

**INRA**

Institut National de la Recherche Agronomique

**ECOLE CHERCHEUR**

**ECOTOXICOLOGIE**

**EVIAN**

**2-3 Février 1999**



## PROGRAMME ET SOMMAIRE

### COMMUNICATIONS DE L'ECOLE INRA ECOTOXICOLOGIE

EVIAN - 2 et 3 février 1999

#### 2 Février - ELEMENTS TRACES (Communications orales)

|        |                                   |  |    |
|--------|-----------------------------------|--|----|
| 8H 30  | Introduction                      |  |    |
| 8H 40  | Cambier                           | Différents aspects des interactions entre les matières organiques des sols et les micropolluants minéraux  | 1  |
| 9H 00  | Trolard                           | Avancées méthodologiques de mesures de paramètres contrôlés par l'oxydo-réduction in situ.   | 2  |
| 9H 20  | Renault                           | Approche couplée des transferts et du fonctionnement biogéochimique des sols : aperçu sur les travaux de l'Unité de Science du Sol d'Avignon         | 3  |
| 9H 40  | Staunton                          | Le devenir du radiocésium dans le sol  | 4  |
| 10H 00 | Mench                             | Exposition des végétaux aux éléments traces et biomarqueurs de la toxicité   | 5  |
| 10H 20 | Lamy                              | Spéciation des métaux et toxicité.   | 7  |
| 10H 40 | Hinsinger                         | Un biotest pour la mesure de la phytodisponibilité des éléments traces - Application au cas de sols du vignoble languedocien contaminé par le cuivre | 8  |
| 11H 30 | Donard                            | Identification des formes chimiques des métaux et enjeux pour l'environnement  | 11 |
| 11H 00 | Pause et communications affichées |  |    |
| 12H 30 | Discussion générale               |  |    |

#### ELEMENTS TRACES - Posters

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Balabane  | Mutual effects of soil organic matter dynamics and heavy metals fate in a metalophyte grassland   | 12 |
| Garrec    | Bio-surveillance des pollutions atmosphériques par les ETM et les composés organiques au moyen de bio-accumulateurs végétaux. Utilisation en écotoxicologie | 13 |
| Feder     | Mesures en continu et in situ des paramètres de la solution du sol  | 14 |
| Jaffrezic | Transfert et devenir de composés métalliques et organiques issus du lisier de porcs dans les sols hydromorphes  | 15 |
| Mocquot   | Biomarqueurs métaboliques et tolérance au cadmium chez le maïs  | 16 |

## **2 Février SUBSTANCES ORGANIQUES (Communications orales)**

|         |                       |  |    |
|---------|-----------------------|--|----|
| 12H 00  | Einhorn               | Chimie des pesticides en milieu aqueux et nouvelles stratégies analytiques   | 17 |
| 14H 50  | Montfort              | Ecodynamique et écotoxicologie des fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols : approche pluridisciplinaire développée en cultures céréalières à l'échelle pluriannuelle     | 18 |
| 15H 10  | Calleja               | Evaluation de l'impact écotoxicologique résultant de l'usage d'antiparasitaires endectocides en élevage extensif de ruminants: résultats préliminaires et attendus.                    | 19 |
| 15H 30  | Chaplain              | Disponibilité des xénobiotiques organiques dans les sols   | 20 |
| 15H 50  | Barriuso              | La rétention et la dégradation des pesticides dans les sols comme facteurs de régulation de leur disponibilité.  | 21 |
| 16H 10  | Bérard                | Ecotoxicologie algale, herbicides et dynamique des communautés phytoplanctoniques  | 22 |
| 16H 30  | Mougin                | Biotransformation fongique des xénobiotiques   | 25 |
| 16H 50  | Lichtfouse            | Les plantes poussent sur les hydrocarbures aromatiques   | 26 |
| 17H 10  | Pause et Posters      |  |    |
| 17H 30  | Amichot               | Intérêts, inconvénients et améliorations des biomarqueurs  | 27 |
| 18H 10  | Belzunces             | Effet des doses sublétales des pesticides chez deux types d'invertébrés  | 28 |
| 18H 30  | Lagadic               | Biomarqueurs chez les invertébrés : évaluation des effets des xénobiotiques sur les populations à partir de variables biochimiques et physiologiques mesurées au niveau des individus. | 29 |
| 18H 50  | Caquet                | Utilisation de mésocosmes en écotoxicologie expérimentale  | 30 |
| 19H 10  | Devaux                | Intérêts d'une approche génoécotoxicologique   | 31 |
| 20 H 00 | Discussion et Posters |  |    |
| 20H 30  | Repas banquet         |  |    |

## **3 Février SUBSTANCES ORGANIQUES Communications orales)**

|        |         |  |    |
|--------|---------|--|----|
| 8H 50  | Prunet  | Impact des polluants sur la fonction osmorégulation chez les poissons          | 32 |
| 9H 10  | Monod   | Le poisson, cible et révélateur de la pollution chimique                       | 33 |
| 9H 30  | Cravedi | Intérêt des études de métabolisme dans l'évaluation du risque écotoxicologique | 34 |
| 9H 50  | Rahmani | Evaluation toxicologique des pesticides in vitro.                              | 35 |
| 10H 10 | Pause   |  |    |
| 11H 00 | Rivière | Ecotoxicologie, évaluation du risque et réglementation des produits            | 36 |

**TABLE RONDE** avec J. Garric (CEMAGREF)

**SUBSTANCES ORGANIQUES (Posters)**

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| Amichot         | Limitations à l'utilisation de biomarqueurs chez les invertébrés  | 37 |
| Decourtye       | Approche comportementale et électrophysiologique des effets sublétaux des pesticides chez l'abeille domestique.   | 38 |
| Desouza         | Modèles d'étude de la toxicité des polluants environnementaux au moyen d'outils cellulaires et moléculaires   | 39 |
| Devaux          | Evaluation des effets de polluants aquatiques par la mesure des dommages à l'ADN et de l'induction du cytochrome P4501A chez le cheveine  | 40 |
| Deydier-Stephan | Influence de la présence de poissons ( <i>carassius auratus</i> ) sur l'effet du diuron et d'un octyl-phénol polyéthoxylé sur la production primaire phytoplanctonique dans des mésocosmes lentiques                            | 41 |
| Drèze           | La gambusie, un poisson modèle en écotoxicologie expérimentale ?  | 42 |
| Gillet          | Induction du cytochrome P4501A chez des stades embryolaires d'omble chevalier incubés dans différents affluents du Léman.   | 43 |
| Jumel           | Impact de la démoustication sur le littoral morbihannais : réponses de biomarqueurs chez deux espèces de macro-invertébrés non-cibles, <i>Chironomus salinarius</i> (Insecte, Diptère) et <i>Nereis diversicolor</i> (Annélide) | 44 |
| Lagacherie      | Impact du DNOC sur la diversité métabolique de la microflore d'un sol   | 45 |
| Laurent         | Devenir d'un herbicide, le 2-4D, dans une plante transgénique tolérante : le coton  | 46 |
| Leboulanger     | Effets comparatifs de l'atrazine et du nicosulfuron sur des microalgues d'eau douce   | 47 |
| Mougin          | Potential of filamentous fungi to degrade PAHs in industrial polluted soils   | 48 |
| Nélieu          | Extraction liquide/solide en tandem des produits d'ozonation de l'atrazine  | 49 |
| Pascal          | Les glutathion transférases comme biomarqueurs potentiels de l'exposition aux xénobiotiques chez les végétaux   | 50 |
| Rousseaux       | Utilisation de la technique T-RFLP pour analyser la diversité microbienne des sols  | 51 |
| Rousseaux       | Modification de la diversité de la microflore dans un sol pollué par un pesticide : mise en évidence du polymorphisme de taille de la région ITS (intergène ADNr 16S-23S)   | 52 |
| Roy             | Nouvelle approche méthodologique pour confirmer la relation entre la biodisponibilité des fongicides et leur effets sur la mycoflore tellurique.  | 53 |
| Suchail         | Caractéristiques particulières de la toxicité de l'imidaclopride chez l'abeille.  | 54 |
| Thibaut         | Devenir du 4-n-nonylphénol chez la truite arc-en-ciel   | 55 |
| Trebaul         | Analyse multi-résidus des fongicides IBS : optimisation par un plan d'expérience  | 56 |



# **ELEMENTS TRACES**

**(Communications)**





## DIFFERENTS ASPECTS DES INTERACTIONS ENTRE LES MATIERES ORGANIQUES DES SOLS ET LES MICROPOLLUANTS MINERAUX

CAMBIER Philippe, LAMY Isabelle

*Science du Sol, INRA, route de Saint-Cyr  
78 026 VERSAILLES cedex*

Les micropolluants minéraux appartiennent à différentes familles chimiques. Parmi eux, la plupart des métaux interagissent fortement avec les matières organiques des sols (MOS) qui jouent le rôle de ligands. Cependant les effets de ces réactions de complexation dépendent du type de MOS: il faut distinguer celles qui sont associées aux phases solides des sols, et les molécules organiques solubles.

Les MOS en phase solide complexent les métaux, ce qui renforce le pouvoir tampon des sols vis à vis d'éléments polluants, voire entraîne la formation d'un compartiment de stockage de ces éléments. Les MOS solides réduisent généralement la mobilité, la biodisponibilité et la toxicité de la plupart des métaux. Dans le cas de Cs au contraire, les matières organiques peuvent diminuer sa rétention par les sols. Cependant, les MOS sont des constituants en continuelle évolution, ce compartiment sera donc plus ou moins important et stable selon les conditions environnementales, l'usage des sols, etc.

Par contre, les MOS présentes dans la phase aqueuse peuvent former des complexes solubles et favoriser la mobilité des métaux au sein du profil et en dehors du sol. En fait, l'intervention des molécules organiques solubles met en jeu plusieurs processus: formation de complexes en solution, formation de complexes de surface ou modifications de l'état de surface par sorption sur les minéraux. A pH neutre ou alcalin, les MOS solubles sont davantage dissociées des surfaces minérales et leur effet mobilisateur vis-à-vis des métaux sera relativement plus important qu'à pH acide. Cependant les métaux resteront de toute façon moins solubles à ces pH élevés qu'à pH acide. Par ailleurs, la spéciation des éléments en solution conditionne leur biodisponibilité. Ainsi, les métaux complexés en solution par des acides de type fulvique, seront généralement moins biodisponibles et moins toxiques.

D'autre part, les micropolluants peuvent agir sur la dynamique des MOS au travers d'effets sur la biologie des sols. Dans des sols fortement pollués, la toxicité sur les microorganismes et la faune du sol peut retarder considérablement la biodégradation et entraîner une accumulation de matières organiques.

Des processus plus complexes peuvent intervenir, y compris dans des cas de contamination modérée. Les MOS chargées en éléments toxiques peuvent être dégradées plus lentement que les autres, et cette accumulation différentielle entraîner la formation d'un compartiment chargé en micropolluants. Enfin, une contrainte chimique peut provoquer la sélection de microorganismes tolérants, induisant un fonctionnement biologique particulier des sols contaminés.

## AVANCEES METHODOLOGIQUES DE MESURES DE PARAMETRES CONTRÔLES PAR L'OXYDO-REDUCTION IN SITU

TROLARD F.

*INRA - UR sol et Agronomie de Rennes - Quimper  
65 rue de St Brieuc - 35042 RENNES Cedex*

L'ensemble des organismes vivants tirent leur énergie des réactions d'oxydo-réduction. Les microflores du sol, des litières et des tubes digestifs des animaux d'élevage présentent différents types de métabolismes mais en nombre limité : respiration aérobie, respirations anaérobies, fermentations. Certains microorganismes sont strictement inféodés à un type de métabolisme, tandis que d'autres peuvent changer de métabolisme. Dans tous les cas, les fonctions microbiennes bifurquent en fonction des conditions d'oxydo-réduction du milieu. Ceci conditionne les transformations biogéochimiques des éléments et les interactions entre cycles.

Il s'agit donc d'un problème fondamental et très mal connu, car on a surtout étudié les fonctions aérobies pour des raisons de facilité méthodologique.

L'oxydoréduction constitue le principal processus agissant dans les réactions impliquant C, O, N, P et les métaux. Dans le système sol-eau-plante-air, le sol et la litière sont les plus mal connus. Il existe trois voies par lesquelles les conditions d'oxydo-réduction peuvent influencer la mobilité et la réactivité des éléments :

- (i) par un changement du degré d'oxydation de l'élément lui-même ;
- (ii) par des changements d'état d'oxydation d'éléments se liant avec l'élément considéré pour former un complexe soluble ;
- (iii) par formation ou dissolution de phases porteuses accueillant l'élément considéré (e.g. oxydes de fer pour P et les métaux).

Dans les sols, le fer constitue l'élément majeur contrôlant la dynamique de l'oxydo-réduction dans les conditions de la surface de la Terre. Mais en raison de l'asynchronisme entre les cycles des éléments, des phénomènes de mobilisation/immobilisation et de transferts des éléments chimiques il est apparu comme fondamental de pouvoir mesurer in situ la variations des paramètres déterminants à la fois dans l'eau et le solide des système étudiés. C'est pourquoi notre équipe a entrepris depuis plusieurs années des travaux qui permettent aujourd'hui de proposer à la communauté des outils de mesure utilisables sur le terrain.

Ces méthodes sont constituées par des protocoles de prélèvement d'échantillons d'eau du sol et de solides, de mesures des concentrations en fer(II) dans les solutions du sol, d'outils de mesure en continu et in situ de paramètres de l'eau du sol avec une sonde multiparamétrique, des rapports fer(II)/fer(III) dans la fraction solide du sol et de la minéralogie des oxydes de fer avec un spectromètre Mössbauer miniature.

**APPROCHE COUPLEE DES TRANSFERTS ET  
DU FONCTIONNEMENT BIOGEOCHIMIQUE DES SOLS ;  
Aperçu sur les travaux de l'Unité de Science du Sol d'Avignon**

RENAULT Pierre

*I.N.R.A., Unité de Science du Sol. Domaine St-Paul,  
Site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9.*

L'Unité de Science du Sol d'Avignon comprend une équipe intitulée "Transferts et Biogéochimie" et une équipe intitulée "Transferts dans les milieux poreux". La première de ces équipes comprend 4 chercheurs, 2 Ingénieurs, 1 Assistant ingénieur et 2 techniciens. Ses principales activités concernent les couplages entre (i) les transferts de masse (eau, solutés et gaz) et de chaleur d'une part, (ii) les activités microbiennes (cycles de C et de N, dénitrification) et la géochimie des solutions d'autre part. Ces thématiques amènent à la prise en compte explicite de l'hétérogénéité des transferts (dont les mouvements préférentiels) et de l'absorption racinaire, correspondant à deux des axes de travail de la deuxième équipe. L'échelle de la parcelle agricole est privilégiée par l'Unité, mais certaines études se font à des échelles comprises entre l'agrégat et le bassin versant. L'orientation de plus en plus environnementale de l'Unité peut s'illustrer par différents thèmes abordés récemment : la pollution des nappes par  $\text{NO}_3^-$  et l'évaluation de stratégies agricoles moins polluantes (gestion de irrigation), l'épandage des excédents de production de pommes et les risques de toxicité induite ( $\text{Al}^{3+}$ ), et les transferts de pesticides.

## LE DEVENIR DU RADIOCESIUM DANS LE SOL

DUMAT Camille, GUIVARCH Armel, HINSINGER Philippe & STAUNTON Siobhán

*Unité de Science du Sol, INRA, place Viala, 34060 Montpellier Cedex*

### Introduction

L'attention de la communauté scientifique a été attirée sur le problème de la pollution par des isotopes radioactifs par l'accident qui a eu lieu en avril 1986 à la station nucléaire de Tchernobyl. Le comportement du radiocésium dans le sol est assez bien compris. On sait, par exemple que sa biodisponibilité dans le système sol-plante est largement déterminée par sa forte adsorption sur les argiles, constituants des sols. Néanmoins notre connaissance est insuffisante pour bien prédire, à long terme, sa biodisponibilité. Une corrélation observée *in situ* entre transfert sol-plante et teneur en matière organique, suggère un effet indirect entre matière organique et adsorption. De plus, d'importantes variations dans le transfert sol-plante *in situ* selon l'espèce végétale ne sont pas expliquées.

### Démarche Expérimentale

L'étude expérimentale du radiocésium dans les sols à Montpellier s'inscrit en deux axes.

1. La compréhension de l'effet de formation de complexes entre argiles et matière organique sur la capacité d'adsorption des argiles. Cet effet a été étudié soit en synthétisant complexes synthétiques argile+polymères organiques, soit en détruisant la matière organique des argiles de sol. L'adsorption du césium a ensuite été mesurée en conditions contrôlées.
2. Le rôle de l'espèce végétale dans la biodisponibilité du radiocésium dans les sols contaminés. Cette investigation comporte deux volets, le prélèvement racinaire et la distribution dans les plantules du radiocésium, et l'action des racines sur son adsorption et sa désorption sur des sols.

### Résultats Majeurs

1. La présence de matière organique diminue l'adsorption du césium. Les résultats obtenus avec complexes synthétiques et destruction de la matière organique du sol s'accordent : une réduction jusqu'à 90% de l'adsorption du césium. Ceci explique que certains sols, surtout des sols à forte teneur en matière organique, n'immobilisent pas le césium malgré une teneur en argile en théorie suffisante.
2. Les espèces étudiées se distinguaient peu dans leur prélèvement racinaire. Par contre, l'adsorption sur certains sols a été fortement augmentée par l'action des racines. La cause est probablement liée au prélèvement de potassium, mais le mécanisme reste à élucider. Une autre indication de l'importance de l'action biologique vient de la plus grande adsorption de Cs par la fraction argileuse de sols de surface après destruction de la matière organique que par les argiles extraites de sol d'horizon plus profond.
3. L'adsorption n'est pas rapidement et complètement réversible, mais cette irréversibilité ne semble pas être modifiée par l'action biologique.

### Conclusions et Perspectives

Notre travail a mis en évidence l'importance non seulement de la minéralogie du sol, mais aussi de l'action biologique sur la capacité des constituants minéraux des sols à immobiliser le radiocésium et du rôle indirect de la matière organique des sols. Ces effets pourraient influencer sur la spéciation, la mobilité et la biodisponibilité d'autres cations, par exemple les métaux lourds. Ceci ouvre un grand champ d'études. Cette démarche est actuellement étendue à l'étude du nickel dans le cadre de la thèse de F. Pinel.

## EXPOSITION DES VEGETAUX AUX ELEMENTS TRACES ET BIOMARQUEURS DE LA TOXICITE

MENCH Michel, MOCQUOT Bernard, SAPPIN Valérie, DENAIX Laurence,  
LAGRIFFOUL Arnaud et BOISSON Jolanda

*Equipe Biogéochimie des Eléments Traces dans les Agrosystèmes, INRA Unité d'Agronomie,  
Centre Bordeaux Aquitaine, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon cedex*

Le devenir d'éléments traces du sol à la plante participe à l'exposition du végétal et a des conséquences sur son fonctionnement.

**Phytodisponibilité d'éléments traces.** Le transfert d'éléments traces (ex: Cd, Zn, As) des horizons de sol prospectés par les racines à la plante entière est raisonné avec un modèle mécaniste et la recherche d'indicateurs permettant de quantifier la disponibilité physico-chimique d'éléments traces du sol. Les travaux sur les échanges sol-solution du sol s'attachent à rendre compte des mécanismes et quantifier la ou les cinétiques d'échange et la spéciation *sensu largo* de l'élément en solution, notamment des espèces chimiques assimilables. L'hypothèse d'une discrimination de l'exposition des végétaux selon la famille de sols, le mode de contamination et la spéciation dans la solution du sol est testée. La modification de la spéciation d'éléments traces dans le sol par apport de composés exogènes permet d'augmenter ou de limiter la disponibilité physico-chimique et le prélèvement par les végétaux.

**Biomarqueur de la toxicité:** Biomarqueur désigne tout changement biologique dans les organismes vivants ou leurs fluides indiquant une déviation de l'état normal et une exposition à un ou des contaminants. Il existe des biomarqueurs d'exposition, d'effets et de sensibilité des individus. Leur intérêt est la possibilité d'effectuer des mesures *in situ* pour un diagnostic rapide des causes et/ou des effets de la contamination d'un milieu. Les biomarqueurs sont précoces s'ils indiquent une exposition ou des effets de la contamination avant des paramètres globaux comme la croissance. Il peut en résulter un gain de temps lors des tests d'écotoxicité ou un diagnostic précoce des effets de l'accumulation de contaminants dans un milieu. Chez le maïs exposé au cadmium, les mécanismes d'action font intervenir la détoxification de radicaux libres, la chélation et la compartimentation cellulaires, le pouvoir réducteur. La réponse des phytochélatines dans les racines serait un des marqueurs d'exposition et d'effet les plus précoces. D'après la concentration en Cd dans la 3<sup>ième</sup> feuille du maïs, il existe un facteur 40 entre la réponse des phytochélatines et celle de la biomasse. Ce paramètre métabolique est sans doute à même de prévoir les dysfonctionnements du végétal exposé au Cd dans les scénari d'évaluation *a priori*. Des changements existent dans le métabolisme de détoxification des radicaux libres. L'activité gaïacol-peroxydase dans la 3<sup>ième</sup> feuille de plantules de 15 jours augmente à partir de 3 mg Cd/kg MS et celle de l'ascorbate peroxydase au delà de 4 mg Cg/kg MS dans la 4<sup>ième</sup> feuille. Le profil de biomarqueurs est aussi utile dans les scénari d'évaluation *a posteriori* de l'écotoxicité de matrices sur un site historique. Les relations dose-effets obtenues sont progressivement intégrées dans un test végétal d'écotoxicité terrestre, Plantox.

**Références**

- LAGRIFFOUL A., MENCH M., MOCQUOT B., 1997. Assessment of the phytotoxicity of cadmium contaminated soils by an ecological biotest using maize metabolic biomarkers. pp. 557-558, *In* Iskandar I.K., Hardy S.E., Chang A.C. & G.M. Pierzynski. Proc. Fourth Int. Conf. Biogeochemistry of Trace Elements, Berkeley, CA.
- LAGRIFFOUL A., MOCQUOT B., MENCH M., VANGRONSVELD J., 1998 Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.) *Plant Soil*, 200, 241-250.
- MENCH M., 1998. Cadmium availability to plants in relation to major long-term changes in agronomy systems. *Agriculture, Ecosystems Environment*, 67, 175-187.
- VANGRONSVELD J., MOCQUOT B., MENCH M., CLIJSTERS H., 1997. Biomarqueurs du stress oxydant chez les végétaux, pp 165-184. *In* Lagadic L., Caquet Th., Amiard J.C. and Ramade F. Biomarqueurs en Ecotoxicologie - Aspects Fondamentaux, Masson, Paris.
- VANGRONSVELD J., MENCH M., MOCQUOT B., CLIJSTERS H., 1998. Biomarqueurs d'exposition des végétaux terrestres aux polluants - Application à la pollution par les métaux. pp. 165-181. *In* Lagadic L., Caquet Th., Amiard J.C., and Ramade F. Utilisation de Biomarqueurs pour la Surveillance de la Qualité de l'Environnement, Tec & Doc Lavoisier, Paris.

## SPECIATION DES METAUX ET TOXICITE

LAMY Isabelle

*INRA, Unité de Science du Sol, Route de Saint-Cyr 78026 Versailles Cedex*

Il est bien connu que la concentration totale en métal dans un sol ne peut être une indication suffisante de son impact sur le fonctionnement biogéochimique du sol lui même, et encore moins de son impact sur les équilibres des écosystèmes environnants. En effet, plus que son origine (fond géochimique ou apport anthropique), c'est la forme sous laquelle se trouve un métal qui va être déterminante dans le comportement des métaux. Les différentes formes sous lesquelles se trouve un métal sont sous la dépendance à la fois de la nature des phases solides auxquelles le métal est associé, de la nature des liaisons chimiques mises en jeu, ainsi que de leur aptitude à passer dans la phase liquide (solution du sol). La détermination de ces différentes formes, ou spéciation, est nécessaire afin de pouvoir aborder les notions de toxicité, biodisponibilité, et de décrire leur dynamique dans les sols.

Cependant la spéciation des métaux dans les sols reste délicate à établir. Il faut non seulement tenir compte des différents compartiments du sol (solution aqueuse, constituants minéraux, constituants organiques) qui ont chacun leur capacité d'interaction avec les métaux, mais aussi et surtout de l'interaction entre ces différents compartiments. Enfin, les contaminations dans le milieu naturel sont rarement monométalliques mais plutôt polymétalliques. L'évaluation de l'impact d'une pollution sur un organisme ou une population s'en trouve ainsi compliquée.

