à la deuxième application de cyprodinil dans les mésocosmes traités qui a été réalisée 26 semaines après le début de la phase de contamination. Les résultats de tests de toxicité présentés dans un rapport publié par l'EFSA (EFSA, 2006) et repris dans Agritox indiquent que *Daphnia magna* était l'espèce testée la plus sensible ($CE_{50,48h} = 33 \mu\text{g/L}$) alors que la sensibilité des Rotifères est très faible ($CE_{50,24h} > 9,5 \text{ mg/L}$ pour *Brachionus* sp.). Ceci est cohérent avec les résultats de la PRC pour cette étude. Les résultats des études en mésocosmes présentés dans le rapport de l'EFSA mettent en évidence une augmentation de l'abondance de divers groupes du zooplancton dans les systèmes contaminés et jamais de réduction significative d'effectifs, contrairement à ce qui a été observé au cours de ce programme. La différence avec les résultats obtenus au cours de ce programme réside notamment dans les concentrations d'exposition maximales qui étaient beaucoup plus élevées ici ($165 \pm 36,6$ et $195,6 \pm 13,5 \mu\text{g/L}$ pour les traitements B.BIP et J.BIP, respectivement), en raison d'un surdosage de la substance lors du second traitement. L'absence de restauration est à mettre en relation avec la persistance importante du cyprodinil dans les mésocosmes traités.

En ce qui concerne l'itinéraire technique "classique" de protection du colza, l'impact significatif observé dans les mésocosmes utilisés pour la situation "Brie" correspond vraisemblablement au traitement par la lambda-cyhalothrine pour laquelle des valeurs élevées d' $UT_{Daphnia}$ ont été mesurées. Aucun effet significatif de cette substance n'a été mis en évidence pour les mésocosmes utilisés pour le scénario "Jaillière", ce qui est à mettre en relation avec sa disparition plus rapide de la colonne d'eau dans ces systèmes par rapport aux autres mésocosmes contaminés. La deuxième phase d'effet (entre 23 et 30 semaines après le début de la phase de contamination) est à mettre en relation avec les applications successives de deux autres insecticides pyréthrinoïdes, la deltaméthrine et le tau-fluvalinate. Le patron de réponse, avec des effets négatifs directs sur les Crustacés et des effets positifs indirects sur les Rotifères, est cohérent avec les données disponibles sur la dynamique et les effets écotoxicologiques de ces insecticides et d'autres pyréthrinoïdes en milieu aquatique (Tidou *et al.*, 1992 ; Arts *et al.*, 2006 ; Hanson *et al.*, 2007).

Comme cela a été évoqué précédemment, la persistance importante du cyprodinil dans l'eau des mésocosmes utilisés pour l'étude des traitements "bas intrants pesticides" a conduit à une altération à long terme de la structure du zooplancton ce qui rend délicat l'interprétation des résultats. Il est toutefois probable qu'une partie des effets négatifs observés au-delà de la 23^{ème} semaine suivant le premier traitement soit la conséquence du traitement avec de la deltaméthrine effectué cette même semaine.

Compte tenu des impacts négatifs importants des pyréthrinoïdes et du cyprodinil sur certains constituants du zooplancton herbivores (Cladocères et Copépodes), des proliférations algales auraient pu se produire. L'analyse des données obtenues sur les producteurs primaires a montré que, sauf dans le cas du périphyton échantillonné dans les mésocosmes "bas intrants pesticides", aucun effet indirect positif de ce type n'a été observé. Ceci peut

être lié à une disponibilité faible en éléments nutritifs dans l'eau des mésocosmes (Hanson *et al.*, 2007). C'est peut être aussi la conséquence de la présence concomitante d'herbicides, notamment de substances fortement persistantes, qui pourraient avoir eu un effet inhibiteur sur le développement des producteurs primaires. Sur la base des valeurs d' $UT_{\text{Algues vertes}}$, le diflufenicanil et l'isoproturon pourraient avoir été responsables de cet effet.

1.8.5.2. Effets sur les macroinvertébrés

- Communautés de macroinvertébrés

Les effets des traitements sur les communautés de macroinvertébrés échantillonnées à l'aide des substrats artificiels ont été analysés en utilisant la méthode de la première courbe de réponse principale. Des analyses séparées ont été réalisées pour les deux années agronomiques (blé et colza) et pour les itinéraires "classiques" d'une part et "bas intrants pesticides" d'autre part (Figures 33 à 36). Le tableau 14 résume les résultats obtenus en présentant les niveaux de significativité statistique associés aux PRC et les pourcentages de la variabilité totale des données liés au temps et aux traitements, respectivement.

Tableau 14. Résumé des résultats de l'analyse par PRC appliquée aux données d'abondance des macroinvertébrés échantillonnés dans les mésocosmes utilisés pour l'étude des différents scénarios de contamination.

Scénario	Blé Classique	Blé Bas intrants pesticides	Colza Classique	Colza Bas intrants pesticides
Significativité de l'effet des traitements	$P = 0,14$	$P = 0,032$	$P = 0,024$	$P = 0,028$
Significativité de la première PRC	$P = 0,11$	$P = 0,034$	$P = 0,028$	$P = 0,031$
Pourcentage de la variabilité totale des données lié au temps	27,7 %	36,9 %	15,1 %	13,5 %
Pourcentage de la variabilité totale des données lié aux traitements (Pourcentage associé à la première PRC)	20,6 % (49,5 %)	24,0 % (56,2 %)	32,1 % (53,6 %)	34,1 % (58,6 %)

En ce qui concerne le programme "classique" de protection du blé (Fig. 33) aucun effet statistiquement significatif global des traitements n'a été mis en évidence ($P = 0,14$). Toutefois, des effets ponctuels statistiquement significatifs ont été mis en évidence pour les deux situations agropédoclimatiques dès la 4^{ème} semaine après le premier traitement et jusqu'à la 25^{ème}. La restauration des communautés benthiques a été observée 31 semaines après le premier traitement. L'analyse de la distribution des valeurs de b_k a mis en évidence des effets négatifs des traitements pour de nombreux groupes d'Insectes, de Crustacés et de Mollusques (valeurs de b_k positives alors que celles de C_{dt} sont négatives) et plus particulièrement pour les Ephéméroptères Baetidae (*Cloeon dipterum* essentiellement), *Asellus aquaticus* (Crustacés Isopodes) et *Lymnaea stagnalis* (Mollusques Gastéropodes). Inversement, une augmentation de l'abondance (valeurs de b_k et de C_{dt} négatives) a été observée dans les mésocosmes traités pour les Annélides Oligochètes (*Chaetogaster* sp., Autres Oligochètes), les Hydrozoaires et les larves de Diptères Orthoclaadiinae.

Le patron de réponse obtenu dans le cas de l'itinéraire technique "bas intrants" de protection du blé est très différent (Fig. 34), avec un effet significatif global des traitements ($P = 0,032$) qui s'est manifesté à partir de la 25^{ème} semaine après le début de la contamination des mésocosmes pour les deux situations agropédoclimatique, sans qu'une restauration soit observée avant la fin de l'année agronomique. Les groupes les plus affectés sont des Crustacés (aselles, gammares), des Mollusques Gastéropodes (*L. stagnalis*, *P. acuta*, Planorbidae) et des Annélides (*Glossiphonia* sp., Oligochètes). Un effet positif a été mis en évidence en ce qui concerne l'abondance des larves de Diptères Chironomidae (Tanytopodinae, Tanytarsini, Chironomini, Orthoclaadiinae).

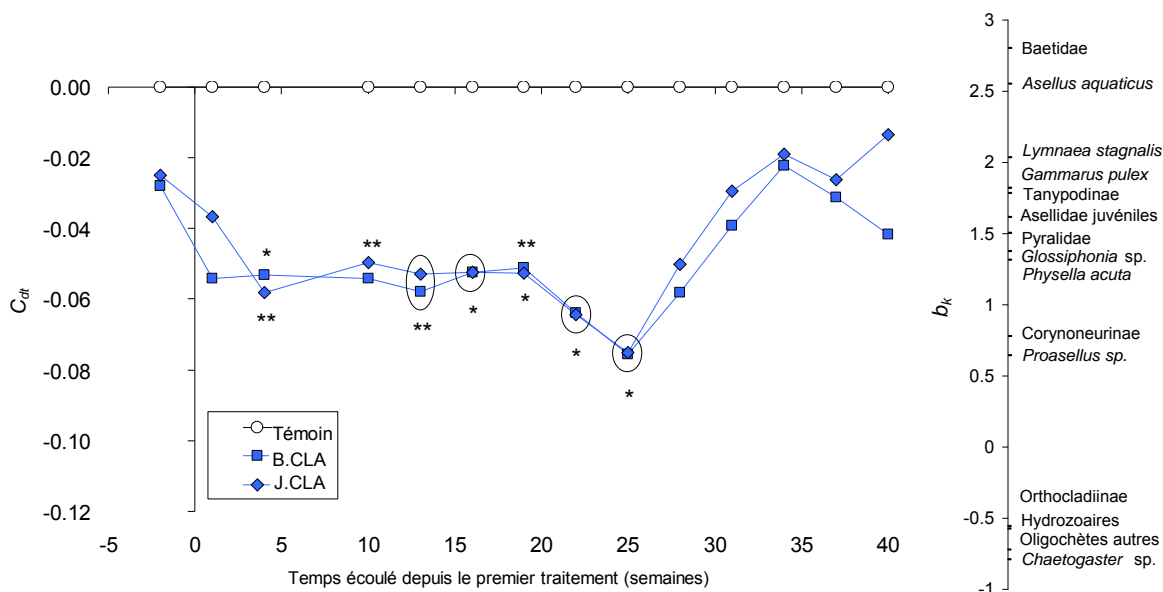


Figure 33. Première Courbe de Réponse Principale (PRC) obtenue pour la réponse des communautés de macroinvertébrés à l'itinéraire technique "classique" de protection du blé pour les deux situations agropédoclimatiques (pour plus de lisibilité, seules les espèces présentant une valeur de b_k supérieure à 0,5 ou inférieure à -0,5 ont été représentées ; les ellipses regroupent les points pour lesquels le même résultat a été obtenu lors de l'analyse statistique ; différence significative par rapport aux témoins : * : $0,01 < P < 0,05$, ** : $0,001 < P < 0,01$).

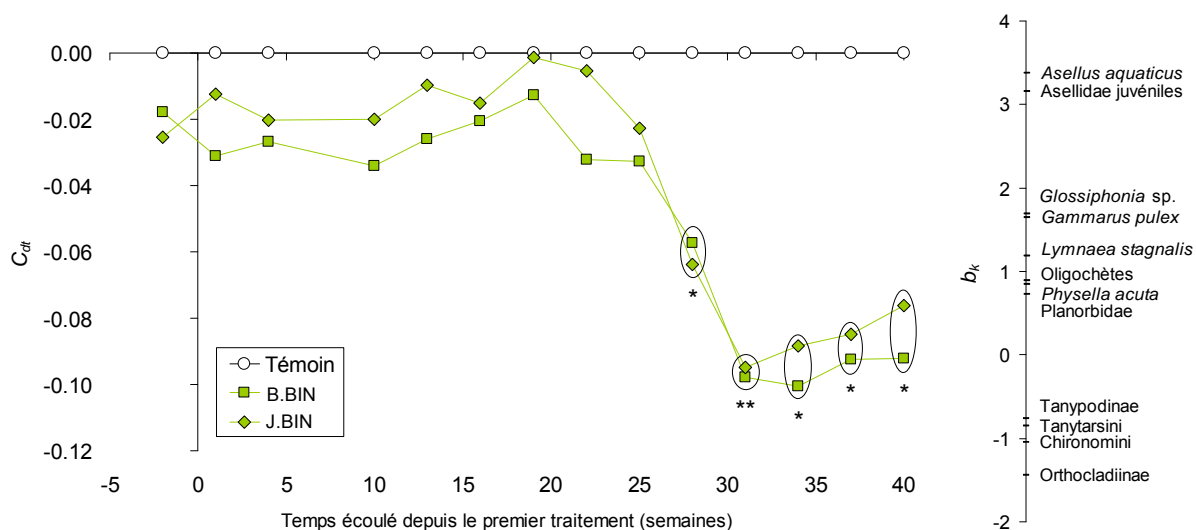


Figure 34. Première Courbe de Réponse Principale (PRC) obtenue pour la réponse des communautés de macroinvertébrés à l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" de protection du blé pour les deux situations agropédoclimatiques (pour plus de lisibilité, seules les espèces présentant une valeur de b_k supérieure à 0,5 ou inférieure à -0,5 ont été représentées ; les ellipses regroupent les points pour lesquels le même résultat a été obtenu lors de l'analyse statistique ; différence significative par rapport aux témoins : * : $0,01 < P < 0,05$, ** : $0,001 < P < 0,01$).

