



HAL
open science

Impact des produits de traitement du bois sur les amphipodes *Gammarus pulex* (L.) et *Gammarus fossarum* (K.) : approches chimiques, hydro-écologique et écotoxicologique

Olivier Adam

► To cite this version:

Olivier Adam. Impact des produits de traitement du bois sur les amphipodes *Gammarus pulex* (L.) et *Gammarus fossarum* (K.) : approches chimiques, hydro-écologique et écotoxicologique. Ecotoxicologie. Université de Franche-Comté (UFC), 2008. Français. NNT : . tel-02273297

HAL Id: tel-02273297

<https://univ-fcomte.hal.science/tel-02273297v1>

Submitted on 28 Aug 2019

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Année 2008

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
U.F.R. DES SCIENCES ET TECHNIQUES
Laboratoire de Chrono-Environnement (UMR 6249 UFC/CNRS usc INRA)

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
Spécialité : Sciences de la vie
Ecole doctorale : Homme, Environnement, Santé

Impact des produits de traitement du bois sur les amphipodes *Gammarus pulex* (L.) et *Gammarus fossarum* (K.) : approches chimique, hydro-écologique et écotoxicologique

par

Olivier ADAM

Jury :

Jean-Claude AMIARD (Directeur de recherche, CNRS, Nantes)	Rapporteur
Jean-François FERARD (Professeur, Université Paul Verlaine, Metz)	Rapporteur
Felippe De ALENCASTRO (Docteur, EPFL, Lausanne, Suisse)	Examineur
Laurent LAGADIC (Directeur de recherche, INRA, Rennes)	Examineur
Giangiacomo TORRI (Directeur de recherche, ISCB, Milan, Italie)	Examineur
Pierre-Marie BADOT (Professeur, Université de Franche-Comté, Besançon)	Directeur de thèse
Grégorio CRINI (Docteur, Université de Franche-Comté, Besançon)	Co-directeur de thèse
François DEGIORGI (Docteur, Université de Franche-Comté, Besançon)	Co-directeur de thèse

Remerciements

Merci au professeur P. Giraudoux, directeur du Laboratoire de Biologie Environnementale, puis au professeur H. Richard, directeur du Laboratoire de Chrono-Environnement, pour m'avoir accueillis pendant mes années de DEA puis de thèse au sein des structures qu'ils dirigent ou qu'ils ont dirigé.

Je remercie également le professeur P-M. Badot, directeur de thèse, ainsi que les docteurs G. Crini et F. Degiorgi, co-directeurs de thèse, pour m'avoir, chacun à leur manière, accompagné au cours de mon doctorat. L'originalité (et la difficulté) du présent travail tient notamment à la diversité de leur spécialité respective, diversité disciplinaire qui a été pour moi très enrichissante.

Le présent de travail n'aurait pas pu être réalisé sans le soutien financier de l'Agence de l'Eau Rhône, Méditerranée et Corse ainsi que celui du Conseil Régional de Franche-Comté. Ma reconnaissance va également aux scieurs qui ont su faire preuve d'ouverture d'esprit en ayant compris la démarche purement scientifique qui a été la mienne.

La présente thèse a aussi été l'occasion d'établir une collaboration avec l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne. Un grand merci donc au docteur L.F. de Alencastro pour la qualité de son accueil et pour son soutien indéfectible. La gentillesse, la disponibilité et le talent pédagogique de D. Grandjean ont également fortement contribué à ce que ce séjour en Suisse se déroule dans d'excellentes conditions.

Un grand merci aux stagiaires et vacataires que j'ai encadré ou co-encadré et qui ont participé directement ou indirectement à ce programme de recherche, avec par ordre chronologique Maud Bitschené, Virginie Fasquelle et Clément Ledoux, Gildas Kleinprintz et Emilie Navel, Gavin Eaten et Nicolas Garé, Benjamin Bulle, David Bouché, Feth-allah Setta, Capucine Robert, William Cornelius. Je n'oublie pas tous les collègues de la Place Leclerc... Mickaël, Marc, Julie pour ne citer qu'eux (pardon à tous les autres).

Enfin, l'endurance que nécessite une thèse n'aurait pu être trouvée sans le soutien moral des personnes qui me sont le plus proche. Je pense en particulier à mes parents qui m'ont soutenu et encouragé lors de ma reprise des études, et à ma future femme qui a eu l'extrême patience de m'accompagner (et souvent de me supporter !) tout au long de cette période.