Deux types d'approche seront ici distinguées, telles qu'elles ont été développées à Versailles : la spéciation des métaux en phase solide, et la spéciation des métaux en phase aqueuse. A partir d'exemples concernant des travaux effectués in situ sur des zones contaminées (pollution diffuse ou forte contamination en métaux), on montre l'apport de fractionnements granulo-densimétriques à l'étude de la dynamique des métaux dans les sols, et à l'évaluation des risques. Les problèmes posés par la spéciation des métaux en solution seront exposés à travers l'étude des milieux de culture mis en oeuvre pour étudier la toxicité des métaux sur les micro-organismes. Un exemple d'application sera donné, concernant un site à contamination monométallique dans lequel l'impact de concentrations en cuivre sur les micro-organismes était recherché (Ecosol 1998, compte-rendu de fin d'AIP INRA, R. Chaussod coordinateur). Dans ce cadre, l'évaluation de la toxicité est estimée à partir de l'impact d'un élément trace métallique (le cuivre) sur des micro-organismes cibles, dans des milieux de culture contrôlés où la concentration en cuivre libre est connue et croissante. Ce type d'approche permet de discuter de la notion de seuils de toxicité.

Enfin, s'il est reconnu que la concentration en ions libres en solution est la plus toxique, et que c'est d'elle que la réponse biologique est fonction, certains travaux tendent à montrer que la toxicité n'est pas proportionnelle à l'activité du métal en solution, en particulier en présence de matière organique naturelle, montrant ainsi l'importance des études sur les interactions des compartiments entre-eux.

# UN BIOTEST POUR LA MESURE DE LA PHYTODISPONIBILITE DES ELEMENTS TRACES

Application au cas de sols de vignoble du Languedoc-Roussillon  
contaminés par le cuivre (cadre PNETOX)

HINSINGER Philippe

*INRA UFR de Science du Sol Montpellier*

## **Introduction**

Prédire la biodisponibilité des éléments traces (ET) pour les plantes est de première importance en écotoxicologie, dans la mesure où les plantes cultivées constituent un point d'entrée majeur de ces micropolluants dans les chaînes alimentaires. L'acquisition des ET par les plantes dépend toutefois de multiples facteurs et en particulier des interactions chimiques dont la rhizosphère, volume de sol soumis à l'influence des racines, est le siège. Les tests chimiques classiquement utilisés pour mesurer la disponibilité des ET dans les sols peuvent difficilement rendre compte de ces interactions multiples et complexes, de sorte que le végétal demeure un outil privilégié pour la mesure de la biodisponibilité. L'objectif est ici de présenter une technique de culture mise au point dans le but de mesurer la bioaccumulation dans les racines et les parties aériennes de micropolluants tels que les ET métalliques. L'exposé présentera l'application de cette technique au cas du cuivre apporté massivement en viticulture par les traitements fongicides à base de sels de cuivre.

## **Contexte**

Les apports répétés de cuivre qui ont été effectués sur les 400 000 ha du vignoble languedocien, souvent en continu (monoculture de la vigne) depuis plus d'un siècle, ont contribué à une augmentation conséquente des teneurs en cuivre des sols viticoles, qui atteignent fréquemment plusieurs centaines de mg Cu par kg de terre (Brun et al., 1998). Dans le contexte actuel de reconversion importante du vignoble languedocien (plus de 100 000 ha arrachés au cours de la dernière décennie), se pose la question du devenir du cuivre accumulé dans ces sols et en particulier des risques de contamination des écosystèmes terrestres et des cultures remplaçant la vigne après son arrachage. En outre, compte tenu de l'importance des phénomènes érosifs et des volumes d'eaux de ruissellement dans le vignoble languedocien (Andrieux et al., 1998), se pose de manière aiguë la question des risques de transfert du cuivre vers les eaux superficielles et, par suite, de contamination des écosystèmes aquatiques.

Dans ce contexte, l'objectif général du projet financé en 1999-2001 dans le cadre du PNETOX (MATE) est d'évaluer la contamination des sols et des eaux de surface par le cuivre issu des traitements fongicides de la vigne et d'estimer les risques de transfert dans les chaînes trophiques d'écosystèmes terrestre et aquatique. Le projet s'inscrit dans le cadre du bassin versant de Roujan (Hérault) qui est un site-atelier déjà instrumenté en vue d'étudier les flux d'eau et de pesticides (herbicides notamment, Lennartz et al., 1997). Malgré l'abondance des sols calcaires dans ce bassin versant, plusieurs études ont déjà montré que la biodisponibilité du cuivre pour des plantes cultivées est loin d'être modérée et peut être préoccupante (Brun et al., 1998; Cherrey, 1998; Coullery, 1996).



## Méthode

La technique de culture proposée comme test écotoxicologique a été mise en oeuvre par Guivarch (1996), sur la base de dispositifs mis au point antérieurement par Niebes *et al.* (1993) et Hinsinger *et al.* (1992). Cette technique comporte deux périodes de culture. La première (3 semaines) est réalisée en conditions hydroponiques. Les plantes sont cultivées dans de petits tubes PVC fermés à leur base par un tamis (toile à blutter) que les racines ne peuvent traverser. Lors de cette période, les plantes développent donc un tapis continu de racines à la surface de ce tamis. Lors de la seconde période ce 'réactif-planté' est mis en contact pendant deux semaines avec l'échantillon de sol à tester. La bioaccumulation des ET dans les différents organes des plantules est alors mesurée par l'analyse des végétaux. Ce dispositif présente l'avantage de permettre un accès aisé au compartiment racinaire qui est souvent le premier et le plus affecté par les contaminations métalliques. Il a été mis en oeuvre avec de nombreuses espèces incluant des graminées (plusieurs espèces de ray-grass, brome, fétuque, blé, orge et maïs), des dicotylédones (colza, tomate, épinard et laitue) y compris des légumineuses (plusieurs espèces de luzerne et de trèfle). L'autre avantage de cette méthode réside dans le fait qu'elle donne accès au sol situé au contact des racines, i.e. la rhizosphère. Des analyses de ce sol rhizosphérique sont mises en oeuvre afin de confronter les mesures de phytodisponibilité aux mesures de spéciation et d'extractibilité chimique des ET dans la rhizosphère (Pecqueur *et al.*, 1998).

## Résultats préliminaires

Ces résultats proviennent du DEA de Cherrey (1998) qui a porté sur 2 sols viticoles modérément contaminés: un sol acide sur schiste (sol R) et un sol calcaire (sol K), contenant respectivement 53 and 175 mg kg<sup>-1</sup> et amendés (RS et KS) ou non (R0 et K0) par une boue de station d'épuration.

*Bioaccumulation du Cu (Cu µg par pot) et concentrations dans les parties aériennes (Cu<sub>S</sub> µg g<sup>-1</sup> DW) et les racines (Cu<sub>R</sub> µg g<sup>-1</sup> DW) avant (control) et après culture de colza (rape) et ray-grass (ryegrass) sur les différents échantillons de sol.*

|                        | Control   | R0         | RS         | K0            | KS          |
|------------------------|-----------|------------|------------|---------------|-------------|
| Cu rape                | 0.7 ± 0.2 | 1.9 ± 0.2  | 3.8 ± 0.4  | 6.8 ± 0.2     | 7.5 ± 0.4   |
| Cu ryegr.              | 0.4 ± 0.2 | 1.2 ± 0.2  | 5.2 ± 0.4  | 9.6 ± 0.2     | 12.9 ± 0.4  |
| Cu <sub>S</sub> rape   | 3.6 ± 1.2 | 5.6 ± 1.1  | 8.2 ± 1.3  | 20.2 ± 3.6    | 12.7 ± 0.7  |
| Cu <sub>S</sub> ryegr. | 3.4 ± 1.1 | 3.6 ± 1.2  | 7.6 ± 1.6  | 12.8 ± 6.5    | 14.3 ± 3.5  |
| Cu <sub>R</sub> rape   | 4.8 ± 3.2 | 17.1 ± 0.8 | 15.1 ± 4.6 | 53.2 ± 5.4    | 30.4 ± 4.9  |
| Cu <sub>R</sub> ryegr. | 0.6 ± 1.4 | 9.9 ± 0.3  | 29.6 ± 7.7 | 206.3 ± 167.3 | 81.3 ± 32.8 |

Ces résultats montrent qu'une plus grande proportion du Cu prélevé par le colza est transférée dans ses parties aériennes, relativement au ray-grass. En termes de concentrations en Cu dans les tissus végétaux, les valeurs les plus élevées sont de loin celles trouvées dans les racines. Pour le sol K où la contamination des plantes a été la plus importante, les concentrations dans les parties aériennes sont proches des seuils de phytotoxicité rapportés pour le colza (16 µg g<sup>-1</sup> DW, Reuter et Robinson, 1997). Pour le ray-grass, elles sont juste au-dessus des niveaux considérés comme inacceptables dans les fourrages destinés aux ovins (10 µg g<sup>-1</sup> DW, Coullery, 1996). La contamination de plantes cultivées ou prairiales peut donc être significative en sols viticoles, y compris en sols calcaires (sol K), bien qu'il soit admis que le

Cu est peu mobile dans de telles conditions. Ceci est sans doute la conséquence des interactions chimiques particulières dont la rhizosphère est le siège et qui sont susceptibles d'affecter la biodisponibilité du Cu, telles que l'excrétion de protons ou de phytosidérophores par les racines (Hinsinger, 1998).

### Références

- Andrieux P, Louchart X et Voltz M (1998). Effect of agricultural practices on runoff and erosion in vineyard fields in a mediterranean climate. *Annales Geophysicae*, Supplement II XXIIIème EGS General Assembly, Nice.
- Brun, L., Maillet, J., Richarte, J., Herrmann, P. and Rémy, J.C. (1998). Relationships between copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environmental Pollution* (in press).
- Coullery, P. (1996). *Gestion des sols faiblement pollués par le Cd, le Cu, le Ni, le Pb et le Zn. In Sols Pollués - Métaux Lourds et Plantes Bioindicatrices*, Doc. No 58, OFEFP, Switzerland, pp. 75-245.
- Guivarch A (1996) *Approche expérimentale de l'acquisition de <sup>137</sup>Cs par les plantes, à partir de sols contaminés*. Mémoire DEA National de Science du Sol. Univ. Nancy I -ENSA.M.
- Hinsinger, P. (1998). How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy*, 64: 225-265.
- Hinsinger P, Jaillard B and Dufey JE (1992) Rapid weathering of a trioctahedral mica by the roots of ryegrass. *Soil Science Society of America Journal*, 56, 977-982.
- Lennartz B, Louchart X, Voltz M et Andrieux P (1997). Diuron and simazine losses to runoff water in mediterranean vineyards as related to agricultural practices. *Journal of Environmental Quality* 26, 1493-1502.
- Niebes JF, Hinsinger P, Jaillard B and Dufey JE (1993) Release of nonexchangeable potassium from different size fractions of two highly K-fertilized soils in the rhizosphere of rape (*Brassica napus* cv Drakkar). *Plant and Soil*, 155/156: 403-406.
- Pecqueux H, Hinsinger P and Ambrosi JP (1998) Bioavailability of P, Zn and Cu in two heat-treated sewage sludges as evaluated by chemical extractants and pot experiments. *Proceedings World Soil Science Congress*.
- Reuter, D.J. and Robinson, J.B. (1997). *Plant Analysis, An Interpretation Manual*, 2nd Edition, CSIRO, Australia.

## IDENTIFICATION DES FORMES CHIMIQUES DES METAUX ET ENJEUX POUR L'ENVIRONNEMENT

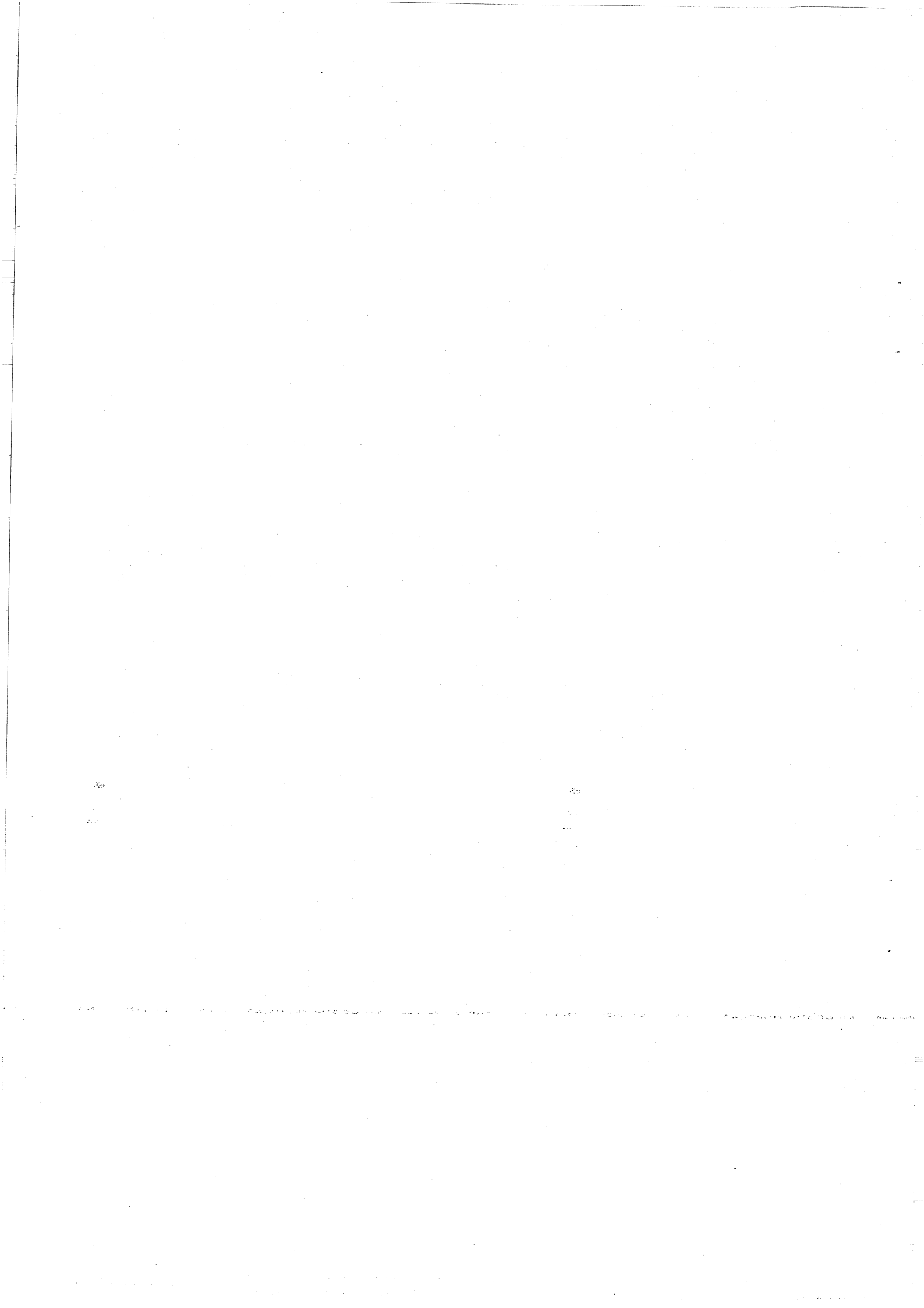
DONARD Olivier

*Laboratoire de Chimie Bio-Inorganique et Environnement  
Université de Pau et des Pays de l'Adour  
64000 Pau (France)*

Le rôle des métaux dans l'environnement est bien reconnu. Pourtant, l'étude des processus conduisant à la compréhension du cycle ou de l'impact de ces métaux lourds ne se base essentiellement que sur des déterminations du contenu total des métaux en faisant le plus souvent abstraction de leurs formes chimiques. Il est maintenant reconnu que ce sont en effet les formes chimiques d'un métal qui gouvernent ses propriétés physico-chimiques, sa toxicité et son devenir dans les différents compartiments de l'environnement.

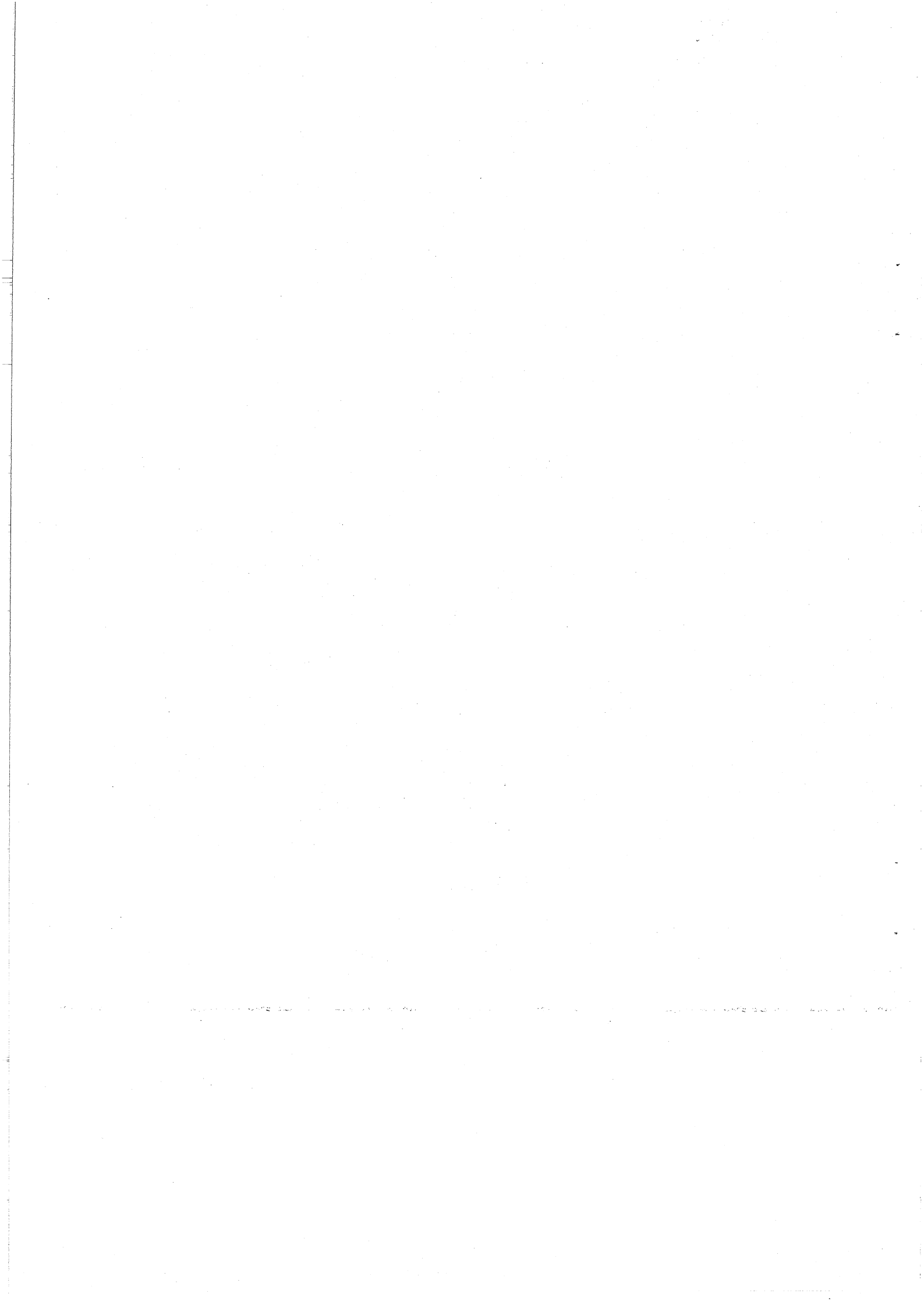
Les métaux existent rarement majoritairement sous formes d'ions libres dans l'environnement. Le développement de techniques d'analyses couplées permet maintenant de pouvoir étudier les modes de transfert des métaux dans l'environnement.

Nous passerons en revue les développements analytiques importants dans le domaine de la spéciation des métaux qui ont permis de mieux comprendre l'impact et les cycles des métaux dans le milieu naturel et qui ont permis de mettre en évidence des mécanismes de transferts insoupçonnés jusqu'alors.



# **ELEMENTS TRACES**

**(Posters)**



## MUTUAL EFFECTS OF SOIL ORGANIC MATTER DYNAMICS AND HEAVY METALS FATE IN A METALLOPHYTE GRASSLAND

BALABANE May, FAIVRE Damien, van OORT Folkert & DAHMANI-MULLER Hamida

*INRA, Unité de Science du Sol, Route de St Cyr, 78026 Versailles Cedex, France*

### Introduction

Metallophytes, plant species that grow only on soils rich in metals, are used for bioremediation of polluted soils. Yet, little is known about the functioning of such soil-plant systems. We have investigated soil organic matter (SOM) dynamics and its effects on the fate of heavy metals under a metallophyte grassland highly polluted by industrial dust fallout.

### Materials & Methods

The metallophyte grassland lies at the junction of Escaut and Scarpe rivers in northern France. High metal pollution, mainly by Zn, Pb, and Cd, results from the proximity to a former industrial waste belt associated to an ancient zinc smelter plant active from 1901 to 1962. Since the late 1950s, the grassland is dominated by *Armeria maritima* ssp. *halleri* with frequent presence of *Cardaminopsis halleri* (absolute metallophytes) and to a lesser extent of *Agrostis tenuis* (pseudometallophyte). The soil, a Dystric Cambisol, is moderately well-drained, weakly acid and sandy loam textured. A 6-cm thick, densely packed, holorganic horizon, consisting of undecomposed (OLn) and partially decomposed (OLv) plant material overlies a 6-cm thick, black, smeary, and sharply bounded Ah horizon. Deeper are an ancient plowed horizon (L) followed by an S horizon.

Both litter and soil horizons were sampled. Particle-size and density fractionations were carried out to separate particulate organic matter, i.e., the light fraction  $> 50 \mu\text{m}$ . All samples were analysed for C, N, Zn, Pb, and Cd. Bulk densities were determined for all horizons and stocks of elements per unit area were calculated.

### Main findings

- Total C stock under the metallophyte grassland was similar to that present under broad temperate grasslands. This similarity was not due to a nil effect of heavy metal pollution on SOM dynamics, but to a net effect of a lower input of plant C to the soil and a lower output of C by mineralization. SOM quality was strongly affected by heavy metal pollution, mainly by a lack of incorporation of plant returns in the organo-mineral soil profile and an unbalance in the composition of SOM towards more coarse, partially decomposed, plant debris and less fine humified material.
- Zn, Pb, and, to a lesser extent, Cd were located mainly in the organic rich, superficial soil layer. Heavy metal concentrations of particulate organic matter of different sizes were similar within each horizon. Heavy metal concentrations of total particulate organic matter increased strongly according to a depth-time scale.

Our results suggest a selective decomposition of portions of metallophyte-derived debris with initially low heavy metal concentrations and resistance to biodegradation of those portions with initially high heavy metal concentrations. Heterogeneity of metal localization in the living plants seems to be a major factor controlling the initial partitioning of plant C inputs between decomposable and resistant plant materials. Such a mechanism may constitute a process of mutual protection, in this soil-plant system, of plant debris towards biodegradation and of heavy metals towards mobility. These aspects have to be considered when assessing rehabilitation of polluted sites by phytoremediation or phytostabilization. Even slow decomposition of metal-enriched plant debris is expected to liberate sequestered metals over the long term. Changes in land use, and consequent modifications in physico-chemical soil conditions, could be determinant.

**BIO-SURVEILLANCE DES POLLUTIONS ATMOSPHERIQUES  
PAR LES ETM ( Eléments Traces Métalliques) ET LES COMPOSES ORGANIQUES  
AU MOYEN DE BIO-ACCUMULATEURS VEGETAUX  
- utilisation en écotoxicologie -**

GARREC J.P. et ROSE C.

*INRA - Centre de Recherche de Nancy  
Laboratoire Pollution Atmosphérique  
54280 CHAMPENOUX*

Les études sur le transfert des polluants dans les milieux aériens, ou dans l'environnement aérien immédiat des milieux terrestres, sont particulièrement importantes car ces informations vont conditionner par la suite toutes les études écotoxicologiques des effets des sources de polluants atmosphériques sur les écosystèmes terrestres ou aquatiques.

Dans le cadre de ces études sur le transfert ou le dépôt de polluants atmosphériques, les plantes, de par leurs caractéristiques, sont particulièrement intéressantes, et plusieurs méthodes utilisant des bio-indicateurs ou des bio-accumulateurs végétaux ont été mises au point au laboratoire

**Bio-surveillance de la pollution atmosphérique particulaire (ETM)**

Les végétaux, de par les propriétés particulières de leurs surfaces foliaires, sont de très efficaces bio-accumulateurs des pollutions particulières : forte rugosité des feuilles due à la présence des cires épicuticulaires et parfois de trichômes.