Dans le cas du programme "classique" de protection phytosanitaire du colza (Fig. 35), un effet significatif global des traitements a été observé ($P = 0,024$). Des différences significatives entre mésocosmes témoins et contaminés ont été observées à partir de la 25^{ème} semaine après le début de la contamination des mésocosmes pour les deux situations agropédoclimatiques, sans qu'une restauration soit observée avant la fin de l'année agronomique. Sur la base de la distribution des valeurs de b_k , les groupes négativement

affectés sont certains Crustacés (aselles, gammares) et les larves de Diptères Corynoneurinae. Une augmentation de l'abondance de certains Mollusques Gastéropodes (*Radix* sp., *P. acuta*, Planorbidae) et Annélides (*Chaetogaster* sp.), des hydrozoaires et des larves de Diptères de la tribu des Chironomini a été mise évidence.

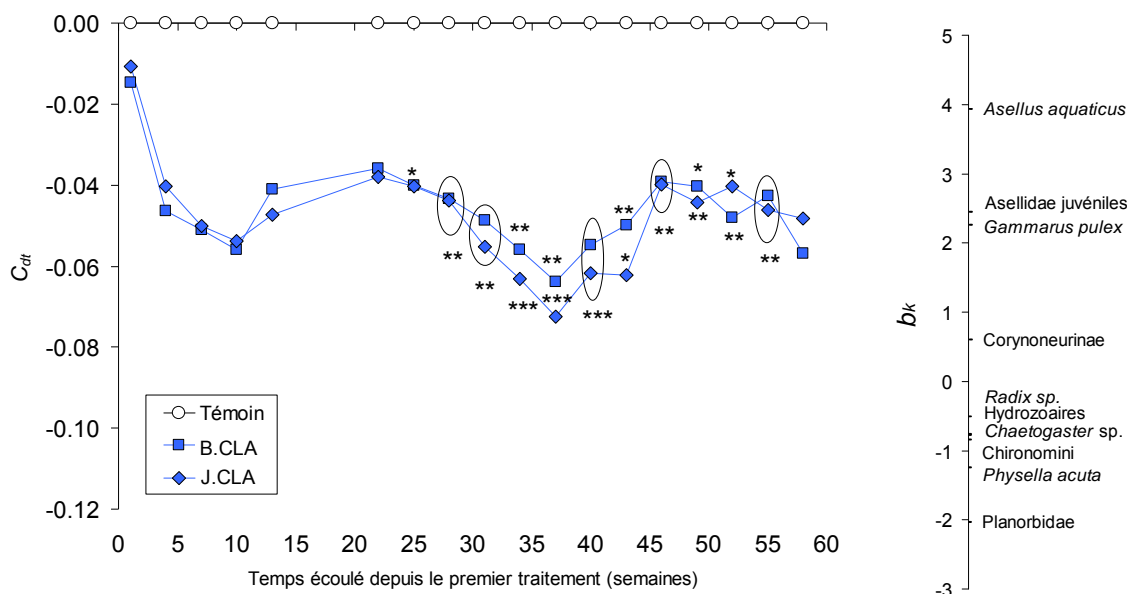


Figure 35. Première Courbe de Réponse Principale (PRC) obtenue pour la réponse des communautés de macroinvertébrés à l'itinéraire technique "classique" de protection du colza pour les deux situations agropédoclimatiques (pour plus de lisibilité, seules les espèces présentant une valeur de b_k supérieure à 0,5 ou inférieure à -0,5 ont été représentées ; les ellipses regroupent les points pour lesquels le même résultat a été obtenu lors de l'analyse statistique ; différence significative par rapport aux témoins : * : $0,01 < P < 0,05$, ** : $0,001 < P < 0,01$, *** : $P < 0,001$).

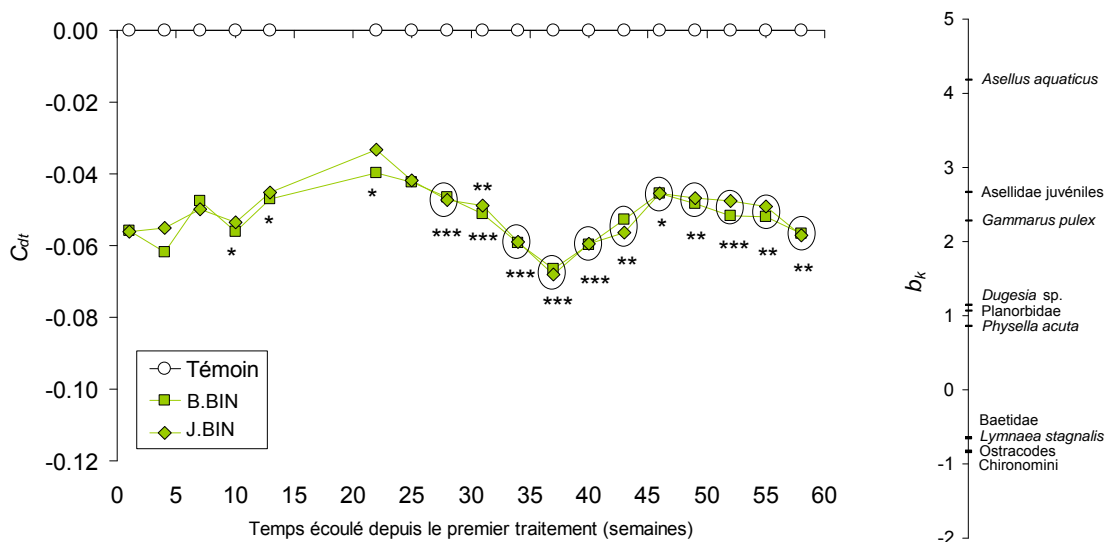


Figure 36. Première Courbe de Réponse Principale (PRC) obtenue pour la réponse des communautés de macroinvertébrés à l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" de protection du colza pour les deux situations agropédoclimatiques (pour plus de lisibilité, seules les espèces présentant une valeur de b_k supérieure à 0,5 ou inférieure à -0,5 ont été représentées ; les ellipses regroupent les points pour lesquels le même résultat a été obtenu lors de l'analyse statistique ; différence significative par rapport aux témoins : * : $0,01 < P < 0,05$, ** : $0,001 < P < 0,01$, *** : $P < 0,001$).

Un effet significatif global des traitements "bas intrants pesticides" a été mis en évidence ($P = 0,028$) avec des différences significatives entre systèmes témoins et systèmes exposés aux traitements "Jaillière Bas intrants pesticides" dès la 10^{ème} semaine après le premier traitement (Fig. 36). Dans le cas des mésocosmes exposés aux traitements "Brie Bas intrants pesticides", des effets significatifs ont été mis en évidence à partir de la 28^{ème} semaine après le début des traitements. A partir de ce moment et jusqu'à la fin de l'étude des différences significatives entre mésocosmes témoins et contaminés ont été mises en évidence, sans influence de la situation agropédologique considérée. Comme dans le cas des traitements "classiques", les groupes négativement affectés sont certains Crustacés (aselles, gammares), auxquels s'ajoutent certains Mollusques Gastéropodes (Planorbidae, *P. acuta*) et les planaires du genre *Dugesia*. Inversement, une augmentation de l'abondance de certains insectes (larves d'Ephéméroptères Baetidae et de Diptères Chironomini), des ostracodes et de *L. stagnalis* dans les mésocosmes contaminés a été mise évidence.

Selon Brock *et al.* (2000b), des effets des pesticides sur les invertébrés aquatiques sont susceptibles de se produire pour des valeurs de *TU Daphnia* supérieures à 0,01 ou 0,1 en fonction des substances considérées.

Dans le cas de l'itinéraire "classique" de protection phytosanitaire du blé, le seuil de 0,01 a été dépassé pendant pratiquement toute la durée de l'étude, avec des valeurs maximales en automne associées aux concentrations en bifenthrine dans l'eau. Juste après le traitement avec cet insecticide, de nombreuses larves et adultes d'insectes morts ont été observés dans les mésocosmes contaminés. Les crustacés benthiques présentent une sensibilité importante vis-à-vis des pyréthriinoïdes, dont la bifenthrine (Anderson *et al.*, 2006; Weston *et al.*, 2008). Par exemple, Surprenant (1988 *in* Palumbo *et al.*, 2010) a mis en évidence une mortalité d'aselles (*Asellus* sp.) à partir d'une concentration en bifenthrine dans l'eau de 0,30 µg/L. Dans des mares expérimentales contaminées via la dérive et le ruissellement à partir de parcelles traitées 10 fois en été avec une préparation commerciale contenant de la bifenthrine, une réduction de la densité des macroinvertébrés suivie d'une restauration a été mise en évidence pour des concentrations dans l'eau comprises entre 1 et 10 ng/L (Sherman 1989 *in* Palumbo *et al.*, 2010). Des effets négatifs sur la survie et la reproduction des Planorbidae ont aussi mis en évidence au cours de cette étude. La bifenthrine a une forte affinité pour les sols et le carbone organique ($K_{oc} = 236610$ mL/g ; Footprint PPDB), ce qui suggère qu'une fraction significative de la masse d'insecticide introduite dans les mésocosmes a pu s'adsorber sur les sédiments et d'autres substrats (litière par exemple) présents dans les mésocosmes. La toxicité de ces résidus adsorbés était probablement plus faible que celle des résidus présents dans la colonne d'eau comme cela a été montré en laboratoire chez *Chironomus tentans* (Xu *et al.*, 2007).

Les effets les plus importants des traitements "bas intrants pesticides" de protection du blé ont été observés après les traitements au cyprodinil. En compilant les données de toxicité aiguë disponibles pour cette substance, il est possible de construire une distribution de sensibilité des espèces (*Species Sensitivity Distribution* ou SSD) et de déterminer des concentrations seuils à risque pour les invertébrés (Fig. 37). Sur la base des valeurs de $CE_{50,48 h}$ disponibles dans Agritox, une HC_5 de 32,1 µl (intervalle de confiance : 41,8-105,7 µg/L) a été déterminée à l'aide du logiciel ETX 2.0 (RIVM, 2004).

Les fractions d'espèces affectées prédites pour les concentrations maximales d'exposition mesurées au cours de cette étude ($165 \pm 36,6$ et $195,6 \pm 13,5$ µg/L pour les traitements B.BIP et J.BIP, respectivement) sont comprises entre 21,9 et 24,7 %, ce qui confirme le risque important présenté par le cyprodinil pour les communautés d'invertébrés des mésocosmes contaminés. L'impact très important de cette substance au cours de cette étude est en grande partie lié à son surdosage lors du second traitement. Toutefois, les valeurs de *TU Daphnia* déterminées juste après le premier traitement suggèrent que des effets auraient sans doute été observés, y compris en l'absence de surdosage.

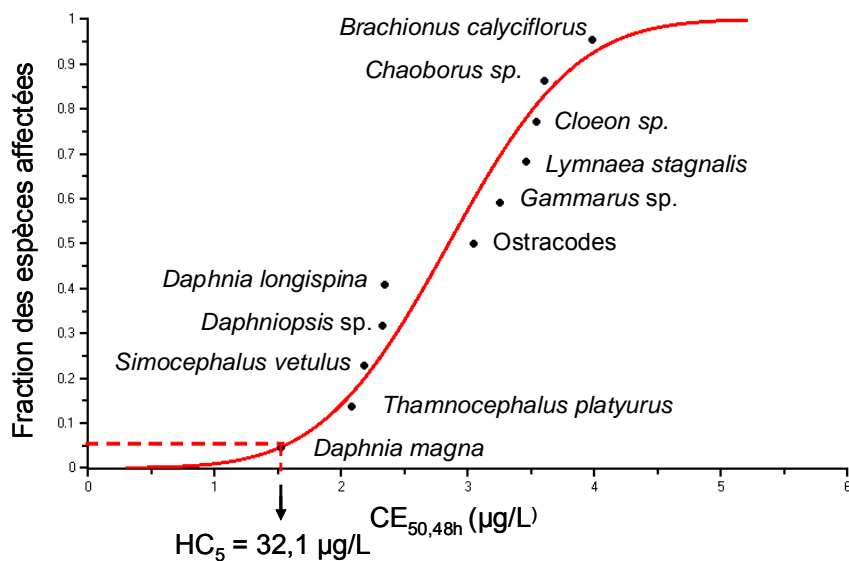


Figure 37. Courbe de distribution de sensibilité des espèces d'invertébrés au cyprodinil établie à l'aide du logiciel ETX 2.0 à partir des données de toxicité aiguë compilées dans Agritox.