Table des matières

Liste des Figures.....	3
Liste des Tableaux.....	7
Introduction générale.....	9
Première Partie : Etat de l'art	13
<i>I.1. Traitement du bois</i>	<i>14</i>
I.1.1. Risque biologique et traitement du bois	14
I.1.2. Procédé et produits de traitement du bois (risque biologique de classe 2)	16
I.1.3. Cadre juridique et réglementation française	17
<i>I.2. Impact des produits de traitement du bois sur les biocénoses aquatiques.....</i>	<i>19</i>
<i>I.3. Méthodes biologiques de diagnose de l'impact de substances toxiques sur les macro-invertébrés aquatiques.....</i>	<i>22</i>
I.3.1. Niveaux d'organisation biologique concernés par la bioindication.....	23
I.3.2. Approches holistiques et réductionnistes	30
<i>I.4. Sources, transferts et devenir de la deltaméthrine, de la cyperméthrine, de l'IPBC, du propiconazole et du tébuconazole</i>	<i>35</i>
1.4.1. Pyréthrinoïdes de synthèse	35
1.4.2. IPBC	43
1.4.3. Fongicides triazolés	45
<i>I.5. Toxicité aiguë de la deltaméthrine, de la cyperméthrine, de l'IPBC, du propiconazole et du tébuconazole</i>	<i>49</i>
I.5.1. Insecticides pyréthrinoïdes de synthèse (cyperméthrine et deltaméthrine)	50
I.5.2. Carbamates fongicides/bactéricides (IPBC)	54
I.5.3. Fongicides triazolés (propiconazole et tébuconazole)	55
<i>I.6. Biologie et écologie des organismes étudiés.....</i>	<i>57</i>
I.6.1. <i>Gammarus pulex</i> (Linnaeus, 1758) et <i>Gammarus fossarum</i> (Koch, 1836).....	57
I.6.2. <i>Elmis aenea</i> (Ph. Müller 1806).....	69
<i>Synthèse et conclusion générale de l'état de l'art</i>	<i>73</i>
Deuxième Partie : Approche chimique.....	75
<i>II.1. Etude de l'adsorption du propiconazole sur un matériau adsorbant</i>	<i>77</i>
II.1.1. Rappels sur l'adsorption.....	77
II.1.2. Etude de l'adsorption du propiconazole sur du charbon actif modifié.....	81
<i>II.2. Vers une évaluation de l'état de contamination du compartiment sédimentaire d'un cours d'eau par les produits de traitement du bois.....</i>	<i>95</i>
II.2.1. Développement d'une nouvelle méthode analytique en vue de la détermination de l'état de la contamination du compartiment sédimentaire par les produits de traitement du bois à de faibles concentrations.....	96
II.2.2. Premières applications concrètes à l'étude de la contamination à proximité d'une aire de traitement du bois	105
<i>Conclusions de l'approche chimique.....</i>	<i>110</i>

Troisième Partie : Approche hydro-écologique.....	111
<i>III.1. Variations saisonnières et influence de la distance sur l'impact d'une aire de traitement du bois sur Gammarus pulex</i>	<i>113</i>
<i>III.2. Vers le développement d'une méthode de bioindication des perturbations engendrées par les aires de traitement du bois sur les invertébrés aquatiques</i>	<i>138</i>
III.2.1. Altération d'une population de <i>G. fossarum</i> par une aire de traitement	138
III.2.2. Etude complémentaire : altération par une aire de traitement du bois de l'ensemble de la communauté macrobenthique et de <i>Elmis aenea</i> (Insecta, Coleoptera) en particulier.	156
<i>Conclusions de l'approche hydro-écologique</i>	<i>162</i>
Quatrième Partie : Approche écotoxicologique.....	163
<i>IV.1. Etude la toxicité de produits de traitement du bois seuls et en mélange sur Gammarus pulex (L.)</i>	<i>164</i>
<i>IV.2. Etude des différences de sensibilité des populations de G. pulex et G. fossarum fonction de leur origine géographique et du stade de développement</i>	<i>186</i>
<i>Conclusions de l'approche écotoxicologique</i>	<i>205</i>
Cinquième Partie : Discussion générale et Perspectives	206
Bibliographie.	219

Liste des Figures

Première Partie : Etat de l'art

- Figure I.1.** Représentation schématique de *Gammarus pulex* (L.). Echelle : 1 cm = 2 mm.58
- Figure I.2.** Représentation schématique d'une larve (à gauche) et d'un imago (à droite) d'*Elmis aenea* (M.). Echelle : 1 cm = 2 mm.....69