Dans le cadre d'études sur les risques écotoxicologiques liés aux ETM, l'utilisation de bio-accumulateurs végétaux et l'étude des poussières collectées par les feuilles nous ont permis :

- d'identifier et de caractériser les sources de pollution en détectant la présence des polluants dans l'air
- d'estimer les niveaux critiques pour les différents écosystèmes en donnant des informations sur les niveaux relatifs des polluants dans l'atmosphère
- de cartographier l'emplacement des zones à risque en définissant l'étendue des zones touchées par les différents niveaux de polluants
- d'estimer l'incidence des polluants sur la contamination des chaînes alimentaires en renseignant sur la capacité de transfert des polluants au niveau de l'interface air-végétaux.

Grâce aux qualités et aux performances de ces méthodes de bio-surveillance utilisant les végétaux (méthodes simples, rapides et peu onéreuses), ces études écotoxicologiques peuvent aller de l'échelle d'un site jusqu'à l'échelle d'un continent, et elles concernent des sources de pollution atmosphérique par les ETM aussi diverses que les voies de circulation, les complexes industriels, les zones urbaines, etc.

Les bio-accumulateurs végétaux les plus utilisés dans notre laboratoire pour les études concernant l'impact des ETM sont :

- le ray grass en bio-accumulation active
- les arbres : arbres d'alignement, arbres forestiers, etc, en bio-accumulation passive.

**Bio-surveillance de la pollution atmosphérique par les composés organiques**

De par la présence de cires au niveau de leurs surfaces foliaires (cires cuticulaires), les végétaux absorbent très efficacement les composés organiques lipophiles présents dans l'air et ils peuvent alors être utilisés comme des bio-accumulateurs dans le cadre d'études sur les risques écotoxicologiques liés à la pollution atmosphérique par ces composés.

Ces méthodes de bio-surveillance des composés organiques par des végétaux sont en cours de mise au point au laboratoire et nous utilisons comme bio-accumulateurs :

- le chou pour la bio-accumulation active
- le pin sylvestre pour la bio-accumulation passive

Les composés organiques dont nous étudions les transferts à partir de l'atmosphère sont actuellement :

- le benzène en zone urbaine
- les pesticides en zone rurale.



## MESURES EN CONTINU ET IN SITU DES PARAMETRES DE LA SOLUTION DU SOL

FEDER F., BOURRIE G. et TROLARD F.

*INRA UR Sol et Agronomie de Rennes-Quimper  
65 rue de St Brieuc - 35042 RENNES cedex*

Une sonde multiparamétrique mise au point initialement pour les études océanographiques a été adaptée, testée, et calibrée pour l'étude des variations de paramètres chimiques et physico-chimiques des eaux du sol. Les paramètres mesurés en continu par la sonde sont la température, le pH, l'oxygène dissous, le potentiel d'oxydo-réduction et la conductivité électrique. Parallèlement des analyses ponctuelles sont effectuées à titre de contrôle ainsi que des analyses complémentaires (Fer(II), alcalinité, éléments majeurs).

Placée à 60 cm de profondeur dans un horizon hydromorphe saturé, la sonde enregistre la valeur de chaque paramètre toutes les heures. Chaque mesure horaire est le résultat de la moyenne de 60 mesures effectuées pendant une minute. Les mesures ponctuelles ont été effectuées tous les quinze jours.

La comparaison des données en continu et des données discrètes (DEA de F. Féder, 1998) montre l'absence de dérives de la sonde et la bonne précision des mesures de pH, potentiel rédox, température et conductivité. Ceci a permis, après une phase d'une dizaine de jours de rééquilibration du système, de mettre en évidence des fluctuations brutales du pH durant quelques heures corrélées avec des averses, qui se surimposent à une variation saisonnière du pH liée au démarrage de la végétation au printemps ; les variations du potentiel rédox  $E_h$  sont également suivies avec une bonne précision. La concentration en oxygène dissous par contre reste toujours très petite et le capteur ne répond pas avec une sensibilité suffisante, voire s'empoisonne et répond de façon erratique du fait de la dégradation des performances de la membrane. La mesure de ce paramètre apporte donc peu d'informations utiles, d'autant plus qu'il est avéré depuis longtemps que l'oxygène dissous n'est pas électroactif à l'électrode de platine.

## TRANSFERT ET DEVENIR DE COMPOSES METALLIQUES ET ORGANIQUES ISSUS DU LISIER DE PORCS DANS LES SOLS HYDROMORPHES

JAFFREZIC A. , BOURRIE G., TROLARD F.

*INRA -U.R. Sol Agronomie de Rennes -Quimper  
65 rue de St Brieuc, F 35042 Rennes Cedex*

Les teneurs en micropolluants Cu et Zn augmentent régulièrement dans les sols soumis à des épandages de lisier de porcs. Il existe un risque de mobilisation de ces micropolluants vers le réseau hydrographique soit par transfert particulaire (ruissellement) soit par la solution du sol. Les zones humides, localisées en bas de versant, sont souvent l'interface entre le versant cultivé et le ruisseau. Existe-t-il des transferts de composés issus du lisier vers les sols hydromorphes de ces zones humides? Que deviennent ces éléments en conditions réductrices?

Un transect est équipé de collecteurs d'eau du sol placés dans les différents horizons sur une séquence sols sains-sols hydromorphes. Le pH, la température, le Eh et la concentration en Fe(II), indicateur de la réduction du milieu, sont mesurés *in situ* sur les eaux du sol. Les concentrations en anions, cations, Cu, Zn et carbone organique dissous (COD) sont mesurées au laboratoire. L'ultrafiltration tangentielle permet de séparer les composés présents en solution selon des critères de poids moléculaires (3 kDa et 50 kDa). Toutes les solutions du sol sont préservées de l'oxygène de l'air pour éviter toute oxydation du Fe(II) ainsi que de la lumière pour éviter toute photoréduction.

Suite à un épandage, on observe dans les eaux de la zone humide une augmentation nette des teneurs en COD (de 10 à 35 mg/l), ainsi qu'une augmentation des teneurs en Cu et Zn dans les horizons de surface. La distribution en poids moléculaire des composés organiques présents dans l'eau est totalement modifiée. Alors qu'avant l'épandage, 80% du carbone était présent dans la fraction de poids moléculaire (PM) inférieur à 3 kDa après l'épandage, le carbone est réparti de façon homogène dans les trois fractions de PM. Ceci se répète six mois plus tard suite à un autre épandage. Les composés organiques issus du lisier migrent via la solution du sol vers le réseau hydrographique. Les micropolluants métalliques Cu et Zn migrent également.

Lors de la saturation du milieu par l'eau, les conditions anoxiques se développent. Les micro-organismes utilisent le Fe(III) comme accepteur d'électron, il y a alors dissolution des hydroxydes de fer et présence de Fe(II) en solution. Ces hydroxydes de fer sont des phases porteuses de Cu et Zn, car ces deux micropolluants sont mobilisés en solution en même temps que le Fe(II). On observe donc une pollution ponctuelle suite aux épandages ainsi qu'une pollution diffuse pendant toute la durée de saturation anoxique.

## BIOMARQUEURS METABOLIQUES ET TOLERANCE AU CADMIUM CHEZ LE MAIS

MOCQUOT Bernard, LAGRIFFOUL Arnaud et MENCH Michel

*Equipe Biogéochimie des Eléments Traces dans les Agrosystèmes, Unité Agronomie, I.N.R.A.  
Centre de Recherches Bordeaux-Aquitaine, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex*

Le cadmium est un des métaux les plus toxiques impliqué dans la pollution des milieux due aux pratiques industrielles et agricoles. A cause de son accumulation dans la chaîne alimentaire, en particulier via l'absorption par les plantes, le cadmium présente un réel risque pour l'homme. Le cadmium est toxique pour les végétaux à des concentrations assez élevées mais les mécanismes de phytotoxicité sont encore mal connus. Nous avons étudié l'effet du cadmium sur les plantes supérieures en utilisant le maïs comme bioindicateur modèle.

Les plantules de maïs sont cultivées pendant 2 semaines en chambre climatisée sur une solution nutritive aérée et en présence de doses croissantes (de 1 nanomolaire à 25 micromolaire) en cadmium pendant la dernière semaine. L'accumulation du métal dans les feuilles et les racines a été déterminée à la fin de l'exposition des plantules.

Des paramètres morphologiques (hauteur des parties aériennes, biomasse, pigments chlorophylliens) et des marqueurs métaboliques ont été déterminés dans les feuilles et les racines. Quand les plantules de maïs accumulent du cadmium dans les différents organes, il y a une modification de l'activité de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique et la régénération du NAD(P)H (enzyme malique, glucose-6-phosphate déshydrogénase, isocitrate déshydrogénase et glutamate déshydrogénase) ainsi que celle d'enzymes impliquées dans le stress oxydant (guaiacol-peroxydases, ascorbate-peroxydases et glutathion réductase). Les teneurs en glutathion ont aussi été mesurées en réponse au stress cadmium. Ce tripeptide est très important dans la régulation du stress oxydant et est le précurseur des phytochélatines qui sont connues pour lier le cadmium dans les cellules.

Les valeurs-seuils de la concentration en cadmium produisant une modification des différents marqueurs ont été déterminées afin d'identifier les biomarqueurs précoces en réponse au stress métallique avant qu'une diminution de la croissance puisse être mesurée. Ces résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la tolérance au cadmium chez les végétaux supérieurs. Ils permettent aussi d'élaborer un biotest simple, rapide et efficace pour diagnostiquer l'état de contamination d'un sol et de contrôler la qualité de réhabilitation d'un sol pollué.

Cette recherche a reçu le soutien de l'INRA (AIP-ECOPOL) et de l'AFIC.

### **Publications :**

LAGRIFFOUL A., MOCQUOT B., MENCH M., 1998. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays L.*). *Plant and Soil*, 200, 241-250.

LAGRIFFOUL A., 1998. Biomarqueurs métaboliques de toxicité du cadmium chez le maïs (*Zea mays L.*). Mécanismes de tolérance, relations dose-effet et précocité de la réponse. Thèse de Doctorat d'Ecotoxicologie, Université de Bordeaux I.



# **SUBSTANCES ORGANIQUES**

**(Communications)**



## CHIMIE DES PESTICIDES EN MILIEU AQUEUX ET NOUVELLES STRATEGIES ANALYTIQUES

EINHORN Jacques

*Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques, INRA  
Route de St-Cyr, 78026 Versailles Cedex*

### Activités de l'équipe « Spectrométrie de Masse et Chimie Analytique » et place de la chimie environnementale

Ses orientations intègrent les besoins analytiques nouveaux et pointus de la biologie ainsi que certains créneaux de la chimie analytique fondamentale et appliquée. Son activité s'articule autour des thématiques suivantes :

- Signaux chimiques intervenant dans les relations insecte-insecte (aspects structuraux)
- Substances d'origine végétale (toxines, hormones, insecticides..)
- Chimie en phase gazeuse et spectrométrie de masse en tandem (MS-MS, MS<sup>n</sup>)
- Chimie analytique et Environnement

Les deux premiers thèmes concernent l'identification de phéromones de Coléoptères ou d'Homoptères (Cochenilles), de toxines de Champignons phytoparasites ou de substances pesticides de structures complexes et originales. La conception de méthodes nouvelles basées sur des « Réactions ion-molécule spécifiques » et les « Techniques MS-MS » sont destinées à fournir des outils performants pour la localisation de fonctions et la différenciation de structures isomères éventuellement polyfonctionnelles ou le screening de familles structurales d'intérêt biologique. En Chimie de l'Environnement, l'équipe effectue également une recherche méthodologique en vue d'étudier le devenir de pesticides en milieu aqueux (notamment les métabolites polaires, les plus difficiles à appréhender) et propose des stratégies analytiques utilisant des techniques de pointe (par ex. par désorption laser effectuée directement sur membranes d'extraction couplée à un spectromètre de masse). Ces recherches sont notamment appliquées en conditions d'ozonation (*cf.* traitement des eaux) et un dispositif automatisé de suivi de réaction a été conçu et breveté. Enfin, l'équipe est impliquée dans des projets pluridisciplinaires à vocation finalisée (*cf.* résidus de pesticides et pratiques culturales, effets non-intentionnels).

Autres : activité importante d'enseignement (cours, TD. et T.P. de Spectrométrie de masse avec l'aide de nos 3 ingénieurs dans le DESS-IPCA, Université de Versailles).

**Mots-clés :** spectrométrie de masse organique, analyse structurale, chimie en phase gazeuse, médiateurs chimiques, pesticide, qualité des eaux.

## ECODYNAMIQUE ET ECOTOXICOLOGIE DES FONGICIDES INHIBITEURS DE LA BIOSYNTHESE DES STEROLS : APPROCHE PLURIDISCIPLINAIRE DEVELOPPEE EN CULTURES CEREALIERES A L'ECHELLE PLURIANNUELLE

MONTFORT Françoise\*, en collaboration avec J. EINHORN, A. TREBAUL, P. GAILLARDON (INRA Phytopharmacie, Versailles), C. GASCUEL-ODOUX, P. CURMI (INRA Science du sol, Rennes), F. VERTES (INRA Agronomie, Quimper)

\*INRA, U.R.I.G.C., BP 29, 35653 Le Rheu cedex

### Introduction

La gestion de la protection contre les maladies en cultures céréalières repose encore principalement sur la lutte chimique : en pratique, les principales maladies du blé (piétin-verse, Oïdium, Septorioses, Rouilles) sont combattues par l'application de traitements aériens pendant la période printanière (avril à juin). Mais, sur les 28 substances actives systémiques homologuées sur blé, 21 présentent le même mode d'action biochimique (inhibition de la biosynthèse des stérols des champignons), tout en appartenant à des familles chimiques variées (triazoles, imidazoles, morpholines...). Nos recherches concernent donc l'intérêt, mais surtout les limites de cette polyvalence de mode d'action, en termes de durabilité et d'innocuité pour les agro-écosystèmes.

### Objectifs et approche développée

Les questions portent sur les risques d'impacts écologiques non-intentionnels au niveau du sol sur les agents pathogènes visés ou non (résistances, déplacements d'équilibre) et sur les microorganismes non-cibles (utiles/microflore antagoniste ou contribuant plus généralement à la biodiversité naturelle dans les sols). Mais l'évaluation et l'analyse des impacts biologiques des polluants implique de connaître avec précision les risques d'exposition des organismes à ces polluants. Ce double objectif (écodynamique - écotoxicologie) nous a conduits à engager une approche *pluridisciplinaire*, sur site (à l'échelle d'un très petit bassin versant) et prenant en compte les risques à une échelle *pluriannuelle*.

### Résultats et discussion

- du point de vue devenir des molécules dans le sol, on a démontré que la microflore tellurique est exposée, en cultures céréalières intensives, de façon quasi-permanente aux molécules appliquées : les IBS étudiés persistent dans la couche superficielle du sol pendant plusieurs mois, la dissipation n'étant liée qu'à leur lente dégradation.
- au niveau de la microflore associée au sol, les résultats de terrain indiquent certaines tendances : apparition dès le 2<sup>ème</sup> cycle cultural de populations de *Pseudocercospora herpotrichoides* (agent du piétin-verse) moins sensibles aux molécules étudiées, mise en évidence d'un léger effet dépressif (du point de vue quantitatif) sur la microflore fongique tellurique globale ; il n'apparaît par contre pas d'effet notable, au plan quantitatif, sur la microflore auxiliaire étudiée (*Trichoderma spp.*, *Pseudomonas fluorescents*).
- du point de vue risques de transfert des molécules vers les eaux, on démontre que, compte-tenu des concentrations dans la couche de surface, le risque d'entraînement des fongicides par érosion et ruissellement est important au printemps et est bien davantage corrélé à la pluviométrie et période d'application qu'aux caractéristiques intrinsèques des molécules ; en revanche, les possibilités de migration verticale sont très réduites, si ce n'est par circuits préférentiels (lessivage accéléré).

### Conclusions

Ce programme pluridisciplinaire, initié en 1994, en est au stade relativement complexe où il s'agit de corréler dynamique des fongicides dans le milieu et écotoxicologie au niveau tellurique. Grâce aux collaborations établies, les questions sont précisées (notamment influence de l'adsorption sur l'activité biologique) et les limites méthodologiques cernées. Ainsi, à condition de disposer d'outils intermédiaires (voir poster C. Roy *et al.*) complémentaires de modèles très simplifiés *in vitro* et d'approches en grandeur réelle, on se donne des moyens pour évaluer la durabilité et les conséquences au niveau des écosystèmes des méthodes de protection phytosanitaire dans différents modes de production (conventionnel, intégré, agrobiologique).



## EVALUATION DE L'IMPACT ECOTOXICOLOGIQUE RESULTANT DE L'USAGE D'ANTIPARASITAIRES ENDECTOCIDES EN ELEVAGE EXTENSIF DE RUMINANTS : RESULTATS PRELIMINAIRES ET ATTENDUS.

CALLEJA Cécile<sup>°</sup>, ALVINERIE Michel<sup>°</sup>, DELATOUR Paul, FOURNIER Jean-Claude,  
GALTIER Pierre<sup>°</sup>, KERBOEUF Dominique, LUMARET Jean-Pierre et MOUGIN Christian

<sup>°</sup>INRA UR66 Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, 180, chemin de Tournefeuille, BP3,  
31931 Toulouse Cedex. (autres participants : INRA Lyon UA 188, INRA Dijon UR 111, INRA  
Nouzilly UR 86, INRA Versailles UR 258 et Université Paul Valéry Montpellier EA 733)

Les avermectines et milbémycines constituent une famille d'antiparasitaires à large spectre appelés endectocides car ils sont à la fois actifs contre les parasites internes (nématodes) et externes (acariens, insectes). Leur efficacité thérapeutique exceptionnelle les place au premier rang mondial des antiparasitaires avec une très large utilisation tant chez l'animal que chez l'Homme (onchocercose, filariose).

Leur mode d'action résulte d'un effet systémique s'exprimant à faible concentration et leur rémanence dans l'organisme permet la protection d'animaux pendant plusieurs semaines à partir d'une administration unique (Alvinerie et al, 1993). Leur excrétion se fait à 80 % par voie fécale, sous la forme du principe parental inchangé (Chiu et al, 1986). Cette particularité métabolique est à l'origine de leur toxicité vis à vis des insectes coprophages impliqués dans les processus de décomposition des déjections du bétail (Lumaret, 1986), premier effet écotoxicologique clairement identifié pour ces composés. Mais on ignore encore l'impact à long terme sur la mésosfaune du sol, les nématodes parasites ou sur la biodiversité des arthropodes vivant sur les pâtures. Par ailleurs, dans le cas des nématodes, l'apparition de résistances à ces antiparasitaires préoccupe tout autant les éleveurs que les praticiens.

En parallèle, la communauté scientifique s'interroge actuellement sur l'impact écotoxicologique d'une nouvelle forme galénique d'ivermectine, mise sur le marché en France en 1995, qui relargue une forte dose de médicament (1,72 g) sur une durée de 4 à 5 mois (Strong et Wall, 1994). Il s'agit d'un bolus ruminal attractif par sa facilité d'utilisation, particulièrement adapté à l'élevage extensif et dont le principe serait généralisable aux autres molécules du groupe des endectocides. Dès lors, il importait de mettre en œuvre une recherche multidisciplinaire répondant au souci de limiter les risques écotoxicologiques liés à l'utilisation de tels antiparasitaires.

Dans ce sens, nous avons constitué en 1997 un réseau de laboratoires, fédéré autour d'un projet de programme PNETOX et quelques études préliminaires ont d'ores et déjà été initiées. Sur le plan pharmacocinétique et métabolique, ces dernières ont montré les fortes concentrations fécales libérées dans le biotope naturel du bovin (0,7 à 3,5 µg/g tout au long des 4 mois) lors de l'administration du bolus, ainsi que le caractère potentiellement inducteur enzymatique de l'ivermectine sur le cytochrome P4503A chez le rat femelle.

Sur la base de ces premiers résultats, nous nous proposons, dans le cadre de nos compétences pharmacologiques, de déterminer plus précisément la cinétique des rejets fécaux d'endectocides par les bovins et d'identifier clairement les effets de ces molécules sur les protéines de métabolisme et de transport. En parallèle, les différents partenaires s'attacheront à étudier les effets de ces molécules sur la faune des insectes coprophages, sur les nématodes et sur la microbiologie des sols.

### Références

- Alvinerie M, Sutra JF, Galtier P, Toutain PL 1993. Cinétiques plasmatiques de l'ivermectine chez la vache. *Rec. Med. vétér.*, **169**, 259-261.
- Chiu SH, Sestoskas E, Taub R, Buhs R, Green M, Vandenhuevel JA, Arison BH, Jacob TA 1986. Metabolic disposition of ivermectin in tissues of cattle, sheep and rats. *Drug Metab. Dispos.*, **14**, 590-600.
- Lumaret JP. 1986. Toxicité de certains helminthocides vis-à-vis des insectes coprophages et conséquences sur la disparition des excréments de la surface du sol. *Acta Oecologia, Oecol. Applic.*, **7**, 313-324.
- Strong L, Wall R 1994. Ecological impacts of the avermectins: recent developments. *Pest. Outlook*, 12-16.

## DISPONIBILITE DES XENOBIOTIQUES ORGANIQUES DANS LES SOLS

CHAPLAIN V. et MOUGIN C.

*Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques  
Equipe Pesticides et Environnement  
Route de Saint-Cyr 78026 Versailles Cedex*

La disponibilité des xénobiotiques organiques dans les sols détermine leur mobilité et leur biotransformation, on parle alors de biodisponibilité. Cette disponibilité est régie par les interactions physico-chimiques entre les xénobiotiques et le sol, milieu poreux fortement hétérogène de par la nature de ces constituants et de par leur répartition spatiale.

Des expériences de simulation de pluie réalisées sur des micro-parcelles de sol montrent que la cinétique de désorption de molécules herbicides (diuron, atrazine et isoproturon) est l'étape limitante vis à vis du transport rapide de ces molécules associé au ruissellement de l'eau à la surface du sol. Dans le cas de molécules très hydrophobes telles que les hydrocarbures aromatiques polycycliques, HaPs, la biodisponibilité des polluants, du fait des interactions avec la matière organique des sols, ralentie les cinétiques de dégradation des polluants au cours du traitement des sols.

Les cinétiques d'adsorption/désorption des xénobiotiques organiques dans les sols sont sensibles à l'influence de paramètres physico-chimiques tels que : température, % humidité des sols, formulation des produits phytosanitaires. Pour des molécules modèles (nonylphénol et HaPs) on étudie l'influence de l'apport de matières organiques exogènes (boues de station d'épuration) ou de molécules tensioactives sur ces cinétiques. La biodisponibilité de ces produits est évaluée en couplant ces expériences de transfert de masse à des expériences de dégradation biologique.

Pour une interaction physico-chimique donnée, ces cinétiques sont liées à la structure hétérogène des sols. Par des expérimentations sur des suspensions modèles de sol, nous avons mis en évidence l'importance du transport diffusif au sein des micro-agrégats, et avons défini des outils de caractérisation de cette micro-porosité, basés sur la dispersion hydrodynamique de traceurs inertes.

## LA RETENTION ET LA DEGRADATION DES PESTICIDES DANS LES SOLS COMME FACTEURS DE REGULATION DE LEUR DISPONIBILITE

BARRIUSO E., BENOIT P., CALVET R., CHARNAY M. P., HOUOT S.

*INRA, Unité de Science du Sol, BP 01, 78850 Thiverval-Grignon*

### **Introduction**

Le cadre général des activités de l'unité est celui de la pollution organique des sols à caractère diffus, en particulier celle dont les pesticides sont responsables lors de leur usage agricole. L'objectif finalisé sous-jacent est de rendre compatible l'optimisation de l'efficacité phytosanitaire des pesticides et la réduction des risques de pollution. Les pesticides arrivant au sol sont impliqués dans différents processus physico-chimiques, chimiques et biologiques ayant des cinétiques propres, fonction de la réactivité des molécules, de la nature des constituants des sols et des conditions pédoclimatiques. Les phénomènes de rétention vont définir la quantité de pesticide présente dans la solution du sol qui sera disponible pour manifester une action toxique, mais disponible aussi pour les micro-organismes du sol qui vont pouvoir le dégrader. Ce pesticide en solution sera aussi disponible pour être entraîné par lixiviation, et être à l'origine de la contamination des eaux de drainage et des eaux souterraines. Pour comprendre le déterminisme de la disponibilité des pesticides dans les sols, on est donc obligé d'aborder conjointement l'ensemble de phénomènes de rétention, de dégradation et de transfert.