Les résultats obtenus pour les deux itinéraires techniques de protection du colza présentent des similitudes mais aussi quelques différences. Aucun effet de la situation agropédoclimatique n'a été mis en évidence. Les effets les plus importants ont été détectés à partir de la 25^{ème} semaine après le premier traitement, sans qu'une restauration ne soit observée avant la fin de l'étude, en octobre 2010. Dans le cas des traitements "classiques", les valeurs des $UT_{Daphnia}$ pour la lambda-cyhalothrine indiquent l'existence d'un risque important après le traitement avec cet insecticide en septembre. Une tendance à la diminution des valeurs de C_{dt} a bien été observée à cette période pour les mésocosmes contaminés, mais aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence par rapport aux témoins. Les effets observés au printemps correspondent pour tous les mésocosmes aux conséquences de la contamination par la deltaméthrine (avec, dans le cas de l'itinéraire technique "classique", un effet additionnel possible du tau-fluvalinate). Dans tous les systèmes, les Crustacés benthiques (gammare, aselles) ont été fortement impactés négativement. Dans les mésocosmes utilisés pour les traitements de l'itinéraire technique "classique", une augmentation de l'abondance de divers groupes de Mollusques Gastéropodes et des larves de Diptères Chironomini a été mise en évidence. Il pourrait s'agir d'un effet indirect de la raréfaction des Crustacés Isopodes et Amphipodes qui aurait conduit à une augmentation de la quantité de nourriture disponible pour ces groupes.

Cet effet indirect a été moins marqué dans le cas des traitements "bas intrants pesticides". En effet, si une augmentation a bien été observée pour les larves de Chironomini et pour *L. stagnalis*, certains groupes de Mollusques ont été négativement impactés dans les systèmes traités, notamment les Planorbidae et *P. acuta*. Etant donné que le cyprodinil a persisté à des concentrations élevées dans les systèmes contaminés pendant toute la seconde phase de l'étude, un effet à long terme de cette substance ne peut être exclu.

Chez les insectes des patrons de réponse opposés ont été observés pour les larves de Baetidae d'une part et pour les larves de Chironomidae d'autre part, notamment pour les traitements "bas intrants pesticides" de protection du blé. L'augmentation dans ces derniers de l'abondance des larves de Chironomidae au printemps est probablement une conséquence indirecte des effets négatifs observés pour d'autres groupes, notamment les larves de Baetidae et les Mollusques Gastéropodes. Un effet négatif des deux itinéraires techniques de protection du blé a été mis en évidence sur les Mollusques Gastéropodes mais son origine n'est pas claire. Dans de nombreuses expérimentations en mésocosmes,

ces animaux se sont plutôt montrés peu sensibles, leurs abondances ayant même parfois tendance à augmenter dans les systèmes traités (Van Wijngaarden *et al.*, 2004 ; Roessink *et al.*, 2005 ; Brock *et al.*, 2009). Ceci est généralement considéré comme la conséquence d'une toxicité plus faible des pesticides pour ces organismes comparativement aux autres invertébrés, notamment les arthropodes. Il y a très peu de données sur la toxicité des substances utilisées ici sur ces organismes, en dehors du cyprodinil, ce qui ne permet pas de conclure.

Lorsque l'on considère les résultats obtenus en ce qui concerne les communautés de macroinvertébrés pour les deux années de l'étude, il apparaît une dégradation de plus en plus prononcée de leur structure, avec notamment un effet négatif persistant sur les Crustacés Isopodes (aselles) et Amphipodes (gammares), et une absence de restauration à l'issue de la seconde année. Dans le cas des mésocosmes utilisés pour les traitements "bas intrants pesticides", la persistance à long terme du cyprodinil explique partiellement ces résultats.

Dans les mésocosmes utilisés pour les traitements "classique" de protection phytosanitaire du blé, la restauration de l'abondance de nombreux groupes benthiques a été mise en évidence au printemps 2009. Des expérimentations réalisées précédemment dans des systèmes expérimentaux lenticques ont montré que la restauration des communautés de macroinvertébrés découle pour l'essentiel d'une recolonisation externe à partir d'autres écosystèmes (Caquet *et al.*, 2007), à moins qu'une partie des systèmes ne soit pas contaminée (Brock *et al.*, 2009). Le patron observé au cours de cette étude confirme que pour les insectes tels que les Baetidae ou les Tanypodinae, la restauration est liée à la ponte d'adultes volants. Après un traitement unique avec de la deltaméthrine effectué en avril, Caquet *et al.* (2007) ont observé qu'un délai de 12 semaines était suffisant pour que la restauration des populations larvaires de Baetidae soit effective alors qu'au cours de cette étude 34 semaines ont été nécessaires. Ces insectes peuvent présenter plusieurs générations par an mais il n'y a pas en général d'adultes volants en automne et en hiver. L'importante différence dans la dynamique de restauration entre les deux études est donc sans doute liée au fait que les traitements n'ont pas été réalisés à la même saison.

Quel que soit le traitement considéré (blé/colza, classique/bas intrants pesticides), aucune restauration n'a été observée pour les populations de *G. pulex* et d'aselles (*Asellus aquaticus*, juvéniles d'aselles), ce qui est cohérent avec la sensibilité élevée et avec le faible potentiel de dispersion et de restauration de ces espèces dans les milieux lenticques (colonisation difficile pour des systèmes qui ne présentent pas de connexion physique avec un milieu non contaminé, pas de formes volantes, ni de stades aquatiques non sensibles tels que des œufs de durée par exemple). Ils sont de ce fait plus facilement enclins à disparaître de systèmes isolés contaminés par des pesticides (Brock *et al.*, 2009).

- Insectes émergents

Les effets des traitements sur l'abondance des différents groupes d'insectes émergents échantillonnés à l'aide des pièges disposés à la surface des mésocosmes ont été analysés en utilisant la méthode de la première courbe de réponse principale. Des analyses séparées ont été réalisées pour les deux années agronomiques (blé et colza) et pour les itinéraires techniques "classiques" d'une part et "bas intrants pesticides" d'autre part. Le tableau 15 résume les résultats obtenus en présentant les niveaux de significativité statistique associés aux PRC et les pourcentages de la variabilité totale des données liés au temps et aux traitements, respectivement.

Dans tous les cas, le pourcentage de la variabilité totale des données lié au temps est très élevé, ce qui reflète la dynamique intra-annuelle des émergences, avec une alternance de phases sans émergence (automne-hiver) et de phases d'émergence intense (printemps-été).

Un effet global significatif des traitements a été mis en évidence uniquement pour l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" de protection du blé à partir de la 28^{ème} semaine après le premier traitement (Fig. 38). L'analyse des contributions des différents groupes taxonomique révèle une augmentation significative de l'abondance d'adultes de chironomes (Orthoclaadiinae, Chironominae, Tanypodinae et Corynoneurinae) et de Baetidae. Cet effet s'est estompé progressivement et plus aucune différence n'était observable à la fin de la première année d'étude.

Tableau 15. Résumé des résultats de l'analyse par PRC appliquée aux données d'abondance du zooplancton échantillonné dans la colonne d'eau des mésocosmes utilisés pour l'étude des différents scénarios de contamination.

Scénario	Blé Classique	Blé Bas intrants pesticides	Colza Classique	Colza Bas intrants pesticides
Significativité de l'effet des traitements	$P = 0,32$	$P = 0,02$	$P = 0,165$	$P = 0,49$
Significativité de la première PRC	$P = 0,35$	$P = 0,009$	$P = 0,252$	$P = 0,71$
Pourcentage de la variabilité totale des données lié au temps	53,4 %	57,1 %	42,4 %	42,6 %
Pourcentage de la variabilité totale des données lié aux traitements (Pourcentage associé à la première PRC)	11 % (31,8 %)	15,2 % (58,5 %)	14,2 % (33,8 %)	12,9 % (29,4 %)

Cette augmentation de l'abondance de certains groupes au sein des insectes émergents est la conséquence directe de l'augmentation de l'abondance des larves de ces mêmes groupes dans les échantillons de macroinvertébrés (Fig. 34). Il s'agit d'une conséquence indirecte des traitements, et plus particulièrement de l'effet négatif du cyprodinil sur l'abondance de certains détritivores (gammares et aselles).

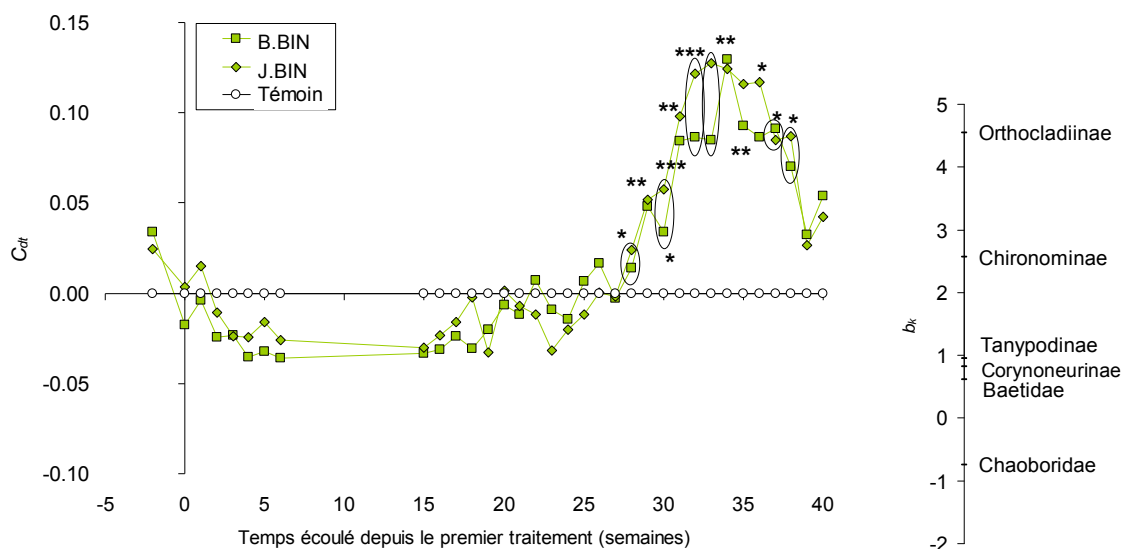


Figure 38. Première Courbe de Réponse Principale (PRC) obtenue pour la réponse des insectes émergents à l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" de protection du blé pour les deux situations agropédoclimatiques (pour plus de lisibilité, seules les espèces présentant une valeur de b_k supérieure à 0,5 ou inférieure à -0,5 ont été représentées ; les ellipses regroupent les points pour lesquels le même résultat a été obtenu lors de l'analyse statistique ; différence significative par rapport aux témoins : * : $0,01 < P < 0,05$, ** : $0,001 < P < 0,01$, *** : $P < 0,001$).

1.8.6. Conséquences des traitements sur un processus fonctionnel, la dégradation de la litière

Au cours des trois campagnes de mesure, la vitesse de fragmentation des feuilles a été significativement réduite dans les pochettes à grandes mailles disposées dans les mésocosmes exposés à l'itinéraire technique "classique" (ANOVA, $P < 0,001$). Des impacts négatifs significatifs ont aussi été observés en réponse à l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" mais uniquement lors des deux premières campagnes de mesure (automne 2008 et printemps 2009 ; Fig. 39). Une différence significative entre les deux itinéraires techniques ("Classique" et "Bas intrants pesticides") a été mise en évidence uniquement au sein des pochettes à grandes mailles avec une vitesse de fragmentation inférieure dans les mésocosmes contaminés selon l'itinéraire technique "classique". Aucun effet des situations agropédoclimatiques (Jaillière ou Brie) n'a été observé.