Deuxième Partie : Approche chimique

- Figure II.1.** Méthode analytique statique dite en batch.79
- Figure II.2.** Chemical structure of propiconazole.84
- Figure II.3.** Comparison between adsorption capacity (R in %) of propiconazole on untreated and treated carbons (carbon dose = 100 mg/100 ml; initial concentration = 50.6 mg/l; initial pH = 6.5; contact time = 120 min; temperature = 25 ±1°C).87
- Figure II.4.** Effect of contact time on propiconazole adsorption (carbon dose = 100 mg/100 ml; initial concentration = 50.6 mg/l; initial pH = 6.5; temperature = 25 ±1°C).....88
- Figure II.5.** Effect of carbon surface change on propiconazole adsorption (carbon dose = 100 mg/100 ml; initial pH = 6.5; contact time = 120 min; temperature = 25 ±1°C).89
- Figure II.6.** Adsorption of propiconazole on untreated and treated carbons as a function of temperature (carbon dose = 100 mg/100 ml; initial concentration = 50.6 mg/l; initial pH = 6.5; contact time = 120 min).90
- Figure II.7.** Présentation schématique de la première étape d'extraction du sédiment.97
- Figure II.8.** Représentation schématique de la seconde étape d'extraction du sédiment (DCM : dichlorométhane ; SSA : sulfate de sodium anhydre).98
- Figure II. 9.** Représentation schématique de la première étape de purification.100
- Figure II.10.** Représentation schématique de la deuxième et troisième étape de purification (DCM : dichlorométhane).101
- Figure II.11.** Représentation schématique des trois types de détection (CG-DCE : chromatographe en phase gazeuse équipé d'un détecteur par capture d'électron ; CG-SM : chromatographe en phase gazeuse équipé d'une détecteur par spectrométrie de masse ; CLHP-DBD : chromatographe liquide à haute performance équipé d'un détecteur à barrette de diodes).103
- Figure II.12.** Précipitations quotidiennes (mm) durant les quatre semaines précédant les trois campagnes d'échantillonnage : le 29 juin (A), le 25 juillet (B) et le 11 octobre 2006 (C). Les flèches indiquent les jours de prélèvement.....106
- Figure II.13.** Etat de contamination sédimentaire de la Drésine par les produits de préservation du bois cyperméthrine (noir), propiconazole (pointillé) et tébuconazole (hachuré) à l'amont immédiat de l'aire de traitement du bois (site 1), à l'aval proche (400 m, site 2) et l'aval lointain (2000 m, site 3) lors des trois campagnes d'échantillonnage réalisées le 29 juin 2006 (A, D), le 25 juillet 2006 (B, E) et le 11 octobre 2006 (C,F). Les niveaux de contamination moyens (ng.g-1) sont indiqués sur les graphiques A, B et C. Les pourcentages d'échantillons de sédiment

dans lesquels au moins une contamination par l'un des pesticides recherchés a été détectée (%) sont indiqués sur les graphiques D, E et F. 107

Troisième Partie : Approche hydro-écologique

Figure III.1. Experimental area showing the wood treatment area (black rectangle) and sampling sites of <i>G. pulex</i> population (rectangles) along <i>Drugeon river</i> (black curve).	117
Figure III.2. Evolution of <i>G. pulex</i> densities (ind.m ⁻²) measured in station A (black), station B (oblique lines), station C (horizontal lines), and station D (white) along the year.	120
Figure III.3. Average annual densities (ind.m ⁻²) of <i>G. pulex</i> in bryophyte (grey), gravel (black), and OM (white) sampled in stations A, B, C and D.	121
Figure III.4. Densities of each developmental stage (ind.m ⁻²) in the upstream site for each of the twelve sampling periods: juveniles (< 3 mm) are indicated in black, young immature (3-5 mm) are in grey, old immature (5-7 mm) are represented with dotted lines, and adults (> 7 mm) are in white.	122
Figure III.5. Decrease rates of densities observed between station A (upstream site) and respectively site B, C and D (downstream sites) for each <i>G. pulex</i> developmental stage : juveniles (< 3 mm) in black, young immature (3-5 mm) in grey, old immature (5-7 mm) in dotted lines, and adults (> 7 mm) in white.	122
Figure III.6. Average population composition (%) in each sampling site: juveniles (< 3 mm) in black, young immature (3-5 mm) in grey, old immature (5-7 mm) in dotted lines, and adults (> 7 mm) in white.	123
Figure III.7. Evolution of the average proportion (%) of gravid female among all adult females sampled in the four studied sites.	123
Figure III.8. Percentage of female (grey) and male (black) among <i>G. pulex</i> adults sampled in the four experimental sites.	124
Figure III.9. Precipitation (mm, histograms) and flow velocity (m ³ .s ⁻¹ , curves) the 30 days previous each of the twelve sampling periods (indicated by arrows).	125
Figure III.10. Study area and localisation of the three sampling sites (ellipses) on <i>Drésine</i> (black curve), the wood treatment area (black rectangle), and dwellings (white rectangle). Wood cover is indicated by grey areas and pastures by the white area.	143
Figure III.11. Precipitation (mm) in the four weeks before samplings (arrows) and in the two weeks of cage exposure (grey areas). First sampling was performed the 29 th June 2006 (a), and the second one was performed the 11 th October 2006 (b).	147
Figure III.12. Mortality of caged <i>G. fossarum</i> adults (%) after 15 days of exposure in site 1, 2 and 3 in the first (a, 29 th June – 13 th July) and the second studied periods (b, 11 th October – 25 th October). The medians are indicated by horizontal lines, 25% and 75% quartiles are indicated by boxes, and error bars presenting standard deviation, n=8. *: p value < 0.05; Wilcoxon test between site 1 and site 2.	148
Figure III.13. Densités d'imagos (A) et de larves (B) d' <i>E. aenea</i> (ind.m ⁻²) observés dans les bryophytes du <i>Drugeon</i> . Les prélèvements ont été effectués mensuellement à l'amont immédiat de l'aire de	