### **Démarche expérimentale**

La rétention des pesticides par les sols est souvent décrite comme la résultante des conditions d'équilibre caractérisées par des constantes d'adsorption et de désorption. Mais, la plupart des processus impliqués dans la rétention sont évolutifs dans le temps. Cette dépendance temporelle se manifeste tant dans les processus biologiques, que dans les processus physico-chimiques. Un premier constat est la diminution de la disponibilité des pesticides avec le temps, accompagnée d'une diminution de leur extractibilité. Ceci peut être interprété par l'évolution des interactions des pesticides dans la phase adsorbée vers la stabilisation des résidus jusqu'à la formation de résidus non extractibles. Les hypothèses de travail souvent utilisées sont : (1) la rétention (initialement due à l'adsorption) est une étape clef et préalable à tout phénomène de stabilisation (responsable d'une diminution de la disponibilité) ; (2) la disponibilité d'un pesticide est assimilable à sa présence dans la solution du sol qui est estimable à partir des données de sorption ou mesurable à l'aide de techniques d'extraction; (3) le degré de stabilisation des pesticides ou de leurs résidus peut être évalué par des techniques d'extraction, les résidus non extractibles ou "résidus liés" étant le point culminant de cette stabilisation.

### **Exemples de résultats**

Des résultats sur l'évaluation des quantités de pesticides disponibles ou présente dans la solution du sol seront présentés. Ainsi que des exemples des résultats des expériences d'incubation en plein champ ou au laboratoire, permettant de mettre en évidence la diminution de la disponibilité avec le temps. L'évaluation « physico-chimique » de la disponibilité dans des pesticides dans les sols est complétée par une évaluation plus précise de leur biodisponibilité vis-à-vis de la microflore du sol (utilisation de techniques d'incubation) et/ou de plants tests (biotests de phytotoxicité). L'approche expérimentale développée pour les pesticides est appliquée à d'autres polluants organiques.

## ECOTOXICOLOGIE ALGALE, HERBICIDES ET DYNAMIQUE DES COMMUNAUTÉS PHYTOPLANCTONIQUES

BERARD A. & LÉBOULANGER C.

*Station d'Hydrobiologie Lacustre, INRA, 74203 Thonon les Bains Cédex, France*

### des questions ...

---

Depuis 1993-94 le groupe algologie de l'Unité d'hydrobiologie lacustre de Thonon développe une recherche sur les effets de pesticides sur les peuplements phytoplanctoniques lacustres. Deux approches sont réalisées :

Une approche écophysiological des cellules algales: Un travail de doctorat (A. El Jay, Université Paris VI) encadré par Jean Pelletier a porté sur certains aspects écophysiological du comportement des algues vis-à-vis des herbicides, avec en particulier l'utilisation de techniques d'induction de fluorescence pour la caractérisation du stress algal. Ce travail d'écophysiological appliqué à l'écotoxicologie algale est poursuivi par Christophe Le Boulanger.

Une approche écodynamique des peuplements: Ce travail réalisé par Annette Bérard et Christophe Le Boulanger porte sur le comportement des peuplements phytoplanctoniques vis-à-vis des pesticides, en particulier sur les interactions interspécifiques, la caractérisation (tolérance, taxonomie) des communautés phytoplanctoniques vis-à-vis de ces polluants et les variations liées aux successions phytoplanctoniques. L'essentiel de cette démarche repose sur de la limnologie comparée entre milieux soumis à différentes pollutions et sur des approches expérimentales (microcosmes, chémostats, monocultures).

### *Nos hypothèses sont les suivantes :*

Les xénobiotiques, en quantités non négligeables dans les plans d'eau, risquent d'induire des perturbations physiologiques non apparentes, mais susceptibles de diminuer les capacités compétitives des espèces les plus sensibles, provoquant ainsi leur raréfaction, voire leur disparition au profit du développement d'organismes plus tolérants, sans qu'intervienne aucun effet létal direct. Il existe une sensibilité variable selon les espèces (et probablement les souches) algales aux xénobiotiques. **Il est possible, en conséquence, que les xénobiotiques puissent détruire les communautés phytoplanctoniques contaminées.** Cette destruction induite au niveau des producteurs primaires que sont les algues pourrait d'être transférée dans les maillons supérieurs de la chaîne alimentaire (zooplancton puis poisson) provoquant ainsi une destruction générale de l'écosystème pollué.

Ces hypothèses de base nous suggèrent plusieurs questions quant au comportement des communautés biologiques au sein d'un écosystème contaminé par les pesticides :

- 1 - Cette destruction par sélection d'organismes plus tolérants que d'autres est-elle réelle? Importante? Quels sont les organismes sélectionnés?
- 2 - La communauté algale contaminée se différencie-t-elle d'une communauté similaire non contaminée? Pourra-t-on caractériser l'état de pollution en certains pesticides d'un milieu aquatique en caractérisant la communauté algale de ce milieu? Quels outils d'évaluation de

*la qualité de l'eau pouvons nous mettre en place ?*

*3 - Si le polluant agit sur la structure des peuplements phytoplanctoniques, quelles sont les conséquences sur les communautés des compartiments trophiques supérieurs?*

*4 - La structure des communautés phytoplanctoniques étant liée étroitement aux variations saisonnières, existe-t-il des variations du comportement de ces communautés vis-à-vis des polluants liées à la saison? Peut-on préciser les paramètres susceptibles d'influencer ces variations?*

La seconde et la troisième question sont abordées dans le cadre d'une collaboration avec l'Université de Göteborg et l'Institut Forel de Genève (accueil d'un post Doctorant et expérimentations communes avec un Doctorant) et d'une collaboration avec l'Inra de Rennes (écologie aquatique, accueil d'une Doctorante: Florence Seguin, PNETOX).

*Nous développerons dans cette présentation la première et la dernière question appliquées à l'atrazine (herbicide inhibiteur du PS II).*

### **... Quelques réponses**

---

Le polluant perturbe-t-il la structure des peuplements phytoplanctoniques ?

Nous avons réalisé depuis **quatre ans des expérimentations en microcosmes** de cinq litres avec des communautés phytoplanctoniques naturelles du lac Léman. Ces expérimentations ont montré que **l'atrazine**, à une concentration de 10 µg/l et sur une durée de 10 à 21 jours, **perturbe l'évolution individuelle de certaines espèces** algales au sein des peuplements, et par conséquent, la molécule **perturbe globalement** la structure des peuplements. Certaines algues au sein des peuplements sont donc inhibées, d'autres stimulées par l'atrazine. Des **expérimentations complémentaires** nous ont permis de mettre en évidence le fait que ces **stimulations** sont **indirectes**, probablement **via les interactions interspécifiques**. Afin de préciser ces phénomènes d'interactions interspécifiques, nous avons réalisé des expérimentations en systèmes simplifiés avec des mono- et des bicultures algales au laboratoire en présence d'atrazine. Mais les résultats sont difficiles à interpréter, probablement parce que les algues étaient rapidement carencées en certains nutriments (cultures en batchs). Le protocole expérimental est donc à revoir : ces travaux sont poursuivis par C. Leboulanger en culture continue (chémostat) afin de se libérer des contraintes dues à ces facteurs limitants.

*Ces expérimentations en microcosmes nous ont permis de mettre en évidence un effet destructurant de l'atrazine à une concentration de 10 µg/l sur le phytoplancton. Ce toxique est donc susceptible de sélectionner les communautés algales.*

L'effet du polluant est-il variable selon la saison ?

Nos travaux expérimentaux ont principalement porté sur les peuplements phytoplanctoniques prélevés dans le lac Léman. Le Léman, outre le fait qu'il soit peu contaminé, ne présente pas de variations saisonnières des concentrations en pesticides (phénomène de dilution et temps de renouvellement du lac importants). Les communautés testées lors de nos expérimentations ne connaissent donc pas initialement de variations de contamination en herbicides. Pourtant, **ces quatre années correspondant à une douzaine d'expérimentations réparties selon les différentes saisons, ont montré une variabilité des réactions de la communauté**

phytoplanctonique lémanique contaminée par une même concentration d'atrazine (10µg/l). Globalement les communautés ont réagi plus ou moins intensément à l'atrazine, une déstructuration plus importante a été mise en évidence à la fin du printemps. De plus, certaines espèces ont présenté des comportements différents (voire opposés) vis-à-vis des 10µg/l d'atrazine. C'est pourquoi nous avons entrepris des expérimentations *in situ* et *in vitro* sur une espèce (*Oscillatoria limnetica*) visant à préciser les facteurs du milieu susceptibles d'influer l'action de l'herbicide sur les algues. En dehors de la structure initiale des peuplements soumis au polluant, la température semble être aussi un facteur important.

*Il existe donc bien un « effet saisons » sur la sensibilité des algues et des communautés algales vis-à-vis du toxique. Effet associé aux communautés elles mêmes (leur état dans la succession) mais aussi aux facteurs du milieu (comme la température). Cette conclusion est fondamentale car elle montre la complexité possible d'un système qui peut réagir non seulement différemment selon ses caractéristiques, les caractéristiques et les concentrations des polluants (qui généralement varient selon les pratiques agricoles et la saison), mais aussi selon l'état de ses communautés algales lui même dépendant de la saison. Et dans le cadre d'une gestion d'un bassin versant agricole, répondre à cette question est tout aussi fondamental.*

#### conclusion ... évaluation des risques

D'un point de vue de la gestion des milieux naturels, nos résultats obtenus suggèrent une réflexion sur les **risques écotoxicologiques possibles des herbicides dans les milieux aquatiques** et sur le choix des paramètres pertinents et adéquats à la détermination de ces risques. Actuellement, les méthodologies d'évaluation des risques sont principalement basées sur des données de CE50 ou de NOEC calculées à partir de monocultures *in vitro* et associées à des facteurs de sécurité. Une des difficultés de caractériser ces seuils est due au fait que le polluant dans le milieu naturel n'agit pas uniquement sur les populations mais sur la structure ainsi que sur la dynamique du système ; et qui dit dynamique dit variabilité temporelle... Nous devons donc **développer nos connaissances à propos des interactions entre toxiques et facteurs environnementaux**, car ces interactions sont susceptibles de réduire ou d'amplifier les conséquences d'une pollution par ces toxiques dans les milieux aquatiques naturels.

Afin d'appréhender la persistance des herbicides dans ces milieux naturels, il est nécessaire de compléter nos travaux expérimentaux par des études réalisées directement *in situ* sur des pas de temps correspondant au rythme des successions biologiques et aux périodes de contaminations par les herbicides, et dans des milieux variés. Les méthodologies basées sur la systématique des algues échantillonnées (microscopie et biologie moléculaire, J.C. Druart et J.F. Humbert) dans les écosystèmes sont indispensables pour **appréhender la biodiversité et sa variabilité dans ces milieux**. En complément, l'étude de la **résistance d'une communauté naturelle au polluant** dans le but de **caractériser une réponse à une pression de sélection par ce polluant**, semble une approche prometteuse pour suivre, étudier et interpréter les effets des contaminants toxiques dans les milieux naturels<sup>1</sup>, (A. Bérard, C. Leboulanger, B. Nyström).

<sup>1</sup> Méthode PICT : Pollution Induced Community Tolerance proposée par le laboratoire de Blanck et al. (Göteborg)

## BIOTRANSFORMATION FONGIQUE DES XENOBIOTIQUES

MOUGIN C. et CHAPLAIN V.

*Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques  
Route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles Cedex*

Les objectifs de ce programme de recherche sont de mieux comprendre le devenir des xénobiotiques dans les sols, en étudiant en particulier leur biotransformation par des champignons filamenteux, et de proposer des procédés innovants de dépollution des sols. Les composés considérés sont des pesticides, des produits à usage vétérinaire, des polluants industriels (HAP) ou domestiques (résidus de surfactants).

Deux domaines sont considérés :

### 1. Aspects microbiologiques de la transformation des xénobiotiques

Au cours des études réalisées dans les sols ou en milieu liquide, la transformation des xénobiotiques est évaluée en fonction de critères physico-chimiques température, pH, surfactants, mais aussi taxonomiques. Nous avons développé des outils afin de sélectionner des souches performantes vis à vis de la dégradation de xénobiotiques donnés, d'inoculer ces souches dans des sols non stériles et d'assurer leur survie ou maintien dans les sols pendant plusieurs semaines. Leur croissance est classiquement mesurée par détermination de l'ergostérol.

En général, les résultats obtenus montrent que la minéralisation des xénobiotiques est faible en présence des champignons seuls, mais que ces derniers synergisent la minéralisation microbienne. D'autre part, les champignons oxydent les xénobiotiques en composés qui semblent de bons substrats pour les populations microbiennes. Les souches fongiques que nous avons sélectionnées, après inoculation, se développent rapidement dans des sols agricoles ou industriels. Cependant, les réactions de transformation restent limitées par la biodisponibilité des polluants.

### 2. Aspects biochimiques de la transformation des xénobiotiques

Chez les souches sélectionnées, nous avons purifié et caractérisé certains systèmes enzymatiques d'oxydation et nous cherchons à déterminer la structure des différentes isoformes produites. Nos résultats permettent d'impliquer dans certaines réactions d'oxydation de xénobiotiques des enzymes exocellulaires (peroxydases, laccases), mais aussi des cytochromes P450 intracellulaires. Ces systèmes enzymatiques possèdent donc un fort potentiel pour la biodépollution d'effluents liquides en réacteur.

La participation de l'équipe à des projets de recherche interlaboratoires (AIP Agrede, Pnetox) est également présentée.

## LES PLANTES POUSSENT SUR LES HYDROCARBURES AROMATIQUES

HENNER Pascale et LICHTFOUSE Eric

*Laboratoire Sols et Environnement, INRA/ENSAIA-INPL, 54505 Vandoeuvre*

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) proviennent de sources naturelles ou anthropiques [1] : pétrole, charbon, gaz d'échappements, feux de végétation, incinération, etc. Certains HAP étant potentiellement cancérigènes, leur concentration dans les zones urbaines, près des routes, dans les boues de station d'épuration et dans certaines friches industrielles présente un risque de transfert vers les organismes vivants. Néanmoins, les HAP sont susceptibles de se biodégrader, notamment dans la rhizosphère qui est le siège d'une activité microbienne intense. Dans l'optique d'utiliser les plantes pour réhabiliter les sols contaminés [2], il convient tout d'abord d'étudier la toxicité des HAP vis à vis des plantes. Ici, une étude alliant la floristique de sites contaminés, des tests de germination et des analyses moléculaires montre que seuls les hydrocarbures aromatiques légers (< 2 cycles), plus solubles et plus biodisponibles, présentent une toxicité vis à vis des plantes.

1. Ancient polycyclic aromatic hydrocarbons in modern soils : 13C, 14C and biomarker evidence  
E. Lichtfouse, H. Budzinski, Ph. Garrigues and T.I. Eglinton  
*Organic Geochemistry* 26, 353-359, 1997.

2. Remediation of PAH contaminated soils  
P. Henner, M. Schiavon, J.-L. Morel et E. Lichtfouse  
*Analisis* 25, M56-M59, 1997.



## INTERETS, INCONVENIENTS ET AMELIORATIONS DES BIOMARQUEURS

AMICHOT Marcel, CUANY André, BRIDE Jean-Marc, TARÈS-AMICHOT Sophie,  
ARTHAUD Laury, BERGE Jean-Baptiste.

*Résistance et Ecotoxicologie, SVE, 123 Bd. F. Meilland, BP2078,  
06606 Antibes Cedex*

Les biomarqueurs sont de plus en plus utilisés pour mettre en évidence la présence de polluants dans l'environnement de l'organisme utilisé. Deux intérêts majeurs se dégagent de cette utilisation: a/ nous mesurons l'impact direct de la pollution sur le vivant et b/ la réponse de l'organisme est intégrative. Le point a/ nous affranchit des problèmes d'interprétation de mesures chimiques: est-ce que la concentration mesurée est toxique? Le point b/ donne en fait un indice de qualité globale de l'environnement car la réponse de l'organisme tient compte de toutes les composantes de son environnement; nous verrons plus loin que ce point peut d'ailleurs être une source d'erreurs. Ces deux points justifient à nos yeux de contribuer au développement de l'utilisation de biomarqueurs. Nous avons choisi de travailler avec des modèles biologiques bien connus, *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans*, et sur un système enzymatique couramment utilisé comme biomarqueur: les cytochromes P450.

Cependant, des inconvénients se présentent aussi. Certains sont inhérents à l'utilisation d'organismes: disponibilité, éthique... D'autres types de difficultés ont été mis en évidence: variabilité inter et intraspécifique des réponses aux polluants, inhibition par certains polluants des activités enzymatiques mesurées (ex: l'EROD, activité dépendante des cytochromes P450, est inhibée par des métaux lourds ou le prochloraze), antagonismes entre polluants au niveau de l'induction de l'expression de gènes (ex: le benzo-a-pyrène a des effets opposés au 3-méthylcolanthrène chez la drosophile alors qu'ils ont les mêmes effets chez les vertébrés). Il nous semble que ces inconvénients illustrent bien la nécessité de mieux connaître à tous les niveaux les systèmes choisis (organisme et enzymes).

Nous participons à l'amélioration et à la fiabilisation des biomarqueurs en nous intéressant à deux points:

- Acquisition de connaissances fondamentales en travaillant sur des modèles de laboratoire (*D. melanogaster* et *C. elegans*). Ceci concerne la caractérisation de l'expression des gènes choisis, la caractérisation biochimique des activités choisies, l'établissement de liens entre activité et gène, la caractérisation de la variabilité intraspécifique des couples activité/gène choisis.

- Exploitation maximum des techniques de biologie moléculaire.

Dans le cadre d'expériences de laboratoire, nous explorons les apports potentiels de la transgénèse au concept de biomarqueurs. Les connaissances acquises au sujet de l'expression des gènes permettront de choisir un/des promoteur/s pour piloter l'expression d'une protéine fluorescente (GFP). Cette nouvelle génération de biomarqueurs permettra de travailler *in vivo* tout en conservant la rapidité de la réponse. Les expériences de transgénèse permettent aussi d'envisager d'obtenir des organismes utilisables pour la biorémediation. Nous développons aussi le potentiel de la technique des microarrangements d'ADN en écotoxicologie. Un dépôt de brevet est à l'étude.

- En collaboration avec d'autres laboratoires, nous appliquons nos connaissances à des situations de terrain avec différentes espèces: drosophile, cétone, gammarre, *C. elegans*. Alexandra Brun, Claire Conrad, Laurent Kubler et Cécile Sabourault participent ou ont participé à ces travaux dans le cadre d'une thèse.

## EFFETS DES DOSES SUBLETALES DE PESTICIDES CHEZ DEUX TYPES D'INVERTEBRES

BELZUNCES Luc P.

*I.N.R.A. – Laboratoire de Toxicologie Environnementale – Unité de Zoologie – Site Agroparc  
84914 Avignon Cedex 9*

Le Laboratoire de Toxicologie Environnementale développe des recherches, aux niveaux physiologique et biochimique, sur les effets des polluants chez les invertébrés selon deux voies principales :

1. Les effets différentiels des toxiques : interactions ligands-cibles
2. Les effets des doses sublétales :

- Effets neurologiques et comportementaux
- Effets physiologiques

Quelques exemples ont été choisis pour démontrer que les doses sublétales de polluants peuvent induire des effets sublétaux délétères importants autres que ceux ayant des conséquences directes sur la descendance des individus.

Les synergies entre les fongicides azoles et les insecticides pyréthrinoïdes ont été mises en évidence en 1992. Il s'agit d'un phénomène brutal qui se manifeste même lorsque que les produits sont administrés à doses sublétales. Cette synergie a été étendue à l'ensemble des fongicides triazoles et imidazoles, et à l'ensemble des insecticides de la famille des pyréthrinoïdes. L'action synergique des azoles et des pyréthrinoïdes est observée non seulement lorsque les produits sont appliqués simultanément mais aussi lorsqu'ils sont administrés de façon séquentielle avec des traitements effectués à 24 heures d'intervalle.

Les insecticides pyréthrinoïdes présentent un coefficient de température négatif en induisant une toxicité inversement proportionnelle à la température. Au niveau neural, cela serait dû au fait que les pyréthrinoïdes bloquent les potentiels d'action d'une manière beaucoup plus puissante à basses températures qu'à hautes. Cependant, en matière de toxicité, il est possible que le coefficient de température négatif soit en partie dû à une inhibition de la thermorégulation par blocage de la contraction des muscles de vol impliqués dans la thermogenèse de l'abeille. En utilisant une méthode non traumatisante mettant en œuvre la thermographie infrarouge, les effets de différents pyréthrinoïdes sur la thermorégulation de l'abeille ont été étudiés en utilisant des doses d'insecticides de 10 pmol/abeille équivalente à 5 ng de deltaméthrine. A la dose de 10 pmoles, la deltaméthrine, la cyperméthrine et la lambda-cyhalothrine induisent une hypothermie approximativement égale à  $-10^{\circ}\text{C}$  alors que l'hypothermie provoquée par l'alphanéthrine était de  $-7^{\circ}\text{C}$ , environ. A la même dose, le fluvalinate, la bifenthrine et l'esfenvalérate ne provoquaient pas d'hypothermie significative. Dans un deuxième temps, il a été montré que la deltaméthrine, associée au fongicide prochloraze ou difénoconazole à la dose de 850 ng/abeille (dose n'induisant pas d'hypothermie), provoquait une hypothermie sévère à des doses qui n'avaient aucun effet significatif sur la thermorégulation quand elle était utilisée seule.

En ce qui concerne des invertébrés tels que les lombriciens, les épreuves toxicologiques sont souvent limitées à l'étude de la mortalité à court et à moyen termes ou aux effets des toxiques sur la reproduction. La difficulté des travaux sur les effets comportementaux des toxiques est due à l'impossibilité d'observer directement des vers dans des réseaux souterrains à 3 dimensions. Les techniques de tomographie ou de traçage au moyen d'éléments radioactifs offrent des possibilités encore inexploitées en matière de toxicité au niveau sublétales.

**BIOMARQUEURS CHEZ LES INVERTÉBRÉS  
EVALUATION DES EFFETS DES XÉNOBIOTIQUES SUR LES POPULATIONS À  
PARTIR DE VARIABLES BIOCHIMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES MESURÉES  
AU NIVEAU DES INDIVIDUS**

LAGADIC Laurent

*Equipe d'Ecotoxicologie Aquatique, INRA, Station Commune de Recherche en  
Ichtyophysiologie, Biodiversité et Environnement (SCRIBE), Campus de Beaulieu,  
35042 Rennes cedex*

Les invertébrés offrent de nombreux avantages pour les mesures *in situ* de biomarqueurs. Leur capacité à coloniser des compartiments très différents des écosystèmes terrestres et aquatiques résulte principalement du développement de diverses stratégies d'exploitation des ressources et d'un important potentiel biotique lié, chez la plupart des espèces, à une croissance rapide et à un taux élevé de reproduction. En raison de leur position à différents niveaux des réseaux trophiques, les invertébrés remplissent des fonctions-clefs dans les écosystèmes et, lorsqu'ils sont affectés par des xénobiotiques, des perturbations importantes peuvent se produire dans la structure des communautés et le fonctionnement des écosystèmes. La taille généralement réduite des individus et la difficulté de transposition des effets observés aux vertébrés apparaissent parfois comme des limites à l'utilisation des invertébrés pour évaluer l'impact des substances chimiques sur la santé humaine. En revanche, les invertébrés présentent un réel potentiel pour l'évaluation du risque des polluants au niveau de l'écosystème.

L'adaptabilité est vraisemblablement une caractéristique biologique essentielle chez les invertébrés. Elle se traduit notamment par des variations moléculaires qui permettent aux individus de se maintenir dans des conditions de milieux relativement dégradées, où la pression de sélection des polluants peut être considérable. Dans de telles situations, les invertébrés représentent souvent le seul moyen de surveiller de la qualité de l'environnement et d'évaluer les effets des contaminants sur les systèmes biologiques animaux.

Les biomarqueurs mesurables chez les invertébrés permettent un diagnostic des effets à long terme des substances chimiques. Le développement de la résistance aux xénobiotiques, les adaptations physiologiques impliquant une réallocation de l'énergie métabolique, l'apparition d'anomalies morphologiques ou anatomiques sont autant de situations dans lesquelles les modifications induites par l'exposition à long terme des individus peuvent avoir des conséquences sur la structure et la dynamique des populations. Les biomarqueurs mesurés au niveau des individus peuvent alors être mis en relation avec des changements populationnels à partir desquels peuvent être évaluées des conséquences au niveau de la structure des communautés et du fonctionnement de l'écosystème. Une telle approche peut être utilisée pour classer les zones polluées selon leur niveau de dégradation, de façon à identifier les cas où des mesures de restauration doivent être mises en place prioritairement.