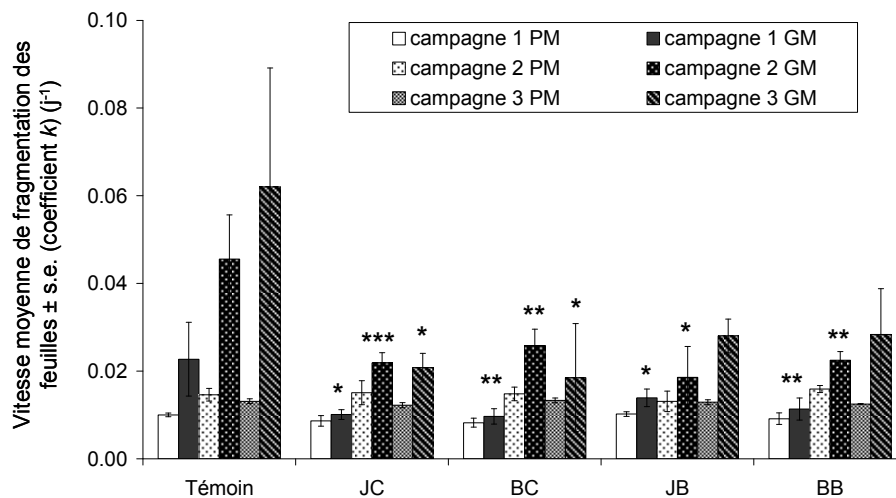


Figure 39. Vitesse de fragmentation des feuilles d'aulne (coefficient k , moyenne \pm s.e.) au sein des pochettes à grandes mailles (GM) et à petites mailles (PM) dans chacune des 5 modalités de traitement (T: Témoin, JC: Jaillière Classique, BC: Brie Classique, JB: Jaillière Bas intrants pesticides, BB: Brie Bas intrants pesticides) au cours des trois campagnes de mesure de la dégradation de la litière (campagne 1 durant l'automne 2008, campagne 2 durant le printemps 2009 et campagne 3 durant l'automne 2009). Résultats de l'analyse de covariance: ***: $P < 0,001$; **: $0,001 < P < 0,01$; *: $0,01 < P < 0,05$.

Quelle que soit la campagne considérée et uniquement au sein des mésocosmes témoins, les feuilles contenues dans les pochettes à grandes mailles ont été fragmentées plus vite que les feuilles présentes dans les pochettes à petites mailles (ANOVA, $P < 0,001$). Ceci suggère que seuls les macroinvertébrés ont été négativement affectés (diminution de leur abondance) par les traitements dans les mésocosmes contaminés.

Quelle que soit la modalité de traitement considérée, un effet de la campagne de mesure a été mis en évidence dans les pochettes à grandes et à petites mailles (ANOVA, $P = 0,006$ et $P < 0,001$, respectivement), suggérant un effet de la température de l'eau sur la dégradation de la litière (campagne n°1 : $T = 6^{\circ}\text{C}$; campagne n°2 : $T = 16^{\circ}\text{C}$; campagne n°3 : $T = 9^{\circ}\text{C}$). Cependant, la vitesse de fragmentation dans les pochettes à grandes mailles introduits lors de la campagne d'automne 2009 dans les mésocosmes témoins et "bas intrants pesticides" était plus importante que celle mesurée lors de la campagne du printemps de cette même année alors que la température de l'eau était plus élevée au cours de cette dernière. Ceci nous a amené à analyser la composition des communautés en termes d'identité des espèces de macroinvertébrés présentes dans les pochettes en vue d'analyser le rôle de ces espèces vis-à-vis du processus de fragmentation de la litière. La relation entre la vitesse de

fragmentation des feuilles et l'abondance de macroinvertébrés consommateurs de feuilles et autres débris végétaux a été examinée. L'identification des groupes consommateurs de feuille a été réalisée grâce à des tables de références indiquant l'affinité des macroinvertébrés aquatiques vis-à-vis de divers traits biologiques et écologiques (voir Usseglio-Polatera *et al.*, 2000).

Quelle que soit la campagne, la vitesse de fragmentation au sein des pochettes à grande maille était significativement corrélée à l'abondance de consommateurs de débris végétaux (ANOVA, $P < 0,001$ pour chacune des corrélations; Fig. 40), confortant ainsi l'hypothèse de l'existence d'une relation quantitative entre ces deux paramètres. L'abondance d'animaux consommateurs de débris végétaux a toujours été inférieure dans les mésocosmes traités par comparaison aux mésocosmes témoins (ANOVA, $P < 0,001$). Par conséquent, la diminution de la vitesse de fragmentation observée dans les mésocosmes traités est très vraisemblablement due aux effets négatifs qu'ont eu les traitements sur les abondances de taxons consommateurs de débris végétaux (ANOVA, $P < 0,001$).

L'effet positif de la température de l'eau sur la vitesse de dégradation de la litière dans les pochettes à grandes mailles peut être vérifié sur la figure 40 où la pente de la relation entre vitesse de fragmentation et abondance des invertébrés consommateurs de débris végétaux varie selon la campagne (campagne n°1 à n°2 notamment). Cette hypothèse d'un effet positif de la température ne se vérifie pas toujours, par exemple, lorsque l'on examine les résultats obtenus lors des campagnes de mesure n°2 ($T=16^{\circ}\text{C}$) et n°3 ($T=9^{\circ}\text{C}$) pour les mésocosmes témoins. La différence semble être due à la présence d'espèces (*G. pulex* et *L. stagnalis*) qui présentent une efficacité de fragmentation particulièrement importante comparativement aux autres espèces consommatrices de débris végétaux. Ces résultats amènent aussi à s'interroger sur l'existence d'éventuels effets sublétaux sur l'efficacité des macroinvertébrés à fragmenter les feuilles.

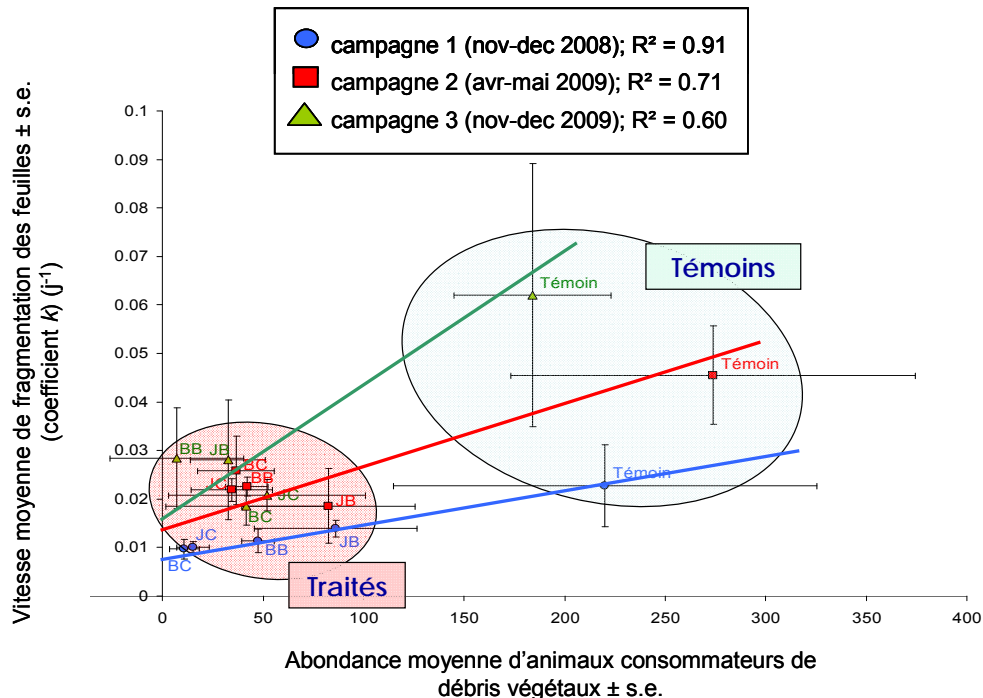


Figure 40. Relation entre vitesse moyenne de fragmentation des feuilles d'aulne (k , moyenne \pm s.e.) et abondance d'invertébrés consommateurs de débris végétaux dans les pochettes à grandes mailles pour chacune des modalités de traitement (Témoins ; JC: Jaillière Classique ; BC: Brie Classique ; JB: Jaillière Bas intrants pesticides ; BB: Brie Bas intrants pesticides) au cours des trois campagnes.

En résumé, quelle que soit la campagne considérée, les traitements pesticides ont induit des diminutions significatives de la vitesse de fragmentation (Fig. 39) en raison de l'impact négatif qu'ont eu les traitements sur les abondances de consommateurs de feuilles. Certains des résultats amènent aussi à s'interroger sur les processus qui régissent la relation entre la structure des communautés et le processus fonctionnel de fragmentation de la litière (composition des communautés, effet de la température, effets sublétaux).

En ce qui concerne les communautés microbiennes, les résultats des analyses de concentration en ergostérol dans les échantillons de feuilles d'aulne prélevés dans les pochettes à litière sont présentés sur la figure 41.

Pour chaque campagne, les effets du temps d'immersion, du type de pochette et du traitement ont été analysés à l'aide d'une analyse de variance à 3 facteurs. Les résultats de cette ANOVA montrent que, quelle que soit la campagne considérée, aucun effet significatif du type de pochette n'a été mis en évidence. Pour les deux campagnes d'automne (novembre-décembre 2008 et 2009), un effet significatif du temps d'immersion a été mis en évidence, avec une augmentation de la concentration en ergostérol au cours du temps (test *post-hoc* de Tukey, $P < 0,001$). Ceci concorde avec le fait que les feuilles mortes sont naturellement colonisées par les champignons hyphomycètes aquatiques. En ce qui concerne les effets des traitements, le seul effet significatif mis en évidence concerne la seconde campagne (mai 2009) au cours de laquelle la concentration en ergostérol était plus faible dans les échantillons prélevés dans les mésocosmes utilisés pour le traitement 'Jaillièrre-Bas intrants pesticides' (concentration moyenne \pm e.s. = $104,5 \pm 2,9$ et $81,3 \pm 3,7$ $\mu\text{g/g}$ feuille pour les mésocosmes témoins et J.BIP, respectivement ; test *post-hoc* de Dunnett, $P = 0,017$). Aucun effet de ce type n'ayant été observé pour les échantillons provenant des mésocosmes "Brie-Bas intrants pesticides", il n'est pas possible de conclure à un effet significatif des traitements fongicides de printemps sur la biomasse des champignons hyphomycètes dans les pochettes à litière.

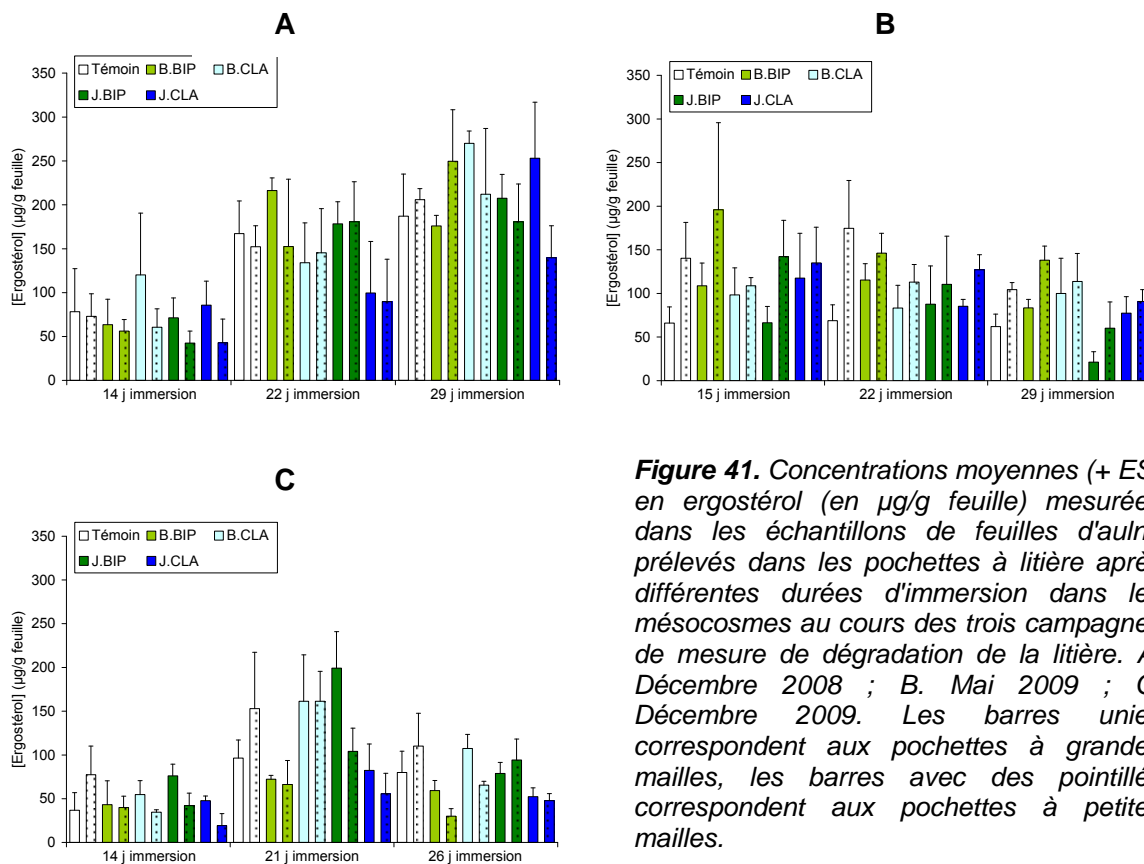


Figure 41. Concentrations moyennes (+ ES) en ergostérol (en $\mu\text{g/g}$ feuille) mesurées dans les échantillons de feuilles d'aulne prélevés dans les pochettes à litière après différentes durées d'immersion dans les mésocosmes au cours des trois campagnes de mesure de dégradation de la litière. A. Décembre 2008 ; B. Mai 2009 ; C. Décembre 2009. Les barres unies correspondent aux pochettes à grandes mailles, les barres avec des pointillés correspondent aux pochettes à petites mailles.