traitement (site 1 amont Drugeon, en noir), à l'aval immédiat (site 2 aval proche Drugeon, en blanc), à l'aval proche (site 3 aval moyen Drugeon, en pointillé) et à l'aval éloigné (site 4 aval lointain Drugeon, en hachuré)..... 158

Quatrième Partie : Approche écotoxicologique

- Figure IV.1.** Concentration-response curves obtained by Hill's model after 96 h of exposure of *G. pulex* to propiconazole (A), tebuconazole (B), IPBC (C), and cypermethrin (D). Percentages correspond to *G. pulex* mortality (%). Pesticide concentrations are expressed in $\mu\text{g.L}^{-1}$. Plots represent the mean (+/-95% CI) of 6 replicates. 173
- Figure IV.2.** LC_{50} expressed in $\mu\text{g.L}^{-1}$ for *G. pulex* exposed to IPBC (square plot), propiconazole (triangle plot), tebuconazole (circle plot) and cypermethrin (rhomb plot) from 24 to 96 h of exposure. The left axis corresponds to fungicide (IPBC, propiconazole, tebuconazole) LC_{50} , the right axis corresponds to cypermethrin LC_{50} . Error bars indicate 95% confidence interval. 174
- Figure IV.3.** Concentration-response curves obtained for *G. pulex* exposed to M0 or M1 (A) and M2 (B) after 96 h of exposure. Percentages correspond to *G. pulex* mortality (%). Pesticide concentrations are expressed in terms of cypermethrin concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$) in mixtures. White plots give the mean percentages (+/-Standard Deviation) of 6 replicates. Circle plots correspond to M1 (A) and M2 (B). Square plots correspond to M0, commercial solution EX 2002 E.S.E.® (A). Solid lines are the concentration-response curves obtained by Hill's model. Predicted concentration-response curves calculated by CA, IA models and MM are represented with dotted lines. 175
- Figure IV.4.** Experimental sites showing sampling areas (circle), wood cover (dotted areas), dwellings (black rectangles), and wood treatment areas (white rectangles). *G. fossarum* populations were sampled in *ruisseau de la Drésine, Petits Biefs* (A) and in *ruisseau des Dames* (B), and sampling of *G. pulex* populations was performed along *rivière Drugeon* (C), in *Bief Belin* and *ruisseau de la Goutte d'Or* (D). 190
- Figure IV.5.** Dose-response curves obtained by Hill's model after 48 h of exposure of *G. fossarum* (A) and *G. pulex* (B) juveniles to deltamethrin. Percentages correspond to mortality (%). Deltamethrin concentrations are expressed in ng.L^{-1} . White plots represent the mean (+/-Standard Error) of replicates. Replicates are indicated with black plots. Broken line indicates LC_{50} 194
- Figure IV.6.** Dose-response curves obtained by Hill's model after 96 h of exposure to deltamethrin of adult *G. fossarum* sampled in *ruisseau des Dames* (A), *ruisseau de la Drésine* (B) and *Petits Biefs* (C); and of adult *G. pulex* sampled in *rivière Drugeon* (site 1 = D, site 2 = E), and *ru de la Goutte d'Or* (F), and *Bief Belin* (G). Percentages correspond to adult mortality (%), and deltamethrin concentrations are expressed in ng.L^{-1} . White plots represent the mean (+/-95% CI) of at least 6 replicates that are indicated with black plots. Broken lines indicated the 96-h LC_{50} 195