Les mêmes biomarqueurs peuvent être utilisés comme indicateurs précoces de l'amélioration de la qualité des milieux en cours de restauration. Ainsi, par exemple, des biomarqueurs enzymatiques peuvent indiquer une diminution de la résistance aux xénobiotiques au sein des populations lorsque décroît la pression de sélection sur les individus. De la même manière, des changements de l'allocation énergétique, évalués à partir de mesures individuelles de croissance et de reproduction, peuvent traduire une amélioration des conditions environnementales, avec des conséquences bénéfiques sur la dynamique des populations.

Les mesures de biomarqueurs chez les invertébrés peuvent fournir des informations essentielles à la fois sur l'impact écologique à long terme des contaminations chimiques (approche diagnostique) et sur les conditions de restauration biologique des écosystèmes affectés (approche prédictive). La fiabilité de ces deux approches repose cependant sur un choix pertinent des espèces d'invertébrés et sur la possibilité d'établir des relations mécanistiques entre paramètres mesurés à différents niveaux d'organisation biologique.

## UTILISATION DE MÉSOCOSMES EN ÉCOTOXICOLOGIE EXPÉRIMENTALE

CAQUET Thierry

*Équipe Écotoxicologie Aquatique, INRA, Station Commune de Recherche en Ichtyophysiologie, Biodiversité et Environnement (SCRIBE), Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex.*

Les écosystèmes expérimentaux peuvent fournir des informations pertinentes pour l'évaluation du devenir et des effets des produits chimiques dans les écosystèmes aquatiques. Parmi les différents outils disponibles, les mésocosmes sont des écosystèmes artificiels conçus spécifiquement pour suivre le devenir et les effets de produits chimiques à différents niveaux d'organisation biologique grâce à la mesure de variables qualitatives et/ou quantitatives. En particulier, ils offrent l'opportunité d'identifier simultanément les effets directs et indirects de toxiques et de comparer la sensibilité des animaux de laboratoire à celle des animaux du milieu naturel. De plus, les phénomènes qui réduisent ou augmentent la biodisponibilité des contaminants peuvent être pris en compte dans le cadre des études réalisées dans de tels dispositifs. La plateforme expérimentale de l'INRA, située le campus de l'École Nationale Supérieure d'Agronomie de Rennes comporte 38 mésocosmes lentique de taille et de forme différentes destinés à ce type d'études.

Au cours de cette communication, le point est fait sur différents aspects inhérents à la conception et à la mise en oeuvre de tels dispositifs en écotoxicologie : taille, forme, matériaux utilisés, constitution initiale, organismes, protocoles d'exposition, paramètres étudiés, etc.

Par ailleurs, les perspectives de l'approche expérimentale en mésocosmes dans le cadre de l'évaluation du risque présenté par les substances chimiques pour les milieux aquatiques sont abordées dans le contexte de l'évolution actuelle des procédures réglementaires.

## INTERETS D'UNE APPROCHE ECOGENOTOXICOLOGIQUE

DEVAUX Alain

*Equipe d'Ecotoxicologie Aquatique INRA, SCRIBE, Campus de Beaulieu 35042 Rennes  
Cedex et Laboratoire des Sciences de l'Environnement, ENTPE, rue Maurice Audin 69518  
Vaulx en Velin Cedex*

La nécessité d'évaluer le niveau de contamination des écosystèmes aquatiques et l'atteinte de leur biocénose par les polluants anthropiques a justifié le développement de différentes approches visant à connaître l'impact chimique et biologique de ces polluants.

Parmi ces approches biologiques, le suivi de biomarqueurs a connu un essor important et a apporté des informations dans la connaissance, entre autres, des mécanismes d'action des xénobiotiques par l'analyse de la réponse des organismes exposés. Ces biomarqueurs présentent souvent l'avantage de répondre précocément et parfois de manière spécifique à un état de pollution mais ils ne renseignent pas ou peu sur les risques pouvant exister à un niveau supraorganismique. A ce titre, le choix de l'étude de marqueurs de génotoxicité peut permettre d'établir des liens entre les atteintes au niveau de l'individu et les désordres ultérieurs observés au niveau populationnel, du fait notamment du rôle central du génome dans la transmission de ces effets.

L'étude d'événements cellulaires à forte probabilité d'apparition comme les cassures simple et double brins d'ADN dans le cas de l'exposition à des polluants majeurs des écosystèmes aquatiques (métaux lourds, HAPs, pesticides) nous a permis de mieux cerner les paramètres susceptibles de moduler la réponse génotoxique dans le cas d'expérimentations contrôlées, ainsi que d'évaluer le niveau de dommages chez des populations de poissons in situ. Cette première étape nous amène à une réflexion "écogénotoxicologique" visant à établir une stratégie scientifique permettant de répondre à la question de la mesure de l'impact des polluants aquatiques à un niveau écologique pertinent comme celui de la population.

Le champ de l'écogénotoxicologie inclut a priori l'étude d'altérations génétiques qui peuvent être somatiques ou héréditaires. Alors que les altérations somatiques sont alors dues à des interactions directes entre le génotoxique et l'ADN, les effets héréditaires peuvent également résulter de processus stochastiques dont l'origine n'est pas forcément de nature génotoxique. A ce titre, le choix d'examiner l'impact des polluants au niveau somatique ou germinale prend toute son importance si l'on considère la pérennité du message toxique dans les populations exposées.

Dans un contexte plus large il y a lieu de souligner le peu de recherches pluridisciplinaires actuelles en écotoxicologie aquatique permettant de relier l'évaluation de dommages primaires, en particulier génotoxiques, à des modifications génétiques populationnelles. Les études du polymorphisme de l'ADN ou de marqueurs enzymatiques neutres au niveau de populations sauvages devraient pouvoir être efficacement complétées par celles impliquant des loci codant pour des biomarqueurs fonctionnels tels que les enzymes de réparation de l'ADN ou celles impliquées dans la détoxification des xénobiotiques. Cette approche menée parallèlement au suivi de marqueurs de génotoxicité pourraient améliorer notre connaissance des conséquences potentielles de l'action des polluants sur les populations et notre compréhension des processus d'adaptation de ce niveau d'organisation élevé à un environnement pollué.

## IMPACT DES POLLUANTS SUR LA FONCTION OSMOREGULATION CHEZ LES POISSONS

PRUNET Patrick et LEGUEN Isabelle

*INRA/SCRIBE, Equipe Physiologie du Stress et de l'Adaptation, campus de Beaulieu,  
35042 Rennes Cedex.*

De part leurs conditions de vie en milieu aquatique, les poissons sont étroitement dépendants, pour leur homéostasie, des caractéristiques physico-chimiques du milieu aquatique d'où ils extraient l'oxygène et les ions. Les milieux aquatiques d'eau douce étant très variables dans leur composition chimique, le poisson doit obligatoirement développer des mécanismes adaptatifs au niveau des épithéliums échangeurs (branchies, intestin, rein principalement).

Les branchies constitue un organe multifonctionnel directement exposé au milieu aquatique externe. Au niveau de l'épithélium branchial se déroulent les échanges gazeux (fonction respiration) mais aussi les échanges d'eau et d'ions (fonctions osmorégulation, régulation de la balance acide/base, excrétion). Le bon fonctionnement de ces échanges est primordial pour l'homéostasie du poisson et sa survie. La dégradation de la qualité de l'eau est susceptible de perturber ces mécanismes physiologiques. Ainsi, les branchies sont un site important d'expression de la toxicité des métaux lourds. Enfin, il ne faut pas négliger ces épithéliums en temps que voie d'entrée des xénobiotiques et dans une certaine mesure, un lieu de métabolisation de ces molécules.

Dans un contexte de recherche de biomarqueurs destinés à évaluer la santé des individus, nous nous intéressons aux effets de diverses molécules polluantes sur les mécanismes osmorégulateurs branchiaux. L'impact de ces molécules sera aussi évaluée au niveau de l'osmorégulation du poisson, fonction physiologique qui conditionne le devenir de l'individu. L'apport des travaux réalisés dans l'équipe dans l'étude de l'impact des xénobiotiques sur les organismes aquatiques sera illustré à travers 3 projets scientifiques auxquels nous participons :

- Impact physique et chimique des sédiments sur la qualité de l'eau interstitielle et la survie embryo-larvaire de la truite fario (coll. INRA/Sciences du Sol et INRA/Écologie Aquatique).
- Diagnostic en écotoxicologie: approches cellulaires pour développer des biomarqueurs d'évaluation d'effets précoce et subléthaux (contrat DG XII).
- Effets biologiques des pesticides sur les organismes aquatiques : recherche et validation de biomarqueurs (programme PNETOX).

## LE POISSON, CIBLE ET RÉVÉLATEUR DE LA POLLUTION CHIMIQUE

MONOD Gilles

*INRA-SCRIBE, Équipe Écotoxicologie Aquatique, campus de Beaulieu,  
25042 Rennes Cedex*

Le poisson joue un rôle important dans la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques aquatiques. De plus, des intérêts socio-économiques non négligeables en dépendent (pêche de loisir et professionnelle). Les procédures réglementaires d'évaluation de l'écotoxicité des produits chimiques lui accordent donc un intérêt particulier.

Le poisson est une cible obligée des xénobiotiques qui contaminent l'environnement aquatique. L'absorption des polluants peut s'opérer via la filtration branchiale de l'eau et l'ingestion de proies contaminées. L'habitat du poisson, les caractéristiques de son cycle vital, son régime alimentaire, sont autant de classes de facteurs susceptibles d'influencer sur la pression de contamination s'exerçant sur lui.

Après leur pénétration dans l'organisme, les polluants se distribuent le plus souvent de façon hétérogène entre les différents tissus, et peuvent éventuellement s'accumuler. La bioaccumulation des xénobiotiques par le poisson peut permettre de proposer une alternative à l'analyse d'échantillons d'eau dont le niveau de contamination est souvent très bas. Le poisson sert alors de révélateur de contamination du milieu. Cependant, bien que la bioaccumulation soit un des critères sur lequel se fonde l'évaluation de l'écotoxicité d'un xénobiotique, l'absence de bioaccumulation ne permet pas de conclure à l'innocuité d'un composé. Il est donc essentiel de pouvoir caractériser les effets biologiques susceptibles de découler d'une exposition.

Le poisson, au travers des réponses biologiques qu'il exprime vis-à-vis des xénobiotiques qu'il absorbe, peut être un révélateur de leur écotoxicité. L'évaluation de la toxicité létale (qui parle d'elle même !) repose sur l'application d'essais normalisés et fait partie intégrante des procédures d'évaluation réglementaires. A l'inverse, l'évaluation de la toxicité sublétales relève encore largement de travaux originaux et la réglementation est très peu discriminante à ce sujet. Pourtant, l'implication écotoxicologique de ce type de toxicité est potentiellement très importante. Elle s'intéresse en effet aux conséquences pour la dynamique des populations et des peuplements, des modifications/altérations des performances individuelles par les polluants. La connaissance du mode d'action des polluants est déterminante (caractérisation de biomarqueurs) mais cependant insuffisante pour permettre de rendre compte de la complexité des processus mis en jeu pour que l'interaction initiale entre le polluant et sa cible biochimique dégénère en une altération des niveaux d'organisation supérieurs (population, peuplement). L'étude des conditions de propagation de l'information toxicologique apparaît ici comme une problématique centrale. Mais la difficulté de travailler au niveau des populations et des peuplements est une donnée dont toute stratégie d'évaluation du risque écotoxicologique vis-à-vis du poisson doit tenir compte.

## INTERET DES ETUDES DE METABOLISME DANS L'EVALUATION DU RISQUE ECOTOXICOLOGIQUE

CRAVEDI Jean-Pierre

*INRA, Laboratoire des Xénobiotiques, 180 Chemin de Tournefeuille, BP3, 31931  
Toulouse Cédex 9.*

La transformation des xénobiotiques par les organismes vivants d'un écosystème résulte à la fois de la biodégradation (faisant référence à l'action des microorganismes) et de la biotransformation (action de la faune et la flore). La biotransformation des composés chimiques qui fait intervenir plusieurs systèmes enzymatiques n'est qu'une composante du processus de métabolisation dans lequel interviennent les phénomènes d'absorption, d'accumulation et d'élimination.

Cette présentation a pour but d'appréhender les multiples aspects du métabolisme des contaminants chez différentes espèces en démontrant qu'une bonne connaissance des mécanismes de passage membranaire, de distribution tissulaire, de bioactivation et d'excrétion pour chacun des organismes appartenant à la chaîne trophique aquatique ou terrestre est essentielle dans toute tentative d'évaluation du risque écotoxicologique.

Pour illustrer notre propos, nous avons été amenés à choisir quelques exemples parmi les principaux contaminants de l'environnement tels que les métaux, les pesticides, les hydrocarbures ou les PCB.

L'accent est mis sur les étapes de biotransformation des xénobiotiques en raison du rôle qu'elles peuvent avoir dans l'activation biologique des contaminants et de ce fait dans l'impact des composés chimiques sur les individus, les populations et les écosystèmes. En effet, si la transformation biochimique des polluants par les systèmes enzymatiques appropriés (e.g. monooxygénases à cytochromes P450, transférases, etc...) a généralement pour conséquence de réduire la toxicité de la substance exogène à l'encontre de l'organisme contaminé et de permettre son élimination, il peut arriver que les métabolites produits soient plus réactifs que le composé initial. L'activation métabolique de nombreux composés mutagènes ou cancérigènes provient par exemple dans bien des cas de la formation d'époxydes ou d'autres entités réactives capables de se lier de façon covalente aux protéines ou aux acides nucléiques. Il en résulte une atteinte de différentes cibles biologiques (cellulaires, fonctionnelles) chez l'individu responsable de la biotransformation, mais éventuellement chez ceux qui se situent en aval dans la chaîne alimentaire ou simplement qui appartiennent à la même niche écologique.

Par ailleurs l'exposition ponctuelle ou chronique des organismes aux polluants peuvent modifier les niveaux d'expression des enzymes de biotransformation ce qui aura pour conséquence dans certains cas une production accrue de métabolites électrophiles se traduisant au plan toxicologique par une atteinte plus sévère des individus et des populations.



## EVALUATION TOXICOLOGIQUE DES PESTICIDES *IN VITRO*

RAHMANI Roger et collaborateurs

*Laboratoire de Pharmaco-toxicologie cellulaire et Moléculaire  
Centre de Recherches INRA  
41, Bd du Cap, 06606, ANTIBES, cedex*

Depuis une cinquantaine d'années, l'usage des pesticides en agriculture s'est considérablement intensifié et les problèmes de résistance imposé le développement constant de nouvelles molécules. Près de 100000 tonnes de pesticides sont ainsi annuellement utilisés par l'agriculture française, posant d'importants problèmes écotoxicologiques et en terme de santé publique. Bien que les risques d'intoxication aiguë soient pour la plupart répertoriés, les conséquences liées à l'exposition chronique des consommateurs à des doses résiduelles de pesticides sont difficilement estimables. Ceci tient à la rareté des études épidémiologiques, mais aussi à l'absence de modèles biologiques et de tests toxicologiques extrapolables à l'homme. En effet, les données animales existantes (effets sur la reproduction, le développement, cancérogenèse...) sont délicates à interpréter, car le métabolisme des pesticides varie entre les espèces, et détermine souvent leur profil toxicologique.

Nous avons, dans ce contexte, voulu évaluer les effets biologiques de certaines molécules représentatives de grandes familles d'insecticides (organochlorés, organophosphorés, carbamates, pyréthriinoïdes, benzoylurées), au moyen de modèles cellulaires d'origine humaine (hépatocytes, kératinocytes, lignées...). Ces cellules sont en effet des cibles toxicologiques potentielles des pesticides et possèdent l'équipement enzymatique nécessaire à leur activation et/ou désactivation métabolique. Nos résultats indiquent que certaines de ces molécules provoquent des dysfonctionnements cellulaires et moléculaires significatifs: cytotoxicité, régulation positive ou négative de l'expression des Cytochromes P450 (CYP1A, 2B et 3A) et des Gluthation-transférases, activation de marqueurs de stress oxydatif (NfκB, c-fos, Hsp70...), action agoniste ou antagoniste vis à vis du récepteur Ah, génotoxicité... Ces effets varient entre les espèces, les individus et les types cellulaires, et semblent en partie liés à la métabolisation de ces molécules.

Nous présenterons des résultats dans ces différents domaines.

### Références de l'équipe sur le thème :

- Delescluse C *et al.*, Potential of parental and transfected human cell lines for assessing toxicological effects of xenobiotics. In "Advances in Molecular Toxicology" (Claude Reiss *et al.*, eds), V.S.P. Press, The Netherlands, Japan, 1998, 223-244.
- Delescluse *et al.*, Cytotoxic effects and induction of Cytochromes P450 1A1/2 by insecticides, in hepatic or epidermal cells : binding capability to the Ah receptor. *Toxicol Lett*, 1998, 96/97, 33-39.
- Ledirac *et al.*, Carbaryl induces CYP1A1 gene expression in HepG2 and HaCaT cells but is not a ligand of the human hepatic Ah receptor. *Toxicol Appl Pharm*, 1997, 144, 177-182.
- de Sousa *et al.*, Insecticides cytotoxicity and CYP1A1 induction in primary human and rat hepatocytes cultures. *Toxicol In Vitro*, 1997, 11, 451-457.

## ECOTOXICOLOGIE, EVALUATION DU RISQUE ET REGLEMENTATION DES PRODUITS.

RIVIERE Jean-Louis

*INRA-SSM, GMPV, route de St-Cyr, 78026 Versailles Cedex*

L'écotoxicologie, l'évaluation du risque et la réglementation des produits sont trois domaines d'activité différents, mais complémentaires. On traitera ici de l'évaluation du risque des pesticides, les principes n'étant pas fondamentalement différents pour les autres substances dangereuses. L'écotoxicologie est définie ici comme l'étude de systèmes biologiques plus ou moins complexes (depuis la macromolécule jusqu'aux écosystèmes) sous l'effet du stress chimique ; l'objectif est la compréhension de la structure, du fonctionnement et de l'évolution de ces systèmes modifiés. Cette démarche intellectuelle d'observation ou d'analyse de systèmes biologiques, est plus familière au chercheur biologiste que les considérations d'ordre réglementaire. Pourtant, en ayant montré que les pesticides sont toxiques pour l'environnement, les écotoxicologues sont à l'origine des textes législatifs actuels qui reconnaissent l'existence du danger et du risque des pesticides pour les organismes vivants et imposent une évaluation du risque. En matière de pesticides, la directive européenne 91/414 qui régit la mise sur le marché des substances phytopharmaceutiques fait état de cette préoccupation environnementale qui s'étend jusqu'aux écosystèmes.

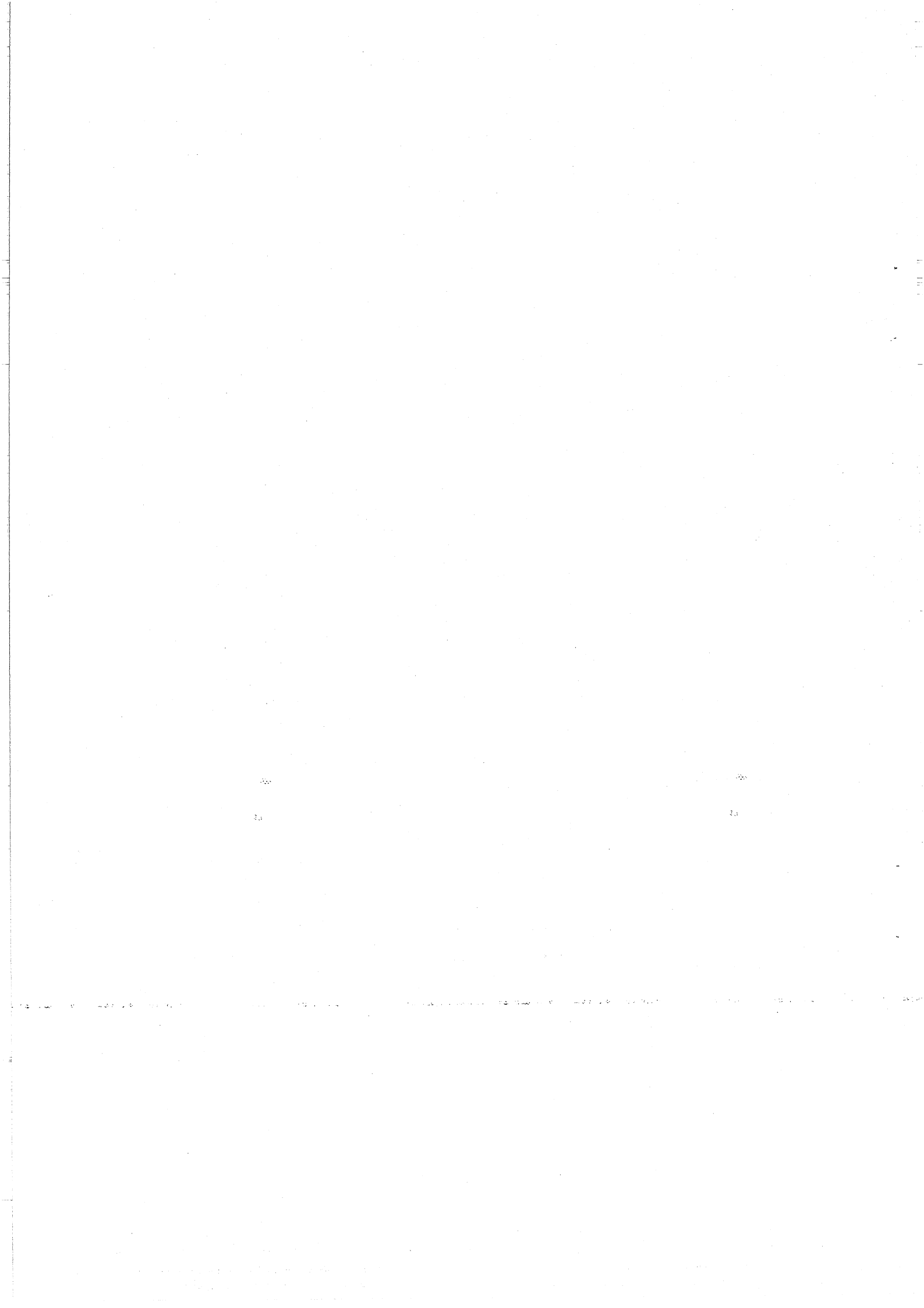
Il a donc été nécessaire d'élaborer une approche particulière, un système d'aide à la décision, *l'évaluation du risque*, à la frontière entre écotoxicologie et réglementation.

Un exemple typique est l'évaluation du risque de mortalité pour les poissons à partir du concept général : *risque = exposition x toxicité*. On caractérise d'abord l'exposition en calculant une concentration prévisible dans l'environnement aquatique. Ensuite, la toxicité (dose létale 50, dose sans effet,...) est caractérisée à partir d'essais écotoxicologiques. Le rapport toxicité/exposition définit le risque et les décisions seront prises en fonction de la valeur ce rapport et de seuils de sécurité appropriés.

L'évaluation des pesticides couvre un large éventail de groupes taxonomiques et fait appel à des techniques très variées. A court terme, certains aspects seront complétés et améliorés, par exemple, l'évaluation de la contamination aquatique, le risque pour les vertébrés terrestres, l'impact sur les arthropodes ou le transfert par voie aérienne. A long terme, l'évaluation du risque pour les écosystèmes devra être pris en considération par le biais de mésocosmes et/ou d'une combinaison d'essais monospécifiques. D'une manière très générale, il y a un besoin important de développer et de valider des modèles d'exposition et d'effet. Cependant, le système sera toujours imparfait : l'évaluateur ne décrit pas la réalité, mais construit un modèle prévisionnel, représentation plus ou moins fidèle de cette réalité.

# **SUBSTANCES ORGANIQUES**

**(Posters)**



## LIMITATIONS A L'UTILISATION DES BIOMARQUEURS CHEZ LES INVERTEBRES

(Poster)

AMICHOT Marcel, CUANY André, BRIDE Jean-Marc, TARÈS-AMICHOT Sophie,  
ARTHAUD Laury, BERGÉ Jean-Baptiste

*Résistance et Ecotoxicologie, SVE, 123 Bd. F. Meilland, BP2078, 06606 Antibes cedex*

L'utilisation de biomarqueurs chez les invertébrés tend à se généraliser. A travers notre expérience des cytochromes P450 de drosophile, nous illustrons ici les connaissances à acquérir pour fiabiliser leur utilisation.

L'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) est une activité couramment utilisée pour suivre l'expression de cytochromes P450 et détecter la présence de polluants (des hydrocarbures). Chez la souche CantonS, cette activité est totalement inhibée par le benzo-(a)-pyrène (qui l'induit fortement chez les vertébrés!) ou le prochloraz. Chez la souche RDDTR, le niveau d'activité EROD est 7 fois plus élevé et les inhibitions sont moins fortes (50 à 60% selon les molécules). Ces premiers résultats mettent en évidence une grande variabilité de l'activité EROD.