Tableau 16. Résultats de l'analyse de variance à un facteur appliquée aux données de concentration en ergostérol dans les échantillons de feuilles d'aulne prélevés dans les pochettes à litière immergées dans les mésocosmes afin de déterminer l'existence d'un effet campagne. Les chiffres entre parenthèses correspondent à la probabilité associée au test F lorsque celui-ci a mis en évidence une différence significative, signalée par un astérisque. ns : différence non significative. c1 : campagne n°1 ; c2 : campagne n°2 ; c3 : campagne n°3.

Traitement	Type de pochette	Effet Campagne
Témoïn	GM	ns
	PM	ns
	Tous	ns
B.BIP	GM	* (0,039) ; c1 < c3, c2=c3, c1=c2 ^a
	PM	ns
	Tous	* (0,046) ns ^a
B.CLA	GM	ns
	PM	ns
	Tous	ns
J.BIP	GM	* (0,017) ; c1 > c2, c1 = c3, c2 = c3 ^a
	PM	ns
	Tous	* (0,013) ; c1 > c2, c1 = c3, c2 = c3 ^a
J.CLA	GM	ns
	PM	ns
	Tous	ns
Tous	GM	* (0,018) ; c1 > c2, c1 > c3, c2 = c3 ^a
	PM	ns
	Tous	** (0,007) ; c1 > c3, c1 = c2, c2 = c3 ^a

^a test post-hoc de Tukey

1.9. Conclusions de l'étude en mésocosmes

L'ensemble des informations concernant les effets des traitements sur les différents paramètres structurels et fonctionnels suivis pendant deux ans dans les mésocosmes a été regroupé, de manière synthétique, en suivant un classement hiérarchique dérivé de celui proposé par selon les critères de Brock *et al.* (2000a, 2000b) :

- Classe 1 : Aucun effet démontré
- Classe 2 : Effets modérés
- Classe 3 : Effets prononcés à court terme, avec restauration dans les 8 (6) semaines qui suivent le dernier traitement
- Classe 4 : Effets prononcés à court terme
- Classe 5 : Effets prononcés à long terme, avec une durée de restauration supérieure à 8 (6) semaines après le dernier traitement

Dans le cas des itinéraires techniques de protection du blé (Tableau 17), ce classement a permis de montrer que :

- les substances utilisées dans le cas des conduites de cultures "classiques" ou "bas intrants pesticides" n'ont pas eu d'effet ou n'ont eu que des effets modéré sur les caractéristiques physico-chimiques de l'eau et sur les communautés de microalgues, même si, pour ces dernières, des effets un peu plus marqués ont pu être observés pour les organismes du périphyton exposés aux substances proposées dans l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" lorsque celles-ci atteignent le milieu aquatique au printemps ;

- les substances utilisées dans le cas des conduites de cultures "classiques" ou "bas intrants pesticides" ont été à l'origine d'effets modérés et, le plus souvent, prononcés à court terme sur (i) le zooplancton, impacté par les substances apportées au milieu aquatique à l'automne dans le cas des itinéraires techniques "classiques" et au printemps dans le cas des itinéraires techniques "bas intrants pesticides" et (ii) les insectes émergents, impactés sur la période printemps-été, surtout dans le cas de l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" ;
- les substances utilisées dans le cas des conduites de cultures "classiques" ou "bas intrants pesticides" ont été à l'origine d'effets prononcés, y compris sur le long terme, sur les macroinvertébrés benthiques et, corrélativement, sur la dégradation de la litière, ceci traduisant une atteinte fonctionnelle des écosystèmes aquatiques liée à une réduction marquée et durable de l'abondance de nombreux taxons d'invertébrés, (principalement crustacés et mollusques et, dans une moindre mesure, insectes).

Dans le cas des itinéraires techniques de protection du colza (Tableau 18), le classement hiérarchique des effets a permis de distinguer de façon nette :

- l'absence d'effet des substances utilisées dans le cas des conduites de cultures "classiques" ou "bas intrants pesticides" sur les caractéristiques physico-chimiques de l'eau, les communautés de microalgues (phytoplancton et périphyton), et les insectes émergents, même si ces derniers ont été modérément (transitoirement) affectés dans le cas des itinéraires techniques "classiques" ;
- la présence d'effets prononcés, à plus ou moins court terme (*i.e.*, avec ou sans restauration) des substances utilisées dans le cas des conduites de cultures "classiques" ou "bas intrants pesticides" sur le zooplancton, les macro-invertébrés benthiques et la dégradation de la litière, ces effets se produisant le plus souvent lors des apports de pesticides à l'automne et en hiver, sauf dans le cas des itinéraires techniques "bas intrants pesticides" où les effets sur les macro-invertébrés benthiques ont été observés sur la période printemps-été.

Tableau 17. Synthèse des effets des pesticides introduits dans les mésocosmes sur les différents paramètres structurels et fonctionnels suivis dans le cas des itinéraires techniques de protection phytosanitaire du blé correspondant à une conduite de culture "classique" (CLA) ou "bas intrants pesticides" (BIP) dans les scénarios agropédoclimatiques de La Jaillière (J) et de la Brie (B). Les classes numérotées de 1 à 5 correspondent aux critères définis par Brock et al. (2000). Les flèches indiquent le sens des variations observées. La saison où ces effets ont été observés est indiquée entre parenthèses (*aut.* : automne, *prin.* : printemps).

	J.CLA	B.CLA	J.BIP	B.BIP
Physico-chimie	1	1	1	1
Phytoplancton	2↓ (aut.)	2↓ (aut.)	2↓ (aut.) 2↑ (prin.)	2↓ (aut.) 2↑ (prin.)
Périphyton	1	1	3↑ (prin.)	2↑ (prin.)
Zooplancton				
Crustacés	3 ↓ (aut.)	3 ↓ (aut.)	3 ↓ (prin.-été)	3 ↓ (prin.-été)
Rotifères	3 ↑ (aut.)	3 ↑ (aut.)	3 ↑ (prin.-été)	3 ↑ (prin.-été)
Invertébrés benthiques	5 ↑↓	5 ↑↓	5 ↑↓	5 ↑↓
Insectes émergents	2 ↓ (été)	2 ↑ (prin.) 2 ↓ (été)	3 ↑ (prin.-été)	3 ↑ (prin.-été)
Dégradation litière	4 ↓	4 ↓	4 ↓	4 ↓

Tableau 18. Synthèse des effets des pesticides introduits dans les mésocosmes sur les différents paramètres structurels et fonctionnels suivis dans le cas des itinéraires techniques de protection phytosanitaire du colza correspondant à une conduite de culture "classique" (CLA) ou "bas intrants pesticides" (BIP) dans les scénarios agropédologiques de La Jaillière (J) et de la Brie (B). Les classes numérotées de 1 à 5 correspondent aux critères définis par Brock et al. (2000). Les flèches indiquent le sens des variations observées. La saison où ces effets ont été observés est indiquée entre parenthèses (aut. : automne, prin. : printemps).

	J.CLA	B.CLA	J.BIP	B.BIP
Physico-chimie	1	1	1	1
Phytoplancton	1	1	1	1
Périphyton	1	1	1	1
Zooplancton				
Crustacés	4 ↓ (aut.)	4 ↓ (aut.-hiv.)	4 ↓ (aut.-hiv.)	4 ↓ (aut.-hiv.)
Rotifères	4 ↑↓ (hiv.)	4 ↑↓ (aut.-hiv.)	4 ↑↓ (aut.-hiv.)	4 ↑↓ (aut.-hiv.)
Invertébrés benthiques	3 ↑↓ (aut.)	3 ↑↓ (aut.)	3 ↑↓ (prin.-été)	3 ↑↓ (prin.-été)
Insectes émergents	2	2	1	1
Dégradation litière	4 ↓	4 ↓	4 ↓	4 ↓

Dans le cas des deux types de culture, les différences de résultats entre les deux situations agropédologiques sont faibles. Ceci suggère que les effets découlent pour l'essentiel des apports en pesticides liés à la dérive (ces apports sont identiques pour les deux situations) et que les autres voies de transfert contribuent peu à l'impact final des traitements. Il apparaît donc que la limitation des pertes par dérive au moment des traitements (emploi de buses anti-dérives, augmentation des ZNT, etc.) est le principal levier sur lequel agir pour réduire les impacts non intentionnels des traitements sur les milieux aquatiques situés à proximité des parcelles.

Sur la base des mesures de concentrations en résidus de pesticides dans l'eau, il est possible d'identifier les substances responsables des effets observés. En dehors d'un éventuel effet ponctuel du mélange d'herbicides appliqués lors du premier traitement des itinéraires techniques de protection du blé, les effets sont liés à la contamination par :

- les insecticides pyréthrinoïdes ; il s'agit plus particulièrement de la bifenthrine (itinéraire "classique") et de la deltaméthrine (itinéraires "classique" et "bas intrants pesticides"), les effets de la lambda-cyhalothrine ayant été en général moins marqués.
- le cyprodinil, fongicide utilisé sur le blé dans le cas des traitements "bas intrants pesticides". L'effet drastique de cette substance est partiellement dû à un surdosage lors du deuxième traitement mais dès la première application les niveaux d'exposition étaient suffisamment élevés pour présenter un risque important pour les communautés d'invertébrés (zooplancton et macroinvertébrés).

2. Bioessais *ex situ*

2.1. Préconditionnement des échantillons d'eau

Après chacun des traitements qui ont eu lieu au cours de la première année d'étude (octobre 2008 à novembre 2009), la toxicité aiguë de l'eau des mésocosmes contaminés a été évaluée à l'aide de tests réalisés en laboratoire sur trois modèles biologiques, une microalgue (*Desmodesmus subspicatus*), un crustacé planctonique (*Daphnia magna*) et un mollusque gastéropode (*Lymnaea stagnalis*). Les tests ont été réalisés en utilisant des échantillons d'eau des mésocosmes prélevés 24 h après les traitements, conjointement à celle destinée à l'analyse des résidus et par la même méthode (voir § 1.5).

L'eau a tout d'abord été filtrée avec une membrane de porosité 0,45 µm afin d'éliminer débris et petits organismes. Une partie de l'eau de cette première filtration était destinée aux bioessais avec *Daphnia magna* et *Lymnaea stagnalis*. L'autre partie de cette première filtration a subi une seconde filtration avec une membrane de porosité 0,20 µm. Cette eau a ensuite été utilisée pour les tests avec *Desmodesmus subspicatus*. Cette filtration plus poussée a permis d'éliminer les bactéries présentes dans l'eau des mésocosmes.

Tous les échantillons filtrés ont ensuite été placés au congélateur à -20°C.

Après décongélation, les échantillons d'eau des mésocosmes ont été dilués à 0%, 48%, 74%, 87% et 94% avec de l'eau déchlorée (pour *D. magna* et *L. stagnalis*) ou de l'eau déminéralisée autoclavée (pour *D. subspicatus*), afin d'obtenir une gamme de concentrations croissantes (Tableau 19) utilisée pour les tests de toxicité sur chacune des trois espèces.

Tableau 19. Gamme de concentrations utilisée pour les bioessais *ex-situ* sur *Desmodesmus subspicatus*, *Daphnia magna* et *Lymnaea stagnalis*.