- Figure IV.7.** Bars indicate lethal concentrations for 50% of adult *G. pulex* or adult *G. fossarum* individuals. LC50s were obtained after 96h of exposure to deltamethrin (ng.L⁻¹). Populations tested were sampled in each of the seven studied sites. Error bars indicate 95% interval confidence. Da = ruisseau des Dames ; Ds = ruisseau de la Drésine ; PB = Petits Biefs ; Dg1 = rivière Drugeon (site 1) ; Dg2 = rivière Drugeon (site 2) ; GO = ru de la Goutte d'Or ; BB = Bief Belin.....196
- Figure IV.8.** Dendrogram according to the hierarchical cluster analysis using complete linkage method, performed on a set of Gower's dissimilarity index, and based on deltamethrin lethality for *G. pulex* and *G. fossarum* adults. Da = ruisseau des Dames ; Ds = ruisseau de la Drésine ; PB = Petits Biefs ; Dg1 = rivière Drugeon (site 1) ; Dg2 = rivière Drugeon (site 2) ; BB = Bief Belin ; GO = ru de la Goutte d'Or. * : p value < 0.05; *** : p value < 0.001; Wilcoxon tests between clusters.....197
- Figure IV.9.** Mortality rate (%) after 48h of exposure to 5 ng.L⁻¹ of deltamethrin of juvenile (Ju) and adult (Ad) *Gammarus sp.* sampled in the seven studied sites. The medianes are indicated by horizontal lines, 25% and 75% quartiles are indicated by boxes, error bars presenting standard deviation, and white circle plots being outputs. *G. fossarum* was sampled in ruisseau des Dames (Da), Petits Biefs (PB) and ruisseau de la Drésine (Ds). *G. pulex* was sampled in rivière Drugeon (site 1 = Dg1, and site 2 = Dg2), Bief Belin (BB), and ru de la Goutte d'Or (GO).....198

Liste des Tableaux

Première Partie : état de l'art

Tableau I.1. Classes de risques biologiques établies pour certaines essences de résineux dont les sapins et épicéas selon leur future utilisation et exposition (Norme NF EN 335).	14
Tableau I.2. Classification des taxons macrobenthiques selon leur sensibilité aux contaminants. Selon Liess et Ohe (2005), « + » : espèce à risque ; « - » : espèce non à risque ; « * » : taxon classé non à risque en raison de sa mobilité. Selon Neumann <i>et al.</i> (2003a et 2003b), « P » : taxon positivement corrélé avec le degré de contamination ; « N » : taxon négativement corrélé avec le degré de contamination. (adapté et modifié de Liess et Ohe 2005 et Neumann <i>et al.</i> 2003b).....	26
Tableau I.3. Principales caractéristiques physico-chimiques de la cyperméthrine. Sources : US EPA 2006a, UK Environment Agency 2002, European Commission 2005.	38
Tableau I.4. Principales caractéristiques physico-chimiques de la deltaméthrine. Sources : European Commission 2002b, WHO 1990.	39
Tableau I.5. Principales caractéristiques physico-chimiques de l'IPBC. Sources : US EPA 1997, Canadian Department of Environment 1989.	44
Tableau I.6. Principales caractéristiques physico-chimiques du propiconazole. Sources : US EPA 2006b, European Commission 2003b et 2006, Agriculture Canada 1987.	46
Tableau I.7. Principales caractéristiques physico-chimiques du tébuconazole. Source : US EPA 1999.	47
Tableau I.8. Toxicité aiguë de la deltaméthrine et de la cyperméthrine pour quelques espèces parmi les plus sensibles dans les principaux groupes de taxons aquatiques.	53
Tableau I.9. Toxicité aiguë de l'IPBC pour quelques espèces parmi les plus sensibles dans les principaux groupes de taxons aquatiques.	55
Tableau I.10. Toxicité aiguë du propiconazole et du tébuconazole pour quelques espèces parmi les plus sensibles dans les principaux groupes de taxons aquatiques.	55
Tableau I.11. Table de vie de <i>G. pulex</i> et <i>G. fossarum</i> récapitulant la durée des phases de développement de ces organismes, en particulier en relation avec la température de l'eau.	62

Deuxième Partie : approche chimique

Table II