Nous avons montré qu'un cytochrome P450, CYP6A2, est incapable de catalyser la réaction EROD dans la souche CantonS tandis qu'il devient capable de le faire chez RDDTR (il porte alors 3 mutations). Ceci renforce la notion de variabilité de l'activité EROD mais montre aussi que dans certaines souches, il peut y avoir 2 cytochromes P450 capables d'assurer cette activité.

Enfin, les caractéristiques d'induction de l'expression de ce gène *Cyp6a2* sont variables selon les souches de drosophiles. De plus, des inducteurs classiques de la famille CYP1 des vertébrés (benzo-(a)-pyrène et 3-méthylcolanthrene) ont des effets adverses chez la drosophile

Ainsi, il apparaît qu'il est nécessaire de bien caractériser la variabilité du système considéré mais aussi le nombre de gène impliqués, leurs profils d'inductions pouvant être différents. Ces quelques résultats démontrent qu'une certaine prudence est nécessaire quant à l'exploitation de ce type de résultats chez les invertébrés. Ils illustrent parfaitement aussi l'intérêt de travailler avec des modèles biologiques dans le domaine de l'écotoxicologie

Alexandra Brun, Claire Conrad, Laurent Kubler et Cécile Sabourault participent ou ont participé à ces travaux dans le cadre d'une thèse.

## APPROCHE COMPORTEMENTALE ET ELECTROPHYSIOLOGIQUE DES EFFETS SUBLETAUX DE PESTICIDES CHEZ L'ABEILLE DOMESTIQUE *APIS MELLIFERA* L.

DECOURTYE Axel<sup>1</sup>, RENOU Michel<sup>2</sup>, PHAM-DELEGUE Minh-hà<sup>1</sup>,

*Laboratoire de Neurobiologie Comparée des Invertébrés, INRA, La Guyonnerie, BP 23,  
91440 Bures-sur-Yvette. <sup>2</sup>Laboratoire des Médiateurs Chimiques, INRA, Route de Saint-Cyr,  
78026 Versailles.*

### Introduction

L'importance des produits phytosanitaires dans les agrosystèmes n'est pas toujours compatible avec le rôle économique et écologique de l'abeille domestique. En effet les pesticides peuvent avoir des effets létaux ou sublétaux sur l'abeille. Contrairement aux effets létaux, qui font l'objet de tests toxicologiques avant la mise sur le marché des produits, il n'existe pas actuellement de moyens objectifs permettant de déceler les effets sublétaux des pesticides sur le comportement de l'abeille. Grâce à une procédure de conditionnement olfactif de type pavlovien, nous avons évalué les capacités d'apprentissage d'abeilles traitées avec des doses sublétales de trois pesticides : imidaclopride, endosulfan (insecticides) et prochloraze (fongicide).

### Matériel et méthodes

Des abeilles maintenues en cagette d'élevage sont traitées par l'administration orale ou topique des matières actives. Après 11 à 13 jours de traitements, les abeilles survivantes ont été testées grâce à la procédure de conditionnement olfactif du réflexe d'extension proboscis (langue de l'abeille). Nous nous sommes intéressés à l'éventuel impact des traitements sur l'acquisition des réponses conditionnées au cours de présentations renforcées odeur-nourriture et sur l'extinction de ces réponses au cours de présentations non renforcées de l'odeur apprise. Une approche électrophysiologique a permis d'étudier les modifications concomitantes de la sensibilité olfactive périphérique due à l'administration d'une dose sublétales d'endosulfan. Lors d'un stimulus olfactif, nous avons enregistré l'électroantennogramme (EAG) d'ouvrières intoxiquées sous forme d'une variation lente de potentiel entre l'apex et la base de l'antenne.

### Résultats

L'administration prolongée de doses sublétales d'imidaclopride et d'endosulfan diminue les capacités d'apprentissage olfactif des abeilles traitées. L'ingestion de doses sublétales de prochloraze n'a pas d'impact sur les capacités d'acquisition des réponses conditionnées mais elle semble diminuer la résistance à l'extinction des réponses. Le traitement à l'endosulfan induit une diminution de l'amplitude des EAG. Cette diminution de la sensibilité olfactive de l'antenne peut être un facteur expliquant les faibles performances d'apprentissage olfactif.

### Conclusion

Notre étude confirme de précédents travaux démontrant l'intérêt de la procédure de conditionnement olfactif de type pavlovien dans le but de dépister les effets sublétaux de certains produits agrochimiques chez l'abeille (Taylor *et al*, 1987 ; Mamood et Waller, 1990 ; Stone *et al*, 1997). Il est nécessaire de comparer l'étude des risques d'intoxication en laboratoire à l'étude de ces risques en semi-champ ou plein champ.

### Références

- Mamood A N et Waller G D (1990) *Physio. Entomol.* 15:55-60.  
Stone J C, Abramson C I, Price J M (1997) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58:177-183.  
Taylor K S, Waller G D, Crowder L A (1987) *Apido.* 18(3):243-252.

## MODELES D'ETUDE DE LA TOXICITE DES POLLUANTS ENVIRONNEMENTAUX AU MOYEN D'OUTILS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES

DE SOUSA Georges, RISSO Christine, VAN DECASTELLE Stéphanie,  
LEDIRAC Nathalie, DELESCLUSE Chantal, PRALAVORIO Madeleine, RAHMANI Roger

*Laboratoire de Pharmaco-toxicologie Cellulaire et Moléculaire  
Centre de Recherches INRA 41, Bd du Cap, 06606, ANTIBES, cedex*

La gestion et l'évaluation de l'impact toxicologique des polluants environnementaux issus de l'agriculture et de l'industrie représentent un problème majeur pour les pays industrialisés. Les méthodes de dosage physico-chimique existent et permettent la détermination de leurs concentrations dans l'eau et les sédiments. Néanmoins, ces données ne sont pas représentatives de l'effet biologique car elles ne tiennent pas compte de la synergie pouvant exister entre le grand nombre de produits présents. De ce fait le développement de tests *in vitro* permettant l'évaluation toxicologique globale d'échantillons prélevés sur le terrain déterminer un effet risque par la mise en évidence d'atteintes cellulaires. Cette façon simple et rapide, sans recourir à l'analyse chimique reste donc un objectif d'actualité en recherche pour la validation de ces modèles.

Nous travaillons, dans ce cadre, au développement de modèles *in vitro* et d'indicateurs biologiques prédictifs de l'exposition des organismes vertébrés (homme, rongeurs, poissons de mer ou de rivière) aux polluants organiques (HAPs, PCBs, pesticides, phtalates...). Notre démarche consiste à évaluer, au niveau cellulaire et moléculaire:

i/ leurs effets aigus (cytotoxicité, apoptose, génotoxicité) vis à vis de cellules hépatiques ou épidermiques, ii/ leurs effets chroniques sur l'expression de certains Cytochromes P450 (sous-familles 1A, 2B, 3A, 4A), Gluthation-transférases, ou de marqueurs de stress oxydatif (Gluthation-réductase ou peroxydase....), iii/ leurs interactions avec d'autres contaminants environnementaux (métaux lourds...). Ces modèles et ces tests sont en cours de validation par des études de terrain dans le cadre de programmes Nationaux (Environnement-Santé) ou Européens (INTERREG, BIOMAR), visant à proposer de bio-marqueurs plus spécifiques, pour prédire les risques toxicologiques des polluants chimiques, pour l'homme et son environnement. Des résultats seront présentés dans ces différents domaines.

### Références de l'équipe sur le thème

- RISSO C, et al., Effects of heavy metals on Cytochromes P450 expression in collagen gel cultures of black seabream hepatocytes. In "Biomarkers in Marine Ecosystems: a practical approach" (Garrigues Ph, Walter CH, Barth H, eds), Elsevier Science, The Netherlands, Japan, 1998, sous presse.
- de SOUSA G et al, Toxic effects of various types of antifouling paints in human and animal hepatic or epidermal cell lines. *Toxicol Lett*, 1998, 96/97, 41-46.
- DELESCLUSE C et al., Comparative study of CYP1A1 induction by 3-methylcholanthrene in various human hepatic and epidermal cell types. *Toxicol In Vitro*, 1997, 11:443-450.
- de SOUSA G. et al., A micro-fluorometric method for measuring Ethoxy-coumarine-O-Deethylase activity (ECOD) on individual *Drosophila melanogaster* abdomen : interest for screening resistance in insect populations. *Anal Biochem*, 1995, 229, 86-92.

**EVALUATION DES EFFETS DE POLLUANTS AQUATIQUES PAR LA MESURE  
DES DOMMAGES A L'ADN ET DE L'INDUCTION DU CYTOCHROME P4501A  
CHEZ LE CHEVAINE (LEUCISCUS CEPHALUS)\***

DEVAUX Alain<sup>1,3</sup>, FLAMMARION Patrick<sup>2</sup>, BERNARDON Virginie<sup>1</sup>,  
GARRIC Jeanne<sup>2</sup> et MONOD Gilles<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Laboratoire des Sciences de l'Environnement, ENTPE, rue Maurice Audin  
69518 Vaulx en Velin Cedex*

<sup>2</sup>*Laboratoire d'Ecotoxicologie, Cemagref, 3 bis quai Chauveau 69336 Lyon Cedex 9*

<sup>3</sup>*Equipe d'Ecotoxicologie Aquatique, INRA-SCRIBE, campus de Beaulieu  
35042 Rennes cedex*

Le but de ce travail était d'évaluer la réponse in situ de populations de poissons exposés à une pollution complexe grâce au suivi de deux biomarqueurs, l'induction de l'activité enzymatique 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase (EROD) et la formation de cassures de brins d'ADN. Des chevaines (*Leuciscus cephalus*) ont été capturés par pêche électrique au printemps et à l'automne à différentes stations dans le bassin hydrographique du Rhône. L'activité EROD catalysée par le cytochrome P4501A a été mesurée dans le foie et le niveau de dommages à l'ADN dans les érythrocytes des poissons en utilisant la technique récente de l'essai des comètes en conditions alcalines. La contamination chimique a été évaluée à la fois dans le muscle des poissons (PCBs, HAPs) et dans le sédiment collecté à chaque station (PCBs, PAHs, métaux lourds).

L'activité spécifique EROD comme les dommages à l'ADN sont significativement supérieurs chez les poissons provenant des zones les plus contaminées par rapport à la zone de référence.

Les concentrations plus importantes en PCB et en cadmium mesurées respectivement dans la chair des poissons et les sédiments des zones les plus contaminées peuvent expliquer en partie ces résultats. Une influence du sexe des poissons est clairement mise en évidence sur l'activité enzymatique EROD contrairement à ce qui est observé pour l'impact génotoxique pour lequel le statut hormonal ne semble pas jouer de rôle. Le maintien dans le temps de l'induction de l'activité EROD et des dommages à l'ADN a été étudié chez des poissons ramenés au laboratoire et élevés en eau exempte de pollution durant 2 mois. Une décroissance plus sensible du niveau de dommages à l'ADN comparée à celle de l'activité EROD après deux semaines peut être imputable au turnover cellulaire des érythrocytes ainsi qu'aux activités de réparation de l'ADN.

La complémentarité de réponse de ces 2 biomarqueurs souligne l'intérêt d'approches multiparamétriques pour évaluer l'impact des pollutions sur la faune aquatique.

\* Ces résultats ont été présentés lors du 9ème Symposium "Pollutant Responses in Marine Organisms", Bergen, Norvège, 1998



## INFLUENCE DE LA PRÉSENCE DE POISSONS (*CARASSIUS AURATUS*) SUR L'EFFET DU DIURON ET D'UN OCTYL-PHÉNOL POLYÉTHOXYLÉ SUR LA PRODUCTION PRIMAIRE PHYTOPLANCTONIQUE DANS DES MÉSOCOSMES LENTIQUES

DEYDIER-STEPHAN Laurence<sup>1</sup>, LACAZE Jean-Claude<sup>2</sup>, LE ROUZIC Bertrand<sup>3</sup>,  
BRIENT Luc<sup>3</sup>, CAQUET Thierry<sup>1</sup> et LAGADIC Laurent<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Equipe Ecotoxicologie Aquatique, INRA, Station Commune de Recherche en Ichtyophysiologie Biodiversité et Environnement (SCRIBE), Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex.

<sup>2</sup>Laboratoire de Physiologie, Museum National d'Histoire Naturelle, 12 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05

<sup>3</sup>Laboratoire Evolution des Systèmes Naturels et Modifiés, UMR 6553 "ECOBIO", Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, F-35042 Rennes Cedex

Les expérimentations sur les producteurs primaires microalgues et leurs relations avec les autres niveaux trophiques peuvent s'effectuer dans différents contextes expérimentaux. Pour cette étude, des mésocosmes lentiques, structures expérimentales équivalentes à des écosystèmes de types mares, ont été utilisés. Ces dispositifs ont été conçus afin de pouvoir caractériser simultanément les facteurs abiotiques et la structure de la biocénose algale ; ils ont aussi servi pour évaluer les effets de deux xénobiotiques, le diuron et un octylphénol polyéthoxylé, sur cette dernière.

Les mésocosmes, circulaires, de 5600 l, ont été mis en place en 1996 par l'équipe d'écotoxicologie aquatique de l'INRA de Rennes (SCRIBE), dans le cadre du programme GIP-Hydrosystèmes « Evaluation et sélection de descripteurs de la structure et du fonctionnement d'écosystèmes aquatiques expérimentaux destinés à des études écotoxicologiques ».

Les objectifs étaient

- (1) de déterminer les effets du stress induit par l'introduction de poissons (*Carassius auratus*) dans les mésocosmes et d'identifier les meilleurs descripteurs de ce stress,
- (2) de tester à court terme, l'impact de l'exposition *in situ* des peuplements phytoplanctoniques au diuron (herbicide) et à un octyl-phénol polyéthoxylé (détergent, adjuvant de pesticides) dans des mésocosmes avec et sans poissons.

Quatre mésocosmes (deux avec poissons, deux sans poisson) ont été utilisés pour cette étude entre Mars et Septembre 1997. L'état écologique de la biocénose a été suivie sur la base de mesures de paramètres physico-chimiques (température, pH, concentration en oxygène dissous, alcalinité, matières en suspension, nitrates, nitrites, ammonium, orthophosphates, silicates) et biologiques (biomasse phytoplanctonique, composition générique du peuplement). L'étude des effets des xénobiotiques a porté sur l'assimilation du <sup>14</sup>C (production primaire).

Cette étude a permis de mettre en évidence un effet de la biomanipulation (introduction des poissons) sur les mésocosmes. Parmi les paramètres physico-chimiques, les concentrations en matières en suspension (MES), en orthophosphates et en nitrates de même que le pH ont été influencés par la présence des poissons. En ce qui concerne les descripteurs biologiques, la production primaire a augmenté significativement dans les mésocosmes contenant les poissons, parallèlement, les indices de diversité (Margalef) et de dissimilarité (Bray-Curtis) ont montré une augmentation de la richesse générique dans ces systèmes et de la divergence entre les systèmes avec et sans poissons.

La présence des poissons a eu pour effet d'accélérer la maturation des mésocosmes par un processus classique d'eutrophisation.

Une inhibition significative de l'assimilation chlorophyllienne par les deux xénobiotiques testées a été observée lors de chaque essai, mais une diminution de la sensibilité des peuplements phytoplanctoniques a été observée en été. Cette diminution était corrélée positivement à l'augmentation de la concentration en MES, à celle de la densité cellulaire algale, ainsi qu'à la production primaire.

Aucun effet de la présence des poissons sur la sensibilité des peuplement phytoplanctonique n'a été mis en évidence. Il est probable que l'évolution de la sensibilité des microalgues aux toxiques ait été liée, au moins en partie, à celle de la concentration en MES (effet sur la biodisponibilité des xénobiotiques) et à celle de l'abondance totale des microalgues. Par ailleurs, des changements de la composition taxonomique des peuplements phytoplanctoniques ont pu avoir un impact significatif sur cette évolution.

**LA GAMBUSIE (*GAMBUSIA AFFINIS*),  
UN POISSON MODÈLE EN ÉCOTOXICOLOGIE EXPÉRIMENTALE ?**

DREZE Vincent & MONOD Gilles

*INRA-SCRIBE, Equipe Ecotoxicologie Aquatique, campus de Beaulieu,  
25042 Rennes Cedex*

L'évaluation, en conditions expérimentales, de l'impact des xénobiotiques à différents niveaux d'organisation biologique (cellule, individu, population), chez une même espèce de poisson, n'est pas facilement réalisable. La gambusie (*Gambusia affinis*) dispose *a priori* d'un certain nombre d'atouts : petite taille, dimorphisme sexuel marqué, stade adulte atteint rapidement (2 mois), cycle sexuel court (1 mois) et pluriannuel, biotope naturel (eau calme peu profonde) pouvant être facilement reconstitué, élevage et reproduction contrôlée relativement aisés.

Les travaux actuellement réalisés concernent des expériences menées en laboratoire et en écosystèmes d'eau calme reconstitués (mésocosmes lenticques). L'objectif est d'évaluer l'intérêt de cette espèce vis-à-vis de l'étude de l'impact des xénobiotiques d'une part, sur les performances individuelles (études de laboratoire en aquarium), et, d'autre part, sur la dynamique de population (études en mésocosme).

En mésocosme lentique une étude menée sur une saison complète (de mars à décembre) a permis d'observer une corrélation entre la taille des populations (effectif, biomasse) et le potentiel reproducteur (nombre de géniteurs) initialement présent. Il est donc permis de penser qu'une altération du potentiel reproducteur par des xénobiotiques pourrait être visualisée en terme populationnel.

En laboratoire les premiers travaux ont consisté à étudier l'influence de xénobiotiques perturbateurs endocriniens sur la mise en place des capacités reproductives de la gambusie. Suite à une exposition d'individus juvéniles au 4-n-nonylphénol et la 17-alpha-éthynylœstradiol, une analyse fondée sur l'observation des caractères sexuels primaires (testicule, ovaire) et secondaires (nageoire anale) montre clairement un impact de xénobiotiques sur la différenciation sexuelle.

Ces premiers résultats permettent d'envisager l'étude de la traduction en terme populationnel (études en mésocosme) des altérations des performances reproductives individuelles mise en évidence en conditions contrôlées de laboratoire.

**INDUCTION DU CYTOCHROME P4501A CHEZ DES STADES  
EMBRYOLARVAIRES D'OMBLE CHEVALIER (*SALVELINUS ALPINUS* L.)  
INCUBÉS DANS DIFFÉRENTS AFFLUENTS DU LÉMAN\***

GILLET Ch. <sup>1</sup> & MONOD G. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> INRA, Station d'Hydrobiologie Lacustre, 74203 Thonon-les-Bains

<sup>2</sup> INRA-SCRIBE, Équipe Écotoxicologie Aquatique, campus de Beaulieu,  
35042 Rennes Cedex

Le niveau de cytochrome P4501A a été mesuré via une activité enzymatique spécifique, la 7-éthoxyrésorufine 0-dééthylase (EROD), chez des stades embryolarvaires d'omble chevalier (*Salvelinus alpinus* L.) incubés dans 8 affluents du Léman.

Après fécondation artificielle les oeufs ont été placés dans des incubateurs qui ont été transférés dans les sédiments des rivières étudiées. Deux mois plus tard l'activité EROD a été mesurée à partir des homogénats totaux des larves récupérées.

Les résultats montrent des variations significatives de l'activité EROD, avec un niveau particulièrement élevé dans une des rivières par rapport aux individus témoins incubés en pisciculture. Ces données suggèrent que l'élévation de l'activité EROD pourrait résulter d'une induction par des micropolluants de type PCBs, dioxine ou hydrocarbures polycycliques aromatiques présents dans la rivière en question. En effet ces micropolluants sont des inducteurs puissants du cytochrome P4501A. Des analyses chimiques seraient cependant nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Cette étude confirme l'intérêt de l'activité EROD comme biomarqueur et démontre que les stades embryolarvaires de salmonidés peuvent être utilisés *in situ* comme indicateurs biologiques de la contamination chimique du milieu.

\* Ces résultats ont été présentés lors du 9ème Symposium "Pollutant Responses In Marine Organisms - PRIMO -", Bergen, Norvège, 1998.

**IMPACT ÉCOTOXICOLOGIQUE DE LA DÉMOUSTICATION SUR  
LE LITTORAL MORBIHANNAIS : RÉPONSES DE BIOMARQUEURS  
CHEZ DEUX ESPÈCES DE MACROINVERTÉBRÉS NON-CIBLES,  
*CHIRONOMUS SALINARIUS* ET *NEREIS DIVERSICOLOR***

JUMEL Audrey & LAGADIC Laurent

*Equipe d'Ecotoxicologie Aquatique, INRA, Station Commune de Recherche en Ichthyophysiologie, Biodiversité et Environnement (SCRIBE), Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex*

Face aux nuisances causées par la présence de moustiques sur le littoral du Morbihan, le Conseil Général s'est proposé d'examiner les conditions de mise en place d'un programme de démoustication, confié à l'Entente Interdépartementale de Démoustication (E.I.D.) du Littoral Atlantique. L'E.I.D.-Atlantique a préconisé une méthode de lutte intégrée, associant lutte chimique par l'emploi du téméphos (Abate® 500e) et lutte biologique utilisant le *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) (Vectobac® 12AS). Parallèlement, le Conseil Scientifique de l'Observatoire Départemental de l'Environnement du Morbihan (O.D.E.M.) a été chargé de la mise en place d'un programme de suivi de l'impact potentiel de la démoustication sur la faune non-cible des zones humides littorales du Morbihan. Ce suivi reposait sur une étude écotoxicologique basée sur l'utilisation de biomarqueurs.

L'objectif de l'étude a consisté à évaluer les effets des insecticides utilisés sur deux espèces de macroinvertébrés non-cibles, *Chironomus salinarius* et *Nereis diversicolor*, au travers des réponses de biomarqueurs enzymatiques, acétylcholinestérase (AChE), carboxylestérases (CbE) et  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. L'émergence a d'autre part été retenue comme biomarqueur physiologique lié au développement chez le chironome.

La démarche expérimentale a été basée sur la combinaison entre expérimentations en conditions contrôlées de laboratoire et étude sur le terrain, dans deux secteurs-pilotes choisis par le Conseil Général, en accord avec l'E.I.D.-Atlantique.

L'étude de laboratoire a permis d'analyser la spécificité des biomarqueurs vis-à-vis des insecticides utilisés en caractérisant, à partir de relations concentration-réponse établies après 24 heures et 3 jours d'exposition, les effets des produits sur les activités enzymatiques chez les deux espèces, ainsi que sur le phénomène d'émergence chez le chironome. Les concentrations testées ont été choisies dans une large gamme (0,25 à 0,0004 ppm) afin d'être représentatives des concentrations pouvant se retrouver dans le milieu lors des campagnes de démoustication. Chez *Chironomus salinarius*, le téméphos a eu un effet sur les trois biomarqueurs, AChE, CbE,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, et sur le taux d'émergence, alors que seule l'activité  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase a permis de mettre en évidence l'exposition des larves au *Bti*. De la même manière, les estérases (AChE et CbE) de la néréis ont été inhibées par le téméphos alors que l'impact du *Bti* est resté peu marqué.

Sur le terrain, cette batterie de biomarqueurs a été utilisée pour rendre compte d'un effet éventuel des insecticides sur la faune non-cible lors des campagnes de démoustication. Les biomarqueurs ont été mesurés 24 heures et 3 jours après les traitements lors de trois campagnes de démoustication entre Janvier et Juin 1998. Les activités AChE, CbE et  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase de *C. salinarius* ont été inhibées par le téméphos qui a d'autre part causé un retard de l'émergence chez les larves exposées. Contrairement aux résultats obtenus au laboratoire, le téméphos n'a pas eu d'effet marqué sur les biomarqueurs mesurés chez les néréis lors des campagnes de traitement sur le terrain. Les conditions de l'étude *in situ* n'ont pas permis d'interpréter les effets du *Bti* sur les biomarqueurs mesurés chez le chironome ; en revanche, chez la néréis, ce produit a été à l'origine d'une diminution de l'activité des CbE, mais n'a pas affecté significativement l'activité AChE.

En conclusion, cette étude a permis de définir les éléments principaux du protocole de suivi de l'impact de la démoustication dans les zones humides littorales du Morbihan. Pour ce type de milieu, *Chironomus salinarius* et *Nereis diversicolor* remplissent les critères essentiels des espèces-sentinelles. Les biomarqueurs utilisés sont particulièrement spécifiques du téméphos, dont l'impact sur les macroinvertébrés non-cibles peut être considéré comme non-négligeable dans les conditions où ont été effectués les traitements. Au travers des réponses des paramètres étudiés, le *Bti* semble présenter un risque beaucoup moins important pour ces animaux, mais le manque de spécificité des biomarqueurs vis-à-vis de ce produit n'autorise pas à conclure à sa totale innocuité pour l'environnement.