Concentration	C1	C2	C3	C4	C5
Proportion d'eau des mésocosmes	6%	13%	26%	52%	100%
Proportion d'eau déchlorée ou déminéralisée autoclavée	94%	87%	74%	48%	0%

2.2. Bioessai *ex situ* avec l'algue verte *Desmodesmus subspicatus*

Desmodesmus subspicatus (R. Chodat) E. Hegewald & A. Schmidt (anciennement *Scenedesmus subspicatus* ; Figure 42) est une chlorophycée couramment utilisée pour évaluer la toxicité aiguë des produits chimiques. Elle est notamment utilisée dans le test normalisé NF EN 28692 « Qualité de l'eau – Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum* » (norme internationale ISO8692 :1989). Ce test, réalisé en erlenmeyer, a pour inconvénient d'être consommateur d'espace, de temps, de matériel expérimental et de solution d'essai.

Dans le cadre de ce programme, compte-tenu du nombre important de modalités à tester, le choix a été fait de mettre au point une version miniaturisée de ce test. A partir de la compilation d'informations recensées dans différentes publications (Blaise *et al.*, 1986 ; St-Laurent *et al.*, 1992 ; Rojíčková *et al.*, 1998 ; Eisentraeger *et al.*, 2003 ; Environnement Canada, 2007 ; Paixão *et al.*, 2008), un test de toxicité en microplaque 96 puits a été expérimenté.



Figure 42. *Desmodesmus subspicatus*, algue verte utilisée pour les tests ex situ de suivi de la toxicité de l'eau des mésocosmes

Afin de valider ce test avant sa mise en application avec l'eau des mésocosmes, des essais avec une substance toxique de référence, le dichromate de potassium $K_2Cr_2O_7$, ont été réalisés. Pour cela, la souche référencée SAG86.81 de *D. subspicatus*, a été mise en culture à l'U3E. Quatre à sept jours avant le début de chaque test, une pré-culture a été mise en place dans le milieu de culture d'essai afin d'acclimater les cellules algales aux conditions expérimentales du test et de posséder une culture en phase exponentielle de croissance.

Dans chaque puits de la microplaque 96 puits ont ensuite été déposés successivement :

- la solution à tester contenant le toxique de référence;
- le milieu de culture afin de pallier toute carence en éléments nutritifs ;
- l'inoculum algal issu de la pré-culture.

Dans les puits témoins, la solution à tester a été remplacée par de l'eau déminéralisée autoclavée. Cinq dilutions ont été testées en triplicats. La concentration cellulaire a été estimée au début du test et 72 h plus tard afin de déterminer le taux de croissance par unité de temps. La CE_{50-72h} a ensuite été calculée lorsque cela est possible.

Les différents essais réalisés avec le dichromate de potassium $K_2Cr_2O_7$ ne se sont pas avérés satisfaisants car la CE_{50-72h} obtenue était plus élevée que la CE_{50-72h} attendue. Deux herbicides (isoproturon et prosulfocarbe) ont également été testés et le même manque de sensibilité de *D. subspicatus* a été mis en évidence.

Plusieurs pistes ont alors été explorées, notamment lors de la présence d'une stagiaire (Aurore Le Gouge, 2^{ème} année DUT Génie Biologique, IUT de Brest) d'avril à juin 2009 :

(1) Effet du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour la pré-culture et l'essai (issu de la norme ISO8692), est peut-être trop différent de celui utilisé pour la culture de routine (milieu plus riche en substances nutritives). Ainsi, les algues de la pré-culture seraient cultivées en conditions contraignantes, ce qui leur conférerait une certaine tolérance aux substances toxiques ; ceci pourrait expliquer une plus faible sensibilité lors des tests. On peut noter néanmoins que lors du test, quel que soit le milieu utilisé, la croissance dans les puits témoins était toujours suffisante par rapport aux critères de la norme.

(2) Effet de la méthode d'estimation de la concentration cellulaire

L'utilisation de l'absorbance a été définitivement abandonnée car trop peu sensible compte tenu des concentrations algales utilisées.

L'utilisation du comptage pour estimer la concentration cellulaire permet la plupart du temps une détermination de la CE_{50-72h} plus proche de la valeur attendue, mais est irréalisable en routine avec un grand nombre d'échantillons à tester ; de plus, la fluorescence permet de

mettre en évidence et de prendre en compte l'éventuel effet hormétique (stimulation de la croissance cellulaire aux faibles concentrations) d'une substance toxique. Ce phénomène d'hormèse a été intégré dans le calcul de la CE_{50-72h} par l'utilisation du modèle Cedergreen-Ritz-Streibig (Cedergreen *et al.*, 2005).

(3) Effet de la miniaturisation du test

Le fait de réaliser le test en microplaques plutôt qu'en erlenmeyers semble avoir un effet sur la CE_{50-72h} obtenue lorsque la biomasse est estimée par fluorescence; des hypothèses d'échanges gazeux et d'apport de lumière plus limités, impactant la photosynthèse et donc le contenu cellulaire en chlorophylle *a*, ont été émises mais non vérifiées. Si elles s'avéraient justes, il conviendrait de se demander si des microplaques avec des puits plus grands ne seraient pas plus adaptées.

Les essais ont été arrêtés en octobre 2009 car ils étaient trop consommateurs de temps et car la personne chargée de la mise au point ne pouvait plus manipuler de produits toxiques en raison de sa grossesse.

Les échantillons d'eau filtrée des mésocosmes sont actuellement conservés au congélateur, en attendant d'éventuels résultats plus probants pour ce bioessai *ex situ*.

2.2. Bioessai *ex situ* avec *Daphnia magna* (Crustacé, Cladocère)

Le protocole choisi est celui de la norme NF EN ISO 6341 « Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Essai de toxicité aiguë », qui permet de déterminer la CE_{50-48h} de l'eau des mésocosmes sur un crustacé cladocère, *Daphnia magna* (Figure 43).



Figure 43. *Daphnia magna*, crustacé cladocère utilisé pour les tests *ex situ* de suivi de la toxicité de l'eau des mésocosmes

Les daphnies ont été triées dans les élevages maintenus à l'U3E, 24 h avant les tests. Des daphnies adultes ont été isolées dans un aquarium. Le jour du test, les animaux ont été triés par filtration afin de récupérer les jeunes nés depuis l'isolement des adultes. Les animaux ont alors été comptés et placés dans le volume d'eau de dilution en attendant l'ajout du volume complémentaire d'eau des mésocosmes. Cinq individus ont été introduits dans chaque récipient de test, dans un volume total d'eau (eau du mésocosme + eau déchlorée) de 10 mL. Les cinq dilutions de l'eau des mésocosmes (cf. Tableau 17) ont été testées en triplicats. L'eau des mésocosmes témoins a été utilisée pour la réalisation des témoins, dans les mêmes conditions que l'eau des mésocosmes traités.

La température de l'eau était de 20 ± 2 °C et la photopériode était de 16h/8h (jour/nuit). Le dénombrement des individus mobiles a été réalisé 48 h après le début du test afin de déterminer, par différence, le nombre d'individus immobilisés et de pouvoir calculer la CE_{50} après 48 h d'exposition (CE_{50-48h}).

Les bioessais *ex situ* ont été réalisés pour environ la moitié des échantillons prélevés. Le travail expérimental et l'analyse des données obtenues n'ont malheureusement pas pu être achevés, suite au décès de notre collègue chargée de ce travail en décembre 2009.

2.3. Bioessai *ex situ* avec *Lymnaea stagnalis* (Mollusque, Gastéropode)

La lymnée des étangs (*Lymnaea stagnalis*, Figure 44a) est un gastéropode herbivore couramment utilisé en écotoxicologie. Le stade embryonnaire (Figure 44b) est supposé être très sensible à différents types de polluants aquatiques, et le taux d'éclosion de pontes de lymnées placées dans de l'eau potentiellement contaminée peut être mesuré de façon simple et fiable au laboratoire (Gomot, 1998). Cette méthode a donc été retenue pour l'évaluation de la toxicité de l'eau des mésocosmes traités.



a. Stade adulte



b. Stade embryonnaire (28 jours)

Figure 44. *Lymnaea stagnalis*, modèle biologique utilisé pour les tests *ex situ* de suivi de toxicité de l'eau des mésocosmes

Les bioessais *ex situ* impliquent l'exposition d'embryons âgés de moins de 24 h à de l'eau des mésocosmes. Conformément aux recommandations de l'US EPA pour le suivi de la toxicité des eaux naturelles et des effluents (US EPA, 1994), les organismes ont été exposés pendant 35 jours, à température ambiante ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), à une gamme de dilutions de l'eau provenant de chacun des mésocosmes (cf. Tableau 17). Les pourcentages de dilution ont été choisis de façon à permettre un calcul fiable de la CE_{50-35J} (concentration en eau du mésocosme provoquant l'arrêt du développement embryonnaire chez 50% des individus exposés entre 0 et 35 jours). Les dilutions étant réalisées avec de l'eau d'élevage des limnées (eau déchlorée), 3 réplicats constitués de 100% de cette eau ont été réalisés en complément, afin de s'assurer de son innocuité.

Le nombre d'embryons par ponte a été déterminé en début de test (J_0) par observation des pontes à la loupe binoculaire. Les œufs non fécondés (*i.e.*, non viables) n'ont pas été pris en compte dans ce dénombrement. Le nombre J_{35} d'embryons qui restent dans la ponte a été déterminé après 35 jours d'exposition (durée maximale du développement embryonnaire en conditions témoins). Le taux d'éclosion a été calculé pour chaque ponte à partir de J_{35} et J_0 : $(J_0 - J_{35})/J_0$. Si l'exposition à l'eau des mésocosmes (ou à l'eau d'élevage) induisait une diminution significative de cette valeur, alors la valeur de la CE_{50-35J} était calculée selon la méthode non paramétrique de Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977).

Par ailleurs, des bioessais complémentaires ont été réalisés pour démontrer la sensibilité des pontes de lymnée aux substances actives utilisées lors des traitements des mésocosmes. Dans ce contexte, la CE_{50-35J} en laboratoire a été déterminée pour les 14

substances actives¹ les plus utilisées dans les itinéraires techniques étudiés. Enfin, la sensibilité des pontes à un toxique de référence, le dichromate de potassium, a été évaluée un fois par trimestre afin de vérifier que les animaux utilisés pour les bioessais *ex situ* présentent une sensibilité constante en conditions contrôlées (laboratoire) au cours de la période d'étude (octobre 2008 à novembre 2009). Ces deux types de tests ont été réalisés dans les conditions des bioessais *ex situ*, les toxiques étant mélangés à de l'eau d'élevage seulement (pas d'eau des mésocosmes). Ce travail a été réalisé en partie dans le cadre du stage de Corentin Le Bourg (2^{ème} année DUT Génie Biologique, IUT de Brest) d'avril à juin 2009.

L'exposition au dichromate de potassium a permis de démontrer que la sensibilité du matériel biologique utilisé pour les bioessais *ex situ* a bien été constante sur la période étudiée (CE_{50-35J} comprise entre 1,90 et 2,32 mg/l). L'exposition aux substances actives a mis en évidence une grande disparité entre les valeurs de CE_{50-35J} obtenues pour les différents produits étudiés, le cyprodinil s'avérant être le plus toxique des produits testés ($CE_{50-35J} = 70 [65 ; 76] \mu\text{g/L}$), et le prosulfocarbe le moins toxique ($CE_{50-35J} = 5787 [4810 ; 6962] \mu\text{g/L}$) pour les pontes de lymnée. Sauf pour le cyprodinil, les valeurs de CE_{50-35J} obtenues pour les substances actives seules sont supérieures, voir très supérieures (ex : facteur 500 pour le prosulfocarbe) aux concentrations maximales appliquées dans les mésocosmes.

Les bioessais *ex situ* n'ont pas montré d'effet néfaste de l'eau des mésocosmes prélevée pendant la période hivernale (novembre 2008 à mars 2009) sur les pontes de lymnée. En revanche, le développement de ces pontes a été significativement altéré suite à l'exposition aux eaux prélevées dans les bassins traités pendant le printemps (avril 2009 à juin 2009) (Figure 45).

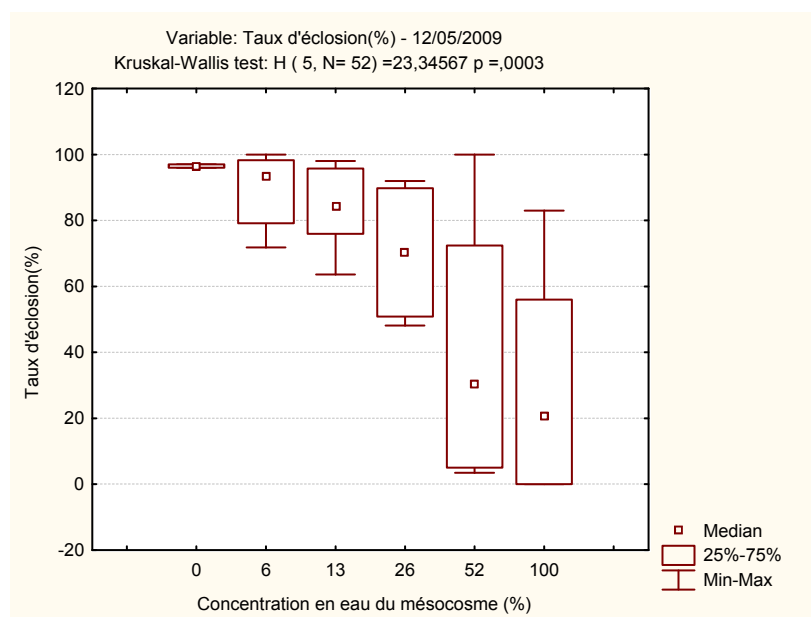


Figure 45. Exemple de courbe concentration-réponse obtenue lors d'un bioessai *ex situ* sur les pontes de *Lymnaea stagnalis* (eaux prélevées suite au traitement du 12/05/2009, itinéraire bas-intrants pesticides, scénario agropédoclimatique "La Jaillière").

¹ Prosulfocarbe, clomazone, napropamide, cyprodinil, azoxystrobine, epoxiconazole, diméthachlore, mésosulfuron-méthyl, bromoxynil octanoate, diflufénican, isoproturon, prochloraz et deltaméthrine.

Ces résultats (absence d'effet toxique en hiver 2008, présence d'effets au printemps 2009) sont en accord avec les résultats du suivi des communautés de macroinvertébrés pour les itinéraires techniques "bas-intrant pesticides" (voir 1.8.5.2). Ainsi, les bioessais *ex situ* conduits sur les pontes de lymnée s'avèrent suffisamment sensibles pour pouvoir détecter de façon fiable l'occurrence d'effets néfastes dus au mélange des substances actives, même lorsque ces dernières sont appliquées à faibles doses ou moins fréquemment (itinéraires bas-intrants pesticides). Les taux d'éclosion les plus faibles ont généralement été obtenus pour l'itinéraire classique tel qu'appliqué suivant le scénario pédoclimatique de La Jaillière. Cependant, les différences observées ne sont pas significatives. Les bioessais *ex situ* ne nous permettent donc pas de conclure quant à d'éventuelles différences d'impact en fonction des itinéraires de traitement et/ou des scénarios pédoclimatiques.

En conclusion, les bioessais *ex situ* sur les pontes de lymnée peuvent être considérés comme un outil fiable pour le suivi de la qualité des eaux potentiellement contaminées par des mélanges de pesticides, mais ne permettent pas de mener une analyse fine des impacts observés (pas de discrimination entre les scénarios agropédoclimatiques et entre les itinéraires techniques).

3. Conclusion générale et recommandations

3.1. Conclusion générale

3.1.1. Caractéristiques physico-chimiques de l'eau des mésocosmes

En ce qui concerne la simulation des transferts de substances actives au milieu aquatique, les résultats obtenus montrent que :

- les modèles choisis simulent convenablement les 3 modes de transfert (dérive de pulvérisation, ruissellement et drainage), en dépit du fait que le modèle PRZM a été choisi par défaut (*i.e.*, paramétrage indépendant des situations agropédoclimatiques de La Jaillière et de la Brie) ;
- les 3 modes de transfert peuvent être simulés de façon synchrone pour 2 combinaisons itinéraires techniques x situations agropédoclimatiques, avec une précision journalière ;
- la voie d'entrée majeure des substances actives dans le milieu aquatique est la dérive pour les produits appliqués en été. Pour le boscalide et certains des herbicides appliqués en automne-hiver (isoproturon, diflufénican), le ruissellement et le drainage contribuent de manière importante, voire majoritaire, au transfert ;
- les concentrations calculées, pour la série d'années de transferts moyens choisie, sont compatibles avec la possibilité d'étudier des effets sur le long-terme à l'échelle de communautés d'organismes aquatiques en mésocosmes, sous réserve de ramener les valeurs à un pas de temps hebdomadaire pour des raisons pratiques (incapacité à traiter les mésocosmes quotidiennement).

3.1.2. Suivi des concentrations en résidus dans l'eau et les sédiments

En ce qui concerne la mesure des concentrations en résidus de pesticides dans l'eau et les sédiments des mésocosmes, le programme EMERITAT a permis :

- le développement et la validation d'une méthode d'analyse rapide en SPE-HPLC-MS/MS, sur de faibles volumes d'échantillons ;
- la détermination des cinétiques de dissipation pour tous les produits et, pour certains d'entre eux, de fournir les éléments nécessaires à l'analyse des cinétiques de dégradation grâce à la mesure des métabolites ;
- le calcul du temps de demi-vie dans l'eau, pour tous les produits (Fig. 14 et 15 ; Tableau 10) ;
- l'estimation des concentrations pondérées d'exposition (*AEC*, pour *Average Exposure Concentrations* ; Fig. 16 et 17) permettant des comparaisons (i) entre les pressions toxiques exercées par chaque type d'itinéraire technique ("classique" vs. "bas intrants pesticides"), et (ii) avec les PNEC estimées pour les différents produits.

3.1.3. Analyse des effets structurels et fonctionnels en mésocosmes

Le suivi, pendant deux ans, des effets de l'exposition aux différents produits phytosanitaires en mésocosmes lenticques a permis :

- l'analyse simultanée de ces effets sur les communautés de microalgues (phytoplancton et périphyton) et d'invertébrés (zooplancton et macroinvertébrés, y compris insectes émergents) ;
- la mise en évidence de l'absence d'impact (ou d'impacts faibles et/ou transitoires) sur les paramètres physico-chimiques de l'eau et les communautés de microalgues ;
- la mise en évidence d'une succession de périodes d'impacts significatifs et de récupération, partielle ou totale, pour les communautés d'invertébrés exposées aux itinéraires techniques "classiques" et "bas intrants pesticides", ces deux types d'itinéraires techniques se traduisant par des effets équivalents, bien que décalés dans le temps ;
- la mise en relation entre les modifications de la structure des communautés de macroinvertébrés et l'altération (*i.e.*, moindre efficacité) du processus de dégradation de la litière dans les mésocosmes traités avec les produits issus des itinéraires techniques "classiques" et "bas intrants pesticides" avec, là encore, des effets équivalents pour les deux types d'itinéraires techniques.

En conclusion, il apparaît que, tels qu'ils ont été conçus pour l'étude réalisée dans le cadre du programme EMERITAT, les itinéraires techniques "classiques" et "bas intrants pesticides" de protection phytosanitaire du blé et du colza produisent des impacts équivalents sur les communautés d'organismes aquatiques de mésocosmes lentiques. Les effets marqués sur la structure des communautés d'invertébrés, en particulier sur les arthropodes, ont des répercussions directes sur le processus fonctionnel de dégradation de la litière d'aulne dans ces mésocosmes.

Toutefois, bien que le fait de réduire les intrants pesticides ne se soit pas traduit par des effets moins importants sur la structure et le rôle fonctionnel des communautés d'invertébrés aquatiques, il convient de préciser que l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" reste préférable dans la mesure où, du fait de la réduction des concentrations et du nombre de passages au champ, il permet de réduire (i) l'exposition de l'applicateur, (ii) le nombre de substances introduites dans l'environnement, et (iii) pour les produits utilisés dans les deux types d'itinéraires techniques, les quantités de substances actives susceptibles de contaminer les milieux aquatiques.

3.2. Recommandations

Certes, le fait de réduire les intrants pesticides contribue à diminuer le nombre de substances introduites dans l'environnement et les quantités de pesticides susceptibles de contaminer les milieux aquatiques, mais ce uniquement pour les produits utilisés dans les deux types d'itinéraires techniques. Cependant, les effets des produits recommandés dans le cas de l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" demeurent importants sur les invertébrés aquatiques en raison :

- de l'application des produits à des périodes critiques de la dynamique des communautés d'organismes aquatiques ;
- du maintien de molécules, comme par exemple la deltaméthrine, qui ont une toxicité très élevée pour les invertébrés, notamment les arthropodes (crustacés et insectes) ;
- de l'utilisation, en substitution, de substances actives dont les effets non intentionnels peuvent s'avérer importants (exemple : cyprodinil) ;

- d'un apport d'une quantité totale de substances actives plus importante (d'environ 14% en poids à l'hectare) dans le cas du blé (pour le colza, en revanche, les quantités de substances actives sont réduites de 23% pour l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" comparativement à l'itinéraire technique "classique").

Par ailleurs, quel que soit l'itinéraire technique, la dérive est le mode de transfert majeur des produits phytosanitaires au milieu aquatique, et les réductions d'intrants dans le cas de l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" n'ont aucun effet sur l'importance de ce phénomène lorsque l'on raisonne en termes de fraction de la quantité épandue.

Les recommandations qui découlent de ces observations et qui permettraient vraisemblablement de minimiser les impacts des itinéraires techniques "bas intrants pesticides" sur le milieu aquatique, sont donc les suivantes :

- revoir, lorsque c'est possible, les périodes d'application des produits phytosanitaires ;
 - envisager la substitution des pyréthrinoïdes par des substances moins toxiques pour les invertébrés aquatiques ;
 - veiller à ce que les substitutions aillent dans le sens de l'utilisation de substances à moindre impact ;
 - veiller à la diminution des quantités totales de substances actives (*i.e.*, substances communes aux itinéraires techniques "classiques" et "bas intrants pesticides" et substances de substitution dans le cas des itinéraires techniques "bas intrants pesticides") ;
 - mettre en place des mesures efficaces de réduction de la dérive de pulvérisation.
-

Références bibliographiques

- Agritox database. Disponible sur Internet à l'URL : <http://www.dive.afssa.fr/agritox/php/fiches.php>.
- American Public Health Association (APHA), 1975. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 14th Ed., American Public Health Association, Washington DC, USA, 1194 pp.
- Anderson B.S., Phillips B.M., Hunt J.W., Connor V., Richard N., Tjeerdema R.S., 2006. Identifying primary stressors impacting macroinvertebrates in the Salinas River (CA, USA): Relative effects of pesticides and suspended particles. *Environ. Pollut.*, 141, 402-408.
- Armstrong A., Aden K., Amraoui N., Dieckrüger B., Jarvis N., Mouvet C., Nicholls P., Wittwer C., 2000. Comparison of the performance of pesticide leaching models on a cracking clay soil: results using the Brimstone Farm dataset. *Agric. Water Mgmt*, 44, 85-104.
- Arts G.H.P., Buijse–Bogdan L.L., Belgers J.D.M., Van Rhenen–Kersten C.H., Van Wijngaarden R.P.A., Roessink I., Maund S.J., Van Den Brink P.J., Brock T., 2006. Ecological impact in ditch mesocosms of simulated spray drift from a crop-protection programme for potatoes. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 2, 105-125.
- Bérard A., Dorigo U., Humbert J.-F., Leboulanger C., Seguin F., 2002. La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) appliquée aux communautés algales. Intérêt comme outil de diagnose et d'évaluation du risque écotoxicologique en milieu aquatique. *Annls Limnol.*, 38, 247-261.
- Blanck H., Wänkberg S-A, Mølander S., 1988. Pollution-induced community tolerance—a new ecotoxicological tool. In: Cairns Jr J, Pratt JR, editors. ASTM STP 988, *Functional testing of aquatic biota for estimating hazards of chemicals*. Philadelphia, 219-230.
- Bertrand H., 1954a. *Les insectes aquatiques d'Europe (Genres : Larves, Nymphes, Imagos). Volume I. – Introduction : Collemboles, Hémiptères, Odonates, Plécoptères, Ephéméroptères, Mégaloptères, Planipennes, Coléoptères*. Lechevalier, Paris, 556 pp.
- Bertrand H., 1954b. *Les insectes aquatiques d'Europe (Genres : Larves, Nymphes, Imagos). Volume II. – Trichoptères, Lépidoptères, Diptères, Hyménoptères*. Lechevalier, Paris, 547 pp.
- Blaise C., Legault R., Bermingham N., Coillie R.V., Vasseur P., 1986. A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment. *Tox. Assess.* 1, 261-281.
- Brock T.C.M., Van Wijngaarden R.P.A., Van Geest G.J., 2000a. Ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems, Part 1—Herbicides. Alterra-Report 088. Wageningen, The Netherlands.
- Brock T.C.M., Van Wijngaarden R.P.A., Van Geest G.J., 2000b. Ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems, Part 2—Insecticides. Alterra-Report 089. Wageningen, The Netherlands.
- Brock T.C.M., Roessink I., Belgers D.M., Bransen F., Maund S.J., 2009. Impact of a benzoyl urea insecticide on aquatic macroinvertebrates in ditch mesocosms with and without non-sprayed sections. *Environ. Toxicol. Chem.*, 28, 2191-2205.
- Brown C.D., Dubus I.G., Fogg P., Gustin C., 2004. Exposure to sulfosulfuron in agriculture drainage ditches : field monitoring and scenario based modeling. *Pest. Mgmt Sci.*, 60, 765-776.