## IMPACT DU DNOC SUR LA DIVERSITE METABOLIQUE DE LA MICROFLORE D'UN SOL

SOULAS Guy, LORS Christine, LAGACHERIE Bernard

*INRA - CMSE Laboratoire de Microbiologie des Sols  
17, rue Sully 21034 Dijon Cedex*

Une communauté microbienne est une unité fonctionnelle qui peut être caractérisée par ses capacités métaboliques (Wünsche et al, 1995). Le niveau d'utilisation de différents substrats constitue une empreinte permettant de comparer les communautés de différents sols, ou leurs modifications de structure sous l'effet d'un stress. Garland & Mills (1991) ont proposé d'utiliser à cette fin les plaques Biolog®, habituellement destinées à l'identification de micro-organismes.

Nous avons utilisé cette procédure pour étudier l'impact de l'herbicide DNOC sur un sol agricole. Des plaques Biolog GN et GP ont été inoculées avec des suspensions du sol traité et non traité. Le développement de la coloration a été suivi dans chaque puits et les résultats interprétés par ACP, différentes procédures de calculs ayant été utilisées pour sélectionner les substrats discriminants.

Les modifications de l'empreinte métabolique mettent en évidence l'effet du xénobiotique et de sa dose d'application. Elles ne donnent toutefois aucune indication sur la nature de ces modifications.

Garland J.L., Mills A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2351-2359.

Wünsche L., Brüggeman L., Babel W., 1995. Determination of substrate utilization of soil microbial communities: an approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 17, 295-306.

## DEVENIR D'UN HERBICIDE, L'ACIDE 2,4-DICHLOROPHENOXY-ACETIQUE (2,4-D), DANS UNE PLANTE TRANSGENIQUE TOLERANTE, LE COTON.

LAURENT François, RATHAHAO Estelle et SCALLA René

INRA, Laboratoire des Xénobiotiques, BP 3, chemin de Tournefeuille,  
31931 Toulouse Cedex 9.

### Introduction

Afin d'optimiser les traitements herbicides dans les cultures, l'utilisation de souches de plantes tolérantes aux herbicides peut constituer une aide efficace car elle permet une gestion plus simple des traitements. Conférer cette tolérance, à des plantes cultivées importante agronomiquement, est une des contributions prometteuses de l'ingénierie génétique à l'agriculture. Une des principales stratégies consiste en l'introduction dans le génome de la plante, d'un gène codant pour un enzyme de dégradation d'herbicide. Ainsi le transfert d'un gène bactérien codant pour une dioxygénase spécifique de la dégradation de l'acide 2,4-dichlorophénoxy-acétique (un des herbicides les plus utilisés) dans du coton, plante très sensible à cet herbicide, conduit à l'obtention de plants de coton tolérants au 2,4-D. La monooxygénase bactérienne convertit le 2,4-D en 2,4-dichlorophénol (2,4-DCP). Dans les plantes, le DCP est habituellement un produit très mineur, ou même inexistant, du métabolisme du 2,4-D. De ce fait, son métabolisme est peu connu. Le 2,4-DCP est, comme les autres chlorophénols, potentiellement très toxique pour les animaux ou l'environnement. Aussi, l'étude du métabolisme du 2,4-D dans les plantes transformées est-elle nécessaire pour déterminer les résidus générés après traitement afin d'appréhender ce risque.

### Matériels et méthodes

Du 2,4-D radiomarké au carbone 14 a été appliqué sur des plants de coton transgéniques (*Gossypium hirsutum* cv Cooker 315) (Lyon et al, 1993). Après extraction, les métabolites solubles ont été identifiés sur la base de leurs caractéristiques chromatographiques en comparaison avec des dérivés standards, de leurs sensibilités à diverses hydrolyses chimiques ou enzymatiques et par confirmation de leur structure en spectrométrie de masse.

### Résultats

Dans les extraits cellulaires, outre du 2,4-D, quatre métabolites sont isolés. Parmi ceux-ci, il n'a pas été retrouvé de 2,4-DCP libre. Par contre, ces quatre métabolites sont identifiés comme des produits conjugués du 2,4-DCP. Après hydrolyse par l'enzyme bactérien du 2,4-D en 2,4-DCP, celui-ci est donc rapidement conjugué, principalement au glucose (2,4-DCP-glucoside). Le dérivé gluco-conjugué est ensuite converti soit en dérivé malonylé, 2,4-DCP-(6-O-malonyl)-glucoside, soit en dérivé sulfaté, 2,4-DCP-glucoside-6-sulfate, qui constituent les principaux résidus terminaux du 2,4-D dans cette plante.

La structure du 4ème dérivé qui représente *in fine* moins de 10 % des résidus, n'est pas élucidée à l'heure actuelle.

### Conclusion

L'introduction d'un gène bactérien de déalkylation du 2,4-D conduit à l'accumulation de conjugués du 2,4-DCP non-phytotoxiques et permet à cette souche de coton d'être tolérante à l'herbicide. Par contre, vis à vis de la toxicité animale potentielle, ces dérivés gluco-conjugués constituent plutôt une forme de stockage que de détoxification du 2,4-DCP car les conjugués glucosylés, malonylés ou non, peuvent être biodisponible dans le tractus digestifs des animaux.

### Référence

Lyon BR, Cousins YL, Llewellyn DL and Denis ES. *Transgenic Research*. 1993, 2, 162-169.

## COMPARATIVE EFFECTS OF ATRAZINE AND NICOSULFURON ON FRESHWATER MICROALGAE.

LEBOULANGER C., BERARD A., RIMET F. AND DE LACOTTE M.

*Station d'Hydrobiologie Lacustre, INRA, BP 511, 74203 Thonon les Bains Cedex. France.*

Physiological modifications (cell growth, chlorophyll *a* content, primary productivity) caused by various concentrations of atrazine and nicosulfuron were monitored in closed and continuous culture of *Chlorella vulgaris* (chlorophyta), *Navicula accommoda* (diatomophyta) and *Oscillatoria limnetica* (cyanophyta). The concentration at which algal growth rate was reduced two fold (EC50) was determined in the three species for both herbicides. Comparatively, the two were applied at 10  $\mu\text{g.l}^{-1}$  in microcosms experiments inoculated with natural phytoplankton from Lake Geneva. The relative abundances of major phytoplanktonic species were measured by algal cell count at the beginning and the end of each experiment.

As the two molecules atrazine and nicosulfuron have different targets in plant metabolism, respectively Photosystem II and acetolactate synthase, the expected effects were different. Generally, the cultured phytoplankton exhibited various sensitivities, depending on species, temperature or molecule employed. For example, the addition of 64  $\mu\text{g.l}^{-1}$  atrazine reduced the growth rate of *Navicula accomoda* more than the same amount of nicosulfuron. In the microcosms, the major taxa of natural phytoplanktonic samples exhibited various patterns from acute toxicity, to growth enhancement (Mann-Whitney test). For example, the diatoms inside the community were not affected by atrazine and nicosulfuron, except for *Stephanodiscus minutulus* which was sensitive to both, and *Asterionella formosa* which was sensitive only to nicosulfuron.

The specific physiology, and the relationships (competition for resources, allelopathic release...) among the phytoplanktonic communities have to be carefully considered when one tries to predict the extent of herbicide action on natural phytoplankton using toxicological tests. There is a need to test the toxic effect on various cultured strains, representative of most of the phylogenic composition of natural communities, to take into account the wide range of sensitivities and reaction to herbicide contamination. But this is not sufficient to give a solid frame when transposing the results to the field.

## POTENTIAL OF FILAMENTOUS FUNGI TO DEGRADE PAHS IN INDUSTRIAL POLLUTED SOILS

MOUGIN Christian<sup>1</sup>, RAMA-MERCIER Rachel<sup>2</sup>, SIGOILLOT Jean-Claude<sup>3</sup>,  
SOHIER Laurent<sup>2</sup>, ASTHER Marcel<sup>3</sup> AND CHAPLAIN Véronique<sup>1</sup>

*INRA, Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques, Route de Saint-Cyr, 78026  
Versailles Cedex, France*

<sup>2</sup>*KREBS SA, 1 Rue des Hérons, 78180 Montigny le Bretonneux, France*

<sup>3</sup>*INRA, Unité de Biotechnologie des Champignons Filamenteux, Faculté des Sciences de  
Luminy, Centre d'Enseignement Supérieur en Biotechnologies/ESIL, Parc Scientifique et  
Technologique, CP 925, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 09, France*

For many years, fungal technologies are under development for the treatment of industrial polluted soils. Many filamentous fungi have been shown to be useful to degrade recalcitrant xenobiotics, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). That efficiency enables to investigate their use for soil bioaugmentation process.

The aims of our studies are the development of tools to screen fungal efficiency for PAH transformation, to inoculate polluted soils with the fungi, and to assay PAH degradation in soils and liquid media in the presence of selected fungi.

The biodegradation of phenanthrene and benzo[a]pyrene in mixture was assayed in liquid and wet sand cultures in the presence of filamentous fungi. Wet sand, a triphasic screening system constituting a model of soil, decreased chemical volatilization and gave a more realistic image of fungal degradation than liquid cultures.

Solid lignocellulosic carriers have been developed from agricultural by-products in order to inoculate filamentous fungi in industrial PAH-polluted soils.

PAH transformation in soils was then measured in solid phase reactors inoculated with the carriers overgrown by the fungi.

Finally, fungal biomass, enzyme activity and PAH degradation was assessed in liquid reactors inoculated with the fungi to degrade liquid effluents.

### Références

- R. Rama-Mercier, C. Mougin, J.-C. Sigoillot, L. Sohier, V. Chaplain and M. Asther (1998) Wet sand cultures to screen filamentous fungi for the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnology Techniques* 12:725-728.
- R. Rama, C. Mougin, F.-D. Boyer, A. Kollmann, C. Malosse and J.-C. Sigoillot (1998) Biotransformation of benzo[a]pyrene in bench scale reactor using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Biotechnology Letters* 20:1101-1104.
- R. Rama, J.-C. Sigoillot, V. Chaplain, M. Asther and C. Mougin. A method for improving the propagation of filamentous fungi and the degradation of PAHs in manufactured plant site soils. Soumis à *Journal of Environmental Quality*.



## EXTRACTION LIQUIDE/SOLIDE EN TANDEM DES PRODUITS D'OZONATION DE L'ATRAZINE

NELIEU Sylvie, KERHOAS Lucien et EINHORN Jacques

*Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques, INRA,  
Route de Saint-Cyr, 78026 VERSAILLES Cedex*

L'atrazine est un pesticide de la famille des triazines qui constitue un problème important quant au respect des normes de qualité des eaux destinées à la consommation<sup>1</sup>. Il impose la mise en oeuvre de traitements spécifiques de potabilisation, tels que l'ozonation en présence de peroxyde d'hydrogène<sup>2</sup>. Pour des raisons de contrôle des traitements, et à terme de toxicologie, il importe de pouvoir identifier et/ou doser les produits ainsi obtenus. Leur faible concentration et la large gamme de polarité imposent en particulier une préconcentration par une procédure adaptée d'extraction liquide/solide.

L'étude indépendante des conditions de rétention et d'élution sur des phases de silice greffée (octadécyle C<sub>18</sub> et échangeuse de cations SCX) a permis d'optimiser l'extraction de l'atrazine et de différents sous-produits. Les composés peu polaires (le pesticide et les tous premiers stades de dégradation) ont pu être extraits avec de bons rendements et des facteurs de concentration élevés sur C<sub>18</sub>, la plupart des autres étant extraits de façon quantitative sur SCX. Un protocole utilisant successivement les deux phases est proposé pour séparer les produits en deux groupes de polarité différentes afin de favoriser l'adéquation des conditions d'analyse ultérieures par HPLC<sup>3</sup>.

L'application de ce protocole a permis l'identification de nombreux produits d'ozonation de l'atrazine dans l'eau. Les structures des composés, l'étude cinétique et l'ozonation de produits intermédiaires ont mis en évidence un schéma de dégradation<sup>4</sup>. L'efficacité de notre procédure d'extraction en tandem a été vérifiée par le bilan réalisé en présence d'atrazine marquée au <sup>14</sup>C sur le cycle.

### Références

- 1 - D.W. Kolpin, E.M. Thurman, D.A. Goolsby : *Environ. Sci. Technol.*, 30 (1996), 335-340.
- 2 - C.D. Adams, S.J. Randtke : *Environ. Sci. Technol.*, 26 (1992), 2218-2227.
- 3 - S. Néliu, M. Stobiecki, J. Einhorn : Soumis à *J. Chromatogr. A*.
- 4 - S. Néliu, M. Stobiecki, L. Kerhoas, J. Einhorn : Soumis à *Environ. Sci. Technol.*

## LES GLUTATHION TRANSFERASES COMME BIOMARQUEURS POTENTIELS DE L'EXPOSITION AUX XENOBIOTIQUES CHEZ LES VEGETAUX

PASCAL Sophie et SCALLA René

INRA, Laboratoire des Xénobiotiques, 180 Chemin de Tournefeuille, BP3,  
F-31931 Toulouse Cedex 9

GULLNER Gabor et KOMIVES Tamas

Plant Protection Institute, Hungarian Academy of Sciences, H-1525 Budapest POB 102

### Introduction

La métabolisation des xénobiotiques se divise généralement en trois phases selon la nature des réactions mises en jeu, activations, conjugaisons et compartimentation. Parmi les enzymes de métabolisation, les glutathion transférases (GSTs) constituent une superfamille d'enzymes ubiquitaires, de structure dimérique, qui catalysent la détoxification de composés électrophiles endogènes et exogènes par conjugaison avec le glutathion. Elles peuvent également jouer le rôle de transporteur ou de glutathion peroxydase. Les GSTs végétales ont été découvertes grâce à leur aptitude à détoxifier les herbicides. Leurs fonctions physiologiques restent encore très peu connues. Une propriété importante réside dans leur capacité à être induites par des stress environnementaux tels que la pollution (ozone), les produits agrochimiques (pesticides, antidotes d'herbicides), les attaques de pathogènes ou par des stress physiologiques (hormones). Les GSTs étant rapidement inductibles et leur activité facilement détectable avec le substrat universel 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB), ces enzymes pourraient être des biomarqueurs potentiels d'une pollution environnementale.

### Résultats et discussion

Dans ce cadre, nous avons testé l'effet de différents xénobiotiques, herbicides, antidotes d'herbicides et activateurs, sur l'activité GST(CDNB) mesurée dans des extraits bruts et sur la composition en sous-unités ou monomères des GSTs du blé tendre (*Triticum aestivum*).

Les antidotes d'herbicides entraînent une forte augmentation (2,5 à 3,8 fois) de l'activité spécifique GST(CDNB), par rapport à celle de plantes non traitées. Parmi les autres xénobiotiques testés, l'acifluorfen s'est révélé l'inducteur le plus efficace avec une augmentation de l'activité de 2,5 fois.

L'ensemble des GSTs du blé a ensuite été purifié par chromatographie d'affinité sur glutathion-agarose à partir des extraits bruts. Dans les conditions optimisées, 85 à 90% de l'activité GST(CDNB) est retenue puis éluée de la colonne par le glutathion. Après la chromatographie d'affinité, les monomères de GSTs ont été analysés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse. La CLHP permet de purifier les monomères à petite échelle et d'observer directement les effets des xénobiotiques sur la composition en sous-unités de GST. En particulier, le benzothiadiazole entraîne une forte induction de la sous-unité 5 dans les racines, tandis que l'acifluorfen provoque une induction importante des sous-unités 2 et 3 au niveau des tiges. Par la suite, les sous-unités peuvent être caractérisées par spectrométrie de masse (électrospray) et par la détermination de leur séquence N-terminale.

### Conclusion

Les méthodes mises au point permettent d'analyser les effets qualitatifs ou quantitatifs de xénobiotiques sur la composition en monomères de GST du blé. Ces méthodes pourraient être transposées à d'autres plantes et permettraient de valider les GSTs en tant que biomarqueurs de l'exposition aux polluants.

## UTILISATION DE LA TECHNIQUE T-RFLP POUR ANALYSER LA DIVERSITE MICROBIENNE DES SOLS.

ROUSSEAU S., ROUARD N., HARTMANN A., SOULAS G.

*INRA-CMSE, Laboratoire de microbiologie des sols, 17, rue de Sully, BV 1540, 21034 Dijon*

L'usage agricole des pesticides reste à l'ordre du jour et devrait se maintenir encore dans les années à venir, en raison de ses avantages techniques et économiques. Il représente cependant, pour la microflore du sol, une source potentielle d'agressions multiples et répétées. Or, les micro-organismes dont la diversité est un élément essentiel du fonctionnement du sol, jouent un rôle important dans la plupart des cycles biogéochimiques du sol. Plus que par leur capacité à réduire globalement la taille des communautés microbiennes, les pesticides, sont susceptibles d'altérer la structure et le fonctionnement de la communauté microbienne des sols. Dans le but d'évoluer vers une agriculture durable, il est important d'estimer l'évolution de la structure des communautés microbiennes dans un écosystème tel que le sol sous l'effet de polluants métalliques ou xénobiotiques. Ces connaissances permettraient aussi d'estimer la réversibilité de l'effet des stress naturels ou anthropiques sur la structure des populations.

C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons mis au point au cours de ce travail, une méthode d'analyse de la diversité microbienne en adaptant au sein d'un protocole expérimental, la technique T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism). Le principe de la technique est le suivant : les gènes codant pour les ARNr 16S sont amplifiés à l'aide d'amorces universelles, dont l'une est marquée par la digoxygénine. Ces amplifiats sont ensuite digérés, soumis à une électrophorèse, transférés sur une membrane puis révélés à l'aide d'un anticorps anti-digoxygénine. On obtient des profils PCR-T-RFLP permettant à priori d'associer à chaque souche bactérienne, un seul fragment de restriction marqué qui peut être utilisé comme « signature » de la présence d'un type bactérien dans un mélange. Cette technique appliquée à un mélange de souches pures peut conduire à sous estimer la diversité spécifique. Cependant, cette technique a été appliquée avec succès comme test global permettant de mesurer une évolution de la diversité spécifique sur des communautés microbiennes du sol ayant subi un stress chimique par exposition à un herbicide, le DNOC, à une concentration de 50 mg.kg<sup>-1</sup>. Nous avons pu démontrer que le DNOC modifiait la diversité microbienne et que cette modification persistait toujours après 30 jours de contact.

**MODIFICATION DE LA DIVERSITE DE LA MICROFLORE DANS UN SOL  
POLLUE PAR UN PESTICIDE : MISE EN EVIDENCE PAR L'ANALYSE DU  
POLYMORPHISME DE TAILLE DE LA REGION ITS (INTERGENE ADN<sub>r</sub> 16S-23S)**

HARTMANN A., LAPOSTOLLE V., GIRAUD J.J., CATROUX C.,  
ROUSSEAU S., FOURNIER J.C.

*INRA – CMSE Laboratoire de Microbiologie des Sols  
17 rue Sully, BV1540, 21034 Dijon CEDEX*

Les pratiques culturales ou les pollutions par des agents xénobiotiques peuvent induire une modification quantitative et qualitative de la microflore des sols. L'évolution de la diversité de la microflore du sol après un stress doit être étudiée ainsi que la réversibilité de cette évolution (possibilité de revenir à l'état antérieur, durée).

L'objectif de ce travail était de mettre en évidence l'évolution de la diversité microbienne dans un sol traité par le DNOC en utilisant deux approches : 1) isolement et caractérisation de souches, 2) enrichissement et caractérisation globale de la diversité par analyse du polymorphisme de taille des fragments ITS après PCR.

La région intergénique ADN<sub>r</sub> 16S-23S (ITS) présente un polymorphisme de taille chez les différents taxons bactériens (Gurtler, V. and V. A. Stanisich, 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiology - UK 142: 3-16). Nous avons utilisé cette méthode pour caractériser des souches isolées et des enrichissements de sol traité ou non par le DNOC. Un sol sableux (Auxonne) a été traité avec 50 mg/kg de DNOC puis incubé pendant 15 à 96 jours à 20°C. 90 souches ont été isolées de chaque sol sur milieu NA. Les enrichissements ont été réalisés sur milieu NB (10<sup>-4</sup> g de sol dans 5 ml de NB, incubation 24h). Les régions ITS ont été amplifiées par PCR en utilisant les amorces universelles dans les régions conservées des gènes ADN<sub>r</sub> 16S et 23S (Amorce 1523f 5' TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT 3' positions 1523 to 1541 de l'ARN<sub>r</sub> de *E. coli*; amorce 115r 5' CCG GGT TTC CCC ATT CGG 3' positions 115 à 132 de l'ARN<sub>r</sub> 23S de *E. coli*). La résistance au DNOC des souches isolées a été testée sur milieu NA enrichi avec 0 à 100 mg/l de DNOC

Les profils ITS des enrichissements présentent des différences majeures entre le sol traité et non traité (présence ou absence de bandes, variation d'intensité de certaines bandes), ce qui indique une altération de la structure de la communauté microbienne du sol. Ces profils complexes sont assez reproductibles (sur 3 échantillons de sol). L'analyse des souches isolées après 96 jours d'incubation montre une diminution du nombre de types ITS dans les souches issues du sol traité par rapport au sol témoin, ce qui semble indiquer une diminution de la diversité après traitement au DNOC. Les types de souche dominants dans le sol traité présente des bandes ITS de taille correspondante aux bandes dont l'intensité augmente fortement dans les enrichissements réalisés à partir du sol traité, ce qui indique une bonne corrélation entre les deux méthodes. Les souches isolées du sol traité présentent des niveaux de résistance au DNOC nettement plus élevés. Cette méthode présente donc un intérêt potentiel pour la mise en évidence de modification de la structure des communautés microbiennes après un stress.

## NOUVELLE APPROCHE METHODOLOGIQUE POUR CONFIRMER LA RELATION ENTRE LA BIODISPONIBILITE DES FONGICIDES ET LEURS EFFETS SUR LA MYCOFLORE TELLURIQUE

ROY Céline\*, MONTFORT Françoise\* et GAILLARDON Paul\*\*

\*INRA, U.R.I.G.C., BP 29, 35653 Le Rheu cedex

\*\* INRA Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles cedex

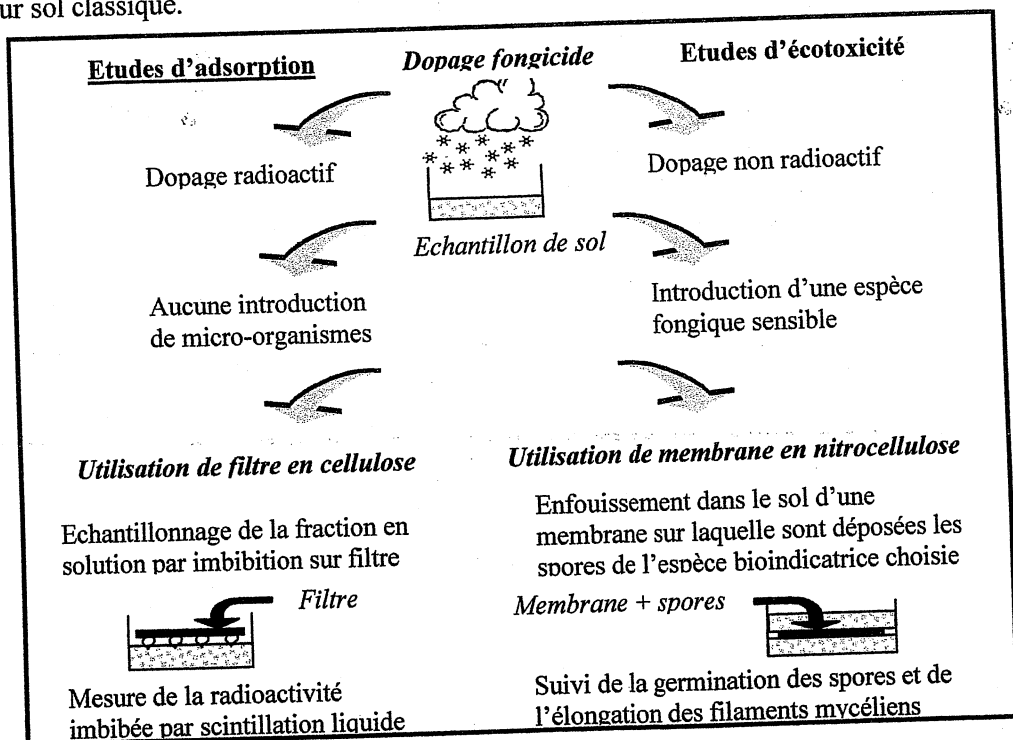
La prise de conscience des risques sanitaires et écologiques liés à l'utilisation à grande échelle des fongicides explique les interrogations de la recherche sur le devenir des résidus de ces substances dans le sol. Evaluer leur écotoxicité relève d'ailleurs de *plusieurs disciplines* : la chimie analytique quantifie le niveau de pollution de la matrice solide, la science du sol suit les mouvements et la dégradation de ces substances, la microbiologie caractérise leurs effets sur des populations fongiques. En s'appuyant sur le postulat suivant « seule la fraction de fongicide en solution (fraction biodisponible) est active sur les micro-organismes », la stratégie impose également des mesures de biodisponibilité. Etudier *la relation entre "quantité totale de résidus présents dans le sol" et "effets biologiques observés"* nécessite donc de rassembler et de confronter un ensemble de données multiples et variées.