- California Department of Pesticide Regulation, 2003. Clomazone. Public Report 2003-01. Disponible sur Internet à l'URL : http://www.cdpr.ca.gov/docs/registration/ais/public_reports/3537.pdf
- Caquet Th., Lagadic L., Monod G., Lacaze J.-C. & Couté A., 2001. Variability of physico-chemical and biological parameters between replicated outdoor freshwater lentic mesocosms. *Ecotoxicology*, 10, 51-66.
- Caquet Th., Hanson M.L., Roucaute M., Graham D.W., Babin E. & Lagadic L., 2007. Influence of isolation on the recovery of pond mesocosms from the application of an insecticide. 2. Benthic macroinvertebrates responses. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26, 1280-1290.
- Carsel R.F., Smith C.N., Mulkey L.A., Dean J.D., Jowice P., 1984. *User's manual for pesticide root zone model (PRZM) : Release 1*. EPA/600/3-84/109. U.S. EPA. Athens. GA.
- Cedergreen N., Ritz C., Streibig J.C., 2005. Improved empirical models describing hormesis *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 3166-3172.
- Chang L.L., Giang B.Y., Lee K.S. & Tseng C.K., 1991. Aqueous photolysis of napropamide. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 617-621.
- Chauvet E., 1987. Changes in the chemical composition of alder, poplar and willow leaves during decomposition in a river. *Hydrobiologia*, 148, 35-44.
- Donaldson S.G. & Miller G.C., 1996. Coupled transport and photodegradation of napropamide in soils undergoing evaporation from a shallow water table. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 924-930.
- Drenner R.W., Hoagland K.D., Smith J.D., Barcellona W.J., Johnson P.C., Palmieri M.A. & Hobson J.F., 1993. Effects of sediment-bound bifenthrin on gizzard shad and plankton in experimental tank mesocosms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 1297-1306.
- Dubus I.G. & Brown C.D., 2002. Sensitivity and first-step uncertainty analyses for the preferential flow model MACRO. *J. Environ. Qual.*, 31, 227-240.
- EFSA, 2006. Opinion of the Scientific Panel on Plant health, Plant protection products and their Residues on a request from the EFSA related to the aquatic risk assessment for cyprodinil and the use of a mesocosm study in particular. *EFSA J.*, 329, 1-77.
- EFSA, 2007. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance diflufenican. *EFSA Sci. Rep.*, 122, 1-84.
- Eisentraeger A., Dott W., Klein J., Hahn S., 2003. Comparative studies on algal toxicity testing using fluorometric microplate and Erlenmeyer flask growth-inhibition assays *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 54, 346-354.
- Environnement Canada, 2007. *Méthode d'essai biologique: Essai d'inhibition de la croissance d'une algue d'eau douce - 2e édition, SPE 1/RM/25*. Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa, 56 pp.
- FOCUS, 2000. FOCUS groundwater scenarios in the EU review of active substances. Report of the FOCUS Groundwater Scenarios Workgroup. *EC Document Reference SANCO/321/2000 rev.2*, 202 p.
- Footprint Pesticide Properties Database. Disponible sur Internet à l'URL : <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/index2.htm>
- Ganzelmeier H., Rautmann D., Spangenberg R., Streloke M., Herrmann M., Wenzelburger H.-J., Walter H.-F., 1995. *Studies on the spray drift of plant protection products; results of a test program carried out throughout the Federal Republic of Germany*. Blackwell Wissenschafts – Verlag BmbH, Berlin.

- Garratt J.A., Capri E., Trevisan M., Errera G., Wilkins R., 2002. Parametrisation evaluation and comparison of pesticide leaching models to data from a Bologna field site, Italy. *Pest. Mgmt Sci.*, 58, 3-20.
- Gomot A., 1998. Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 41, 288-297.
- Gottesbüren B., Aden K., Bärlund I., Brown C., Dust M., Görlitz G., Jarvis N., Rekolainen S., Schäfer H., 2000. Comparison of pesticide leaching models: results using the Weiherbach dataset. *Agric. Water Mgmt*, 44, 153-181.
- Hamilton M.A., Russo R.C., Thurston R.V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, 11, 714-719.
- Hanson M.L., Graham D.W., Babin E., Azam D., Coutellec M.-A., Knapp C.W., Lagadic L. & Caquet Th. 2007. Influence of isolation on the recovery of pond mesocosms from the application of an insecticide. 1. Study design and planktonic community responses. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26, 1265-1279.
- Henderson P.A., 1990. *Freshwater Ostracods. Synopsis of the British Fauna.* (New Series) No. 42. Universal book services, Oegstgeest, Netherlands, 228 pp.
- Hoagland K.D., Drenner R.W., Smith J.D. & Cross D.R., 1993. Freshwater community responses to mixtures of agricultural pesticides: effects of atrazine and bifenthrin. *Environ. Contam. Toxicol.*, 12, 627-637.
- ISO, 1989. Qualité de l'eau – Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum*. ISO8692 : 1989. International Organization for Standardization, Genève.
- Jarvis N.J., 1995. Simulation of soil water dynamics and herbicide persistence in a silt loam using the MACRO model. *Ecol. Model.*, 81, 97-109.
- Larsbo M. & Jarvis N., 2003. MACRO 5.0. *A model of water flow and solute transport in macroporous soil. Technical description.* Emergo 2003:6. Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Soil Sciences, Uppsala, Sweden.
- Larsbo M., 2005. *An improved dual-permeability model of solute transport in structured soils: model development and parameter identification in laboratory and field experiments.* Thèse présentée à l'Université des Sciences agricoles de Suède en vue d'obtenir le titre de Docteur en ressources naturelles et sciences agricoles, Uppsala, 45p.
- Larsson M.H. & Jarvis N.J., 1999. Evaluation of a dual-porosity model to predict field scale solute transport in a macroporous soil. *J. Hydrol.*, 215, 153-171.
- Lewis P.A., Klemm D.J., Lazorchak, J.M., Norberg-King T.J., Peltier W.H., Heber M.A., 1994. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.* Report Number EPA/600/4-91/002. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati Ohio, 315 pp.
- Lorenzen C.J., 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments: Spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanog.*, 12, 343-346.
- Ludwig R., Gerke H.H., Wendroth O., 1999. Describing waterflow in macroporous field soils using the modified MACRO model. *J. Hydrol.*, 215, 135-152.
- Mualem Y., 1976. A new model for predicting the hydraulic conductivity of unsaturated porous media. *Water Resour. Res.* 12, 513-522.

- Nilsson A., 1996. *Aquatic Insects of North Europe. Vol.1: Ephemeroptera, Plecoptera, Heteroptera, Neuroptera, Megaloptera, Coleoptera, Trichoptera, Lepidoptera*. Apollo books, Stenstrup, Denmark, 274 pp.
- Paixão S., Silva L., Fernandes A., O'Rourke K., Mendonça E., Picado A., 2008. Performance of a miniaturized algal bioassay in phytotoxicity screening. *Ecotoxicology*, 17, 165-171.
- Palumbo A.J., Fojut T.L., Brander S.M., Tjeerdema R.S. 2010. Water Quality Criteria Report for Bifenthrin. Phase III: Application of the pesticide water quality criteria methodology. University of California in Davis, Davis CA.
- Pesticide Expert Committee, 2004. Evaluation Report, Boscalid. Food Safety Commission, Pesticide Expert Committee, 30 p. Disponible sur Internet à l'URL : http://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/pesticide/boscalid_full_170411.pdf
- Réal B., 2006. The transfer of pesticides into watercourses varies depending on soil type, Results from 10 experimental campaigns. Selected Papers from ARVALIS. Vol.2. Pages 7 à 11.
- Reichenberger S., Bach M., Hollis J.M., Jarvis N.J., Dubus I.G., Lewis K.A., Tzilivakis J., François O., Cerdan O., 2008. *Algorithms for calculation of predicted environmental concentrations based on pesticide inputs, size and discharge of water bodies etc*. Report DL23 of the FP6 EU-funded FOOTPRINT project [www.eu-footprint.org], 101p.
- Richards L.A., 1931. Capillary conduction of liquids through porous mediums. *Physics*, 1, 318-333.
- RIVM, 2004. ETX 2.0, Normal Distribution based Hazardous Concentration and Fraction Affected. National Institute of Public Health and the Environment, RIVM, Bilthoven, The Netherlands.
- Roessink I., Arts G.H.P., Belgers J.D.M., Bransen F., Maund S.J., Brock T.C.M. 2005. Effects of lambda-cyhalothrin in two ditch microcosm systems of different trophic status. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24,1684-1696.
- Rocjčková, R., Dvořáková, D., Marálek, B., 1998. The use of miniaturized algal bioassays in comparison to the standard flask assay. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 13, 235-241.
- Roucaute M. & Quemeneur A., 2007. Echantillonnage de la colonne d'eau dans les écosystèmes aquatiques peu profonds. *Cahiers Techniques INRA*, 60, 5-10.
- St-Laurent D., Blaise C., Macquarrie P., Scroggins R., Trottier B., 1992. Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedures. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 7, 35-48.
- Surdyk N., 2005. Transfert de pesticides par drainage et ruissellement, Tentative de modélisation opérationnelle et élémentaire. 93 p.
- Tachet H., Richoux P., Bournaud M., Usseglio-Polatera, P., 2000. *Invertébrés d'eau douce. Systématique, biologie, écologie*. CNRS Editions, Paris, 588 pp.
- Tidou A.S., Moreteau J.-C., Ramade F., 1992. Effects of lindane and deltamethrin on zooplankton communities of experimental ponds. *Hydrobiologia*, 232, 157-168.
- Usseglio-Polatera P., Bournaud M., Richoux P., Tachet H., 2000. Biomonitoring through biological traits of benthic macroinvertebrates: how to use species trait databases? *Hydrobiologia*, 422/423, 153-162.
- US EPA, 1994, Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, U.S. Environment Protection Agency (Ed), 133 p.

- van den Brink P.J., ter Braak C.J.F., 1999. Principal response curves: Analysis of time-dependent multivariate responses of biological community to stress. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 138-148.
- Van Genuchten M.Th., 1980. A closed form equation for predicting the hydraulic conductivity of unsaturated soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 44, 892-898.
- Van Wijngaarden R.P.A., Van den Brink P.J., Crum S.J.H., Oude Voshaar J.H., Brock T.C.M., Leeuwangh P., 1996. Effects of the insecticide Dursban 4E (Active ingredient chloropyrifos) in outdoor experimental ditches: I. Comparison of short-term toxicity between the laboratory and the field. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 1133-1142.
- Van Wijngaarden R.P.A., Cuppen J.G.M., Arts G.H.P., Crum S.J.H., Van den Hoorn M.W., Van den Brink P.J., Brock T.C.M., 2004. Aquatic risk assessment of a realistic exposure to pesticides used in bulb crops: a microcosm study. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23, 1479-1498.
- Vink J.P.M., Gottesbüren B., Diekkrüger B., Van der Zee S.E.A.T.M., 1997. Simulation and model comparison of unsaturated movement of pesticide from a large clay lysimeter. *Ecol. Model.*, 105, 113-127.
- Wallace I.D., Wallace B. & Philipson G.N. 1990. A key to the case-bearing caddis larvae of Britain and Ireland. *Freshwater Biol. Ass. Sci. Publ.*, 51, 1-237.
- Weston D.P., Zhang M.H., Lydy M.J., 2008. Identifying the cause and source of sediment toxicity in an agriculture-influenced creek. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27, 953-962.
- Xu Y.P., Spurlock F., Wang Z.J., Gan J., 2007. Comparison of five methods for measuring sediment toxicity of hydrophobic contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, 41, 8394-8399.
-