La stratégie présente des limites lorsqu'elle repose sur des travaux monodisciplinaires réalisés indépendamment les uns des autres, et difficilement extrapolables aux écosystèmes complexes. Les expériences classiques d'adsorption sont également inadaptées à l'étude de paramètres biologiques, si bien que le postulat de départ "fraction en solution = fraction biodisponible" reste non vérifié.

*L'approche stratégique proposée* est schématisée Figure 1. Basée sur la mise au point d'une seule et même méthodologie pour les études d'adsorption de fongicides dans le sol et d'écotoxicité vis à vis des champignons telluriques, elle facilite l'exploitation de données multidisciplinaires. Simple, réalisée *in situ* à un instant t, elle permet l'étude de paramètres susceptibles d'intervenir sur l'ensemble des processus, en particulier...

- la nature et l'humidité du sol,
- la nature du fongicide,
- l'évolution dans le temps.

Enfin, une étude portant sur un substrat n'induisant aucune adsorption de fongicide (type sable) peut nous renseigner sur l'étroite concordance entre la fraction en solution et la fraction biodisponible, par comparaison avec l'étude sur sol classique.



**Figure 1** Approche méthodologique proposée, commune aux études d'adsorption et d'écotoxicité

## CARACTERISTIQUES PARTICULIERES de la TOXICITE de L'IMIDACLOPRIDE CHEZ L'ABEILLE

SUCHAIL Séverine, GUEZ David, BELZUNCES Luc P.

*I.N.R.A. – Laboratoire de Toxicologie Environnementale – Unité de Zoologie – Site Agroparc  
84914 Avignon Cedex 9*

L'imidaclopride, appartenant à la nouvelle famille des chloronicotinyles, est un insecticide systémique agissant sur de nombreux invertébrés tels que les insectes " suceurs " comme les thrips, les pucerons, les aphides et les insectes vivants dans le sol comme les termites. Contrairement aux insecticides actuellement utilisés tels que les organophosphates et les pyréthrénoïdes, cette substance active a une toxicité sélective avantageuse. Elle agit en effet préférentiellement comme agoniste sur le récepteur nicotinique à acétylcholine des insectes sans affecter les récepteurs correspondants des mammifères. L'imidaclopride constitue donc une matière active intéressante et innovante par son nouveau mode d'action.

La toxicité aiguë orale et de contact est étudiée à la fois chez *Apis mellifera mellifera* et chez *Apis mellifera caucasica*. Les symptômes neurotoxiques observés sur la plupart des abeilles lors de l'application de l'imidaclopride ne sont pas spécifiques et ressemblent à ceux observés avec d'autres substances neurotoxiques ayant une action sur le système nerveux.

La différence de mortalité à 24 h et à 48 h est plus prononcée après une application orale qu'une application topique de l'insecticide. Le profil de mortalité en fonction des doses croissantes de l'insecticide est particulier, avec la présence du pic à faibles doses d'imidaclopride. Ce pic de mortalité est plus marqué après application orale qu'après application topique du toxique. La cinétique de mortalité a été aussi observée. Chez *Apis m. mellifera*, à 200 ng/abeille, la mortalité est retardée et est plus faible que celle obtenue avec les doses de 5, 10 et 50 ng/abeille durant les 20 premières heures mais continue après 24 h. De la même façon, chez *Apis m. caucasica*, la mortalité retardée apparaît aussi à fortes doses. A la différence d'*Apis m. mellifera*, cette mortalité retardée est plus prononcée et augmente en fonction de la dose et pour toutes les doses testées.

Pour *Apis m. mellifera* et pour *Apis m. caucasica* les DL50 sont similaires et égales à environ 5 ng/abeille après application orale et à environ 25 ng/abeille après application topique. Ces valeurs de DL50 placent l'imidaclopride parmi les insecticides les plus toxiques.

## DEVENIR DU 4-n-NONYLPHENOL CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL (*Oncorhynchus mykiss*)

THIBAUT Rémi, DEBRAUWER Laurent, RAO Dinesh et CRAVEDI Jean-Pierre

*Laboratoire des Xénobiotiques, INRA, 31931 Toulouse Cedex 9.*

### Introduction

Les alkylphénols, dont le principal représentant est le nonylphénol, font partie des nombreux xénobiotiques perturbateurs du système endocrinien des vertébrés. Les nonylphénols sont utilisés comme antioxydants dans la fabrication de certains plastiques (PVC, polystyrènes) dont ils peuvent être relargués par simple contact avec des denrées alimentaires ou l'eau. Ils proviennent également de la biodégradation de détergents non-ioniques, les alkylphénols polyéthoxylates, au cours du traitement des eaux usées. Le nonylphénol est présent dans les eaux des rivières et les sédiments aquatiques et en raison de son fort caractère lipophile, il se bioaccumule chez les organismes aquatiques : macrophytes, invertébrés et poissons. Plusieurs études ont montré le pouvoir oestrogénique des alkylphénols chez les poissons, les oiseaux et les mammifères. Le nonylphénol inhibe la croissance testiculaire et induit une synthèse de vitellogénine chez la truite arc-en-ciel mâle. Chez le medaka, il peut entraîner le développement d'un ovo-testis et un changement de sexe dans la population mâle. Afin de mieux comprendre les effets du nonylphénol sur les poissons et son impact sur l'environnement aquatique, nous avons étudié son devenir métabolique chez la truite arc-en-ciel. Le nonylphénol, contaminant de l'environnement, est un mélange complexe d'isomères de position et de ramification de la chaîne alkyle dont l'analyse de produits métaboliques est probablement très complexe. Afin de simplifier cette analyse, nous avons synthétisé et utilisé comme composé pur le [<sup>3</sup>H]-4-n- nonylphénol.

### Résultats et discussion

Quarante-huit heures après administration *per os* d'une faible dose (6 µg/kg), 41,1 ; 7,6 et 7,2 % de la dose sont excrétés dans l'eau, l'urine et la bile alors que 46,5 % sont retenus dans les tissus du poisson. Pour la forte dose (25 mg/kg) ces valeurs atteignent 30,6 ; 3,0 ; 5,5 et 11,0 % respectivement. Les plus hautes concentrations de radioactivité ont été détectées dans la bile, le foie, les viscères et les reins. Les métabolites biliaires et urinaires ont été séparés par des systèmes radio-CLHP appropriés, collectés et analysés en spectrométrie de masse. Notre étude a montré que le nonylphénol peut être conjugué à l'acide glucuronique et excrété, dans la bile, en tant que tel, ou après différentes étapes d'oxydation de la chaîne alkyle. Des produits d'hydroxylation en position terminale (C9) ou subterminale (C8) ont été détectés dans la bile. Bile et urine contenaient également des acides carboxyliques. Ces résultats montrent que la chaîne alkyle est  $\alpha$ -oxydée en l'acide carboxylique correspondant puis subit une  $\omega$ -oxydation incomplète dont les intermédiaires à longue chaîne (C7, C5 et C3) sont excrétés sous forme de conjugués glucuronide dans la bile et ceux à courte chaîne (C3 et C1) en tant que tel dans l'urine.

### Perspectives

Afin de mieux connaître les mécanismes d'action du nonylphénol, l'évaluation de son effet sur les enzymes du métabolisme des stéroïdes et du potentiel oestrogénique de ses métabolites a été entreprise.

**ANALYSE MULTI-RESIDUS DE FONGICIDES IBS :  
OPTIMISATION PAR UN PLAN D'EXPERIENCES**

TREBAUL A., NELIEU S., ROY C. et EINHORN J.

*INRA, Unité de Phytopharmacie, Route de Saint Cyr, 78026 Versailles cedex*

Les fongicides IBS, Inhibiteurs de la Biosynthèse des Stérols, sont actuellement les plus répandus en protection des cultures céréalières. Un programme pluriannuel s'est déroulé de 1995 à 1997 ; effectué en plein champ, il a permis d'évaluer leur transfert dans le sol et dans les eaux (1). En complément à cette étude, des recherches sont actuellement menées de façon à évaluer leur effets non intentionnels sur la microflore du sol, d'où la nécessité de connaître les quantités de résidus présents dans le sol, à des niveaux très faibles.

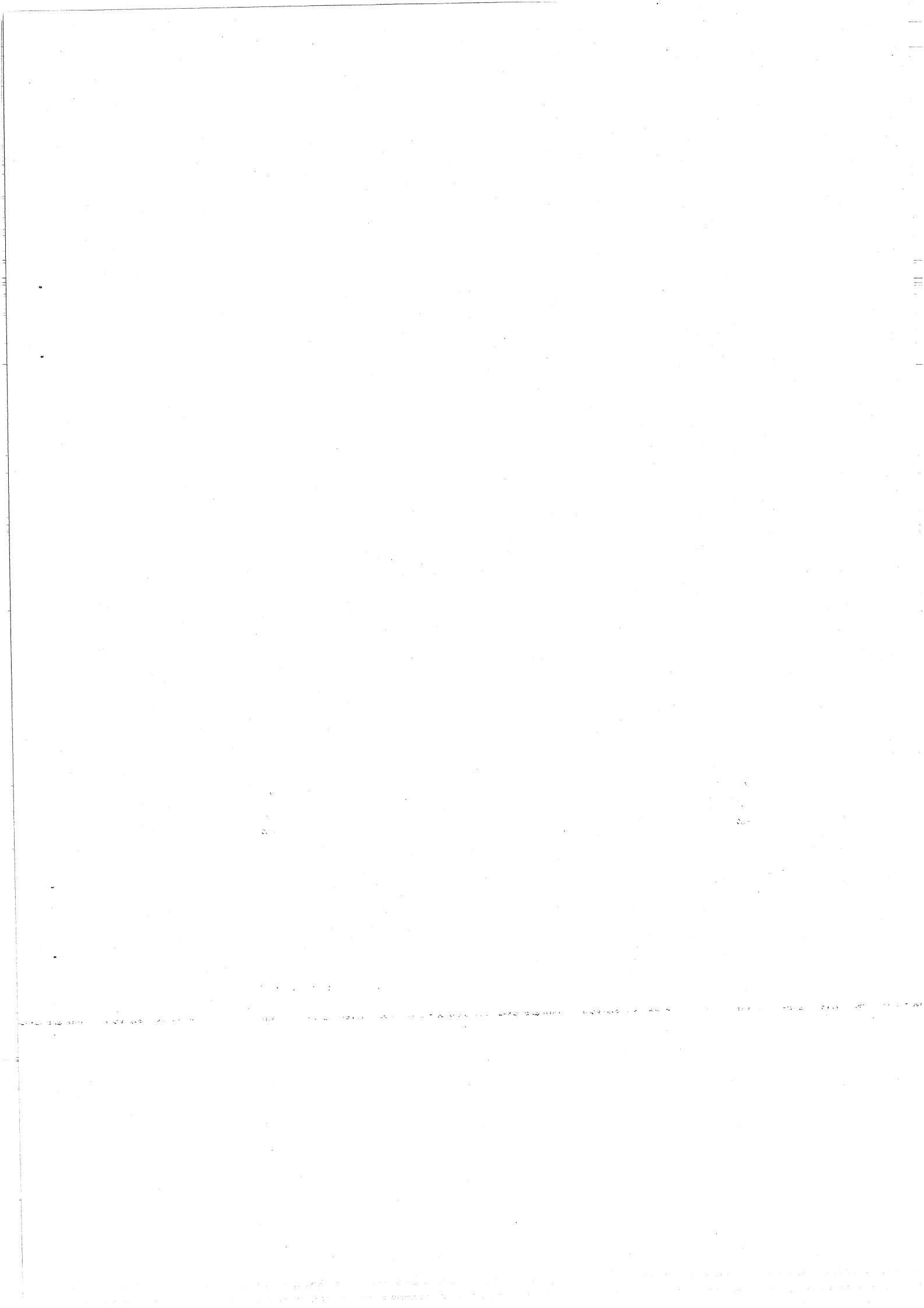
Dans ce contexte, une nouvelle approche analytique a été développée, au niveau du protocole d'extraction des résidus de pesticides dans le sol. Elle consiste premièrement en une étape d'extraction en milieu eau/méthanol assistée par micro-ondes et, d'une seconde étape de purification - concentration par extraction liquide/solide. Cette dernière présente une particularité puisque le milieu à extraire contient un pourcentage (à définir) de méthanol. Afin d'optimiser les conditions d'extraction liquide/solide, il s'est avéré intéressant de réaliser un plan d'expérience.

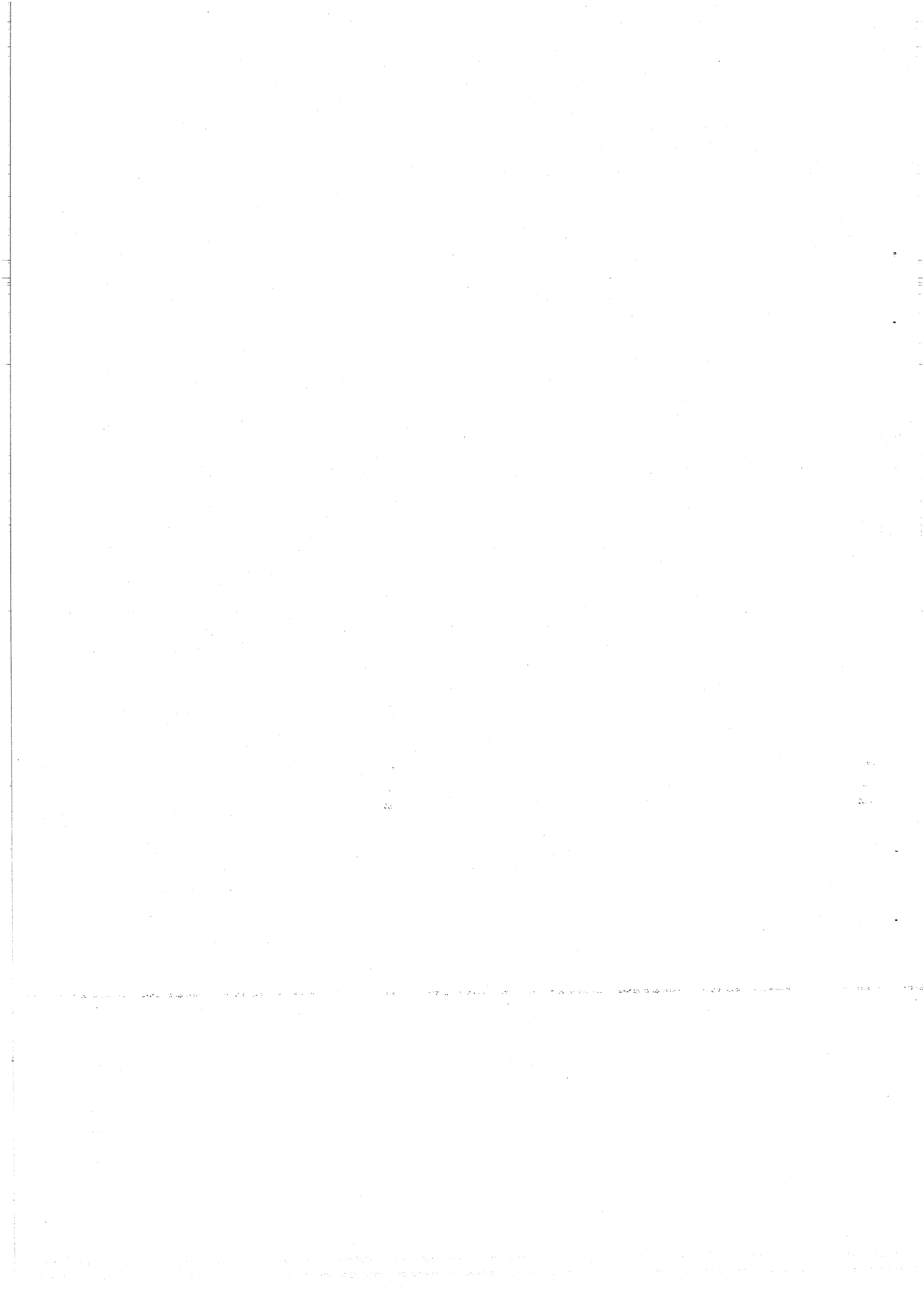
Quatre fongicides IBS, trois triazoles (Epoxyconazole, Flusilazole et Propiconazole) et une morpholine (Prochloraze) ont été analysés. Les extractions, effectuées sur cartouche C18, ont suivi un plan factoriel complet  $2^4$  à 2 niveaux, qui a permis d'étudier l'influence de 4 paramètres sur le rendement de l'extraction. Deux facteurs concernent directement la solution à extraire : sa concentration et sa teneur en méthanol. Les deux derniers paramètres se rapportent à la nature du solvant d'élution et à son acidité.

Dans les conditions retenues, un pourcentage élevé de méthanol dans la solution extraite n'influe pas sur la rétention des molécules. L'acidité du solvant d'élution et surtout sa nature sont des paramètres déterminants pour le prochloraze et les triazoles. Concernant ces fongicides, les rendements d'extraction permettent d'envisager une analyse multi - résidus.

(1) A. Trébaul, R. Guichon, F. Montfort, P. Gaillardon et J. Einhorn, *Actes du XXVII<sup>ème</sup> Congrès du Groupe Français des Pesticides*, 1997, 431-438.







## LISTE DES PARTICIPANTS (INRA)

| Nom et Prénom            | Laboratoire ou Equipe...                       | Centre         | DS     | Département |
|--------------------------|--|----------------|--------|-------------|
| Amichot Marcel           | Résistance et Ecotoxicologie                   | Antibes        | SPE    | EFA & PPV   |
| Balabane May             | Science du Sol                                 | Versailles     | EA     | EFA         |
| Barriuso Enrique         | Science du Sol et Hydrologie                   | Grignon        | EA     | EFA         |
| Belzunces Luc            | Toxicologie Environnementale                   | Avignon        | SPE    | EFA & PPV   |
| Bérard Annette           | Hydrobiologie Lacustre                         | Thonon         | HFS    | EFA + PPV   |
| Bergé Jean-Baptiste      | Biologie des Invertébrés                       | Antibes        | SPE    | EFA & PPV   |
| Berny Philippe           |  | Lyon           |        | ENVL        |
| Calleja Cécile           | Pharmacologie & Toxicologie                    | Toulouse       | PA     | PA          |
| Cambier Philippe         | Science du Sol                                 | Versailles     | EA     | EFA         |
| Capowiez Yvan            |  | Avignon        | SPE    | EFA & PPV   |
| Caquet Thierry           | Ecotoxicologie Aquatique                       | Rennes         | HFS    | EFA & PPV   |
| Chaplain Véronique       | Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques         | Versailles     | SPE    | EFA + PPV   |
| Cravedi JeanPierre       | Xénobiotiques                                  | Toulouse       | NASA   |             |
| Decourtye Axel           | Neurobiologie Comparée des Invertébrés         | Bures/Yvette   | SPE    | EFA & PPV   |
| De Sousa Georges         | Pharmaco-toxicologie Cellulaire et Moléculaire | Antibes        | SPE    | EFA & PPV   |
| Deydier-Stephan Laurence | Ecotoxicologie Aquatique                       | Rennes         | HFS    | EFA & PPV   |
| Devaux Alain             | Sciences de l'Environnement                    | Vaulx en Velin |        | ENTPE       |
| Druart JeanClaude        |  | Thonon         | HFS    | EFA + PPV   |
| Einhorn Jacques          | Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques         | Versailles     | SPE    | EFA + PPV   |
| Feder F.                 | Sol et Agronomie                               | Rennes         | EA     | EFA         |
| Garrec Jean-Pierre       | Pollution Atmosphérique                        | Nancy          | SPE    | EFA & PPV   |
| Gerdaux Daniel           |  | Thonon         | HFS    | EFA + PPV   |
| Gillet Christian         | Hydrobiologie Lacustre                         | Thonon         | HFS    | EFA + PPV   |
| Hinsinger Philippe       | Science du Sol - Rhizosphère                   | Montpellier    | EA     | EFA         |
| Humbert Jean-François    |  | Thonon         | HFS    | EFA + PPV   |
| Jaffrezic Anne           | Sol et Agronomie                               | Rennes         | EA     | EFA         |
| Jumel Audrey             | Ecotoxicologie Aquatique                       | Rennes         | HFS    | EFA & PPV   |
| Lagacherie Bernard       | Microbiologie des Sols                         | Dijon          | EA     | EFA         |
| Lagadic Laurent          | Ecotoxicologie Aquatique                       | Rennes         | HFS    | EFA + PPV   |
| Lamy Isabelle            | Science du Sol                                 | Versailles     | EA     | EFA         |
| Laurent François         | Xénobiotiques                                  | Toulouse       | SPE    | EFA + PPV   |
| Le Gac Florence          |  | Rennes         | SCRIBE |             |
| Leboulanger Christophe   | Hydrobiologie Lacustre                         | Thonon         | HFS    | EFA + PPV   |
| Leguen Isabelle          |  | Rennes         | HFS    | EFA + PPV   |
| Lichtfouse Eric          | Sols et Environnement                          | Nancy          | EA     | EFA         |
| Mench Michel             | Biogéochimie des Eléments                      | Bordeaux       | EA     | EFA         |
| Mocquot Bernard          | Trace dans les Agrosystèmes                    |                |        |             |
|                          | Biogéochimie des Eléments                      | Bordeaux       | EA     | EFA         |
|                          | Trace dans les Agrosystèmes                    |                |        |             |
| Molin Danièle            |  | Versailles     | SPE    | EFA + PPV   |
| Monod Gilles             | Ecotoxicologie Aquatique                       | Rennes         | HFS    | EFA + PPV   |
| Montfort Françoise       | U.R.I.G.C.                                     | Rennes         | SPE    | EFA & PPV   |
| Mougin Christian         | Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques         | Versailles     | SPE    | EFA + PPV   |
| Nélieu Sylvie            | Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques         | Versailles     | SPE    | EFA + PPV   |
| Pascal Sophie            | Xénobiotiques                                  | Toulouse       | SPE    | EFA + PPV   |
| Pelletier Jean           |  | Thonon         | HFS    | EFA + PPV   |
| Prunet Patrick           | Physiologie du Stress et de l'Adaptation       | Rennes         | HFS    | EFA + PPV   |

## LISTE DES PARTICIPANTS (INRA)

|                         |   |             |     |           |
|-------------------------|---|-------------|-----|-----------|
| Rahmani Roger           | Pharmaco-toxicologie<br>Cellulaire et Moléculaire | Antibes     | SPE | EFA & PPV |
| Rault-Leonardon Magalie |   | Avignon     | SPE | EFA & PPV |
| Renault Pierre          | Science du Sol                                    | Avignon     | EA  | EFA       |
| Rivière JeanLouis       | SSM   | Versailles  | SSM | EFA       |
| Rousseaux Sandrine      | Microbiologie des Sols                            | Dijon       | EA  | EFA       |
| Roy Céline              | U.R.I.G.C.  | Rennes      | SPE | EFA & PPV |
| Roy Claudie             |   | Versailles  | SPE | EFA + PPV |
| Seguin Florence         |   | Thonon      | HFS | EFA + PPV |
| Staunton Siobahn        | Science du Sol - Rhizosphère                      | Montpellier | EA  | EFA       |
| Stengel Pierre          |   | Avignon     | EA  |           |
| Suchail Séverine        | Toxicologie Environnementale                      | Avignon     | SPE | EFA & PPV |
| Thibaut Rémi            | Xénobiotiques                                     | Toulouse    |     |           |
| Toutant JeanPierre      |   | Montpellier | PA  | PA        |
| Trébaul Anne            | Phytopharmacie et Médiateurs<br>Chimiques         | Versailles  | SPE | EFA + PPV |
| Trolard Fabienne        | Sol et Agronomie                                  | Rennes      | EA  | EFA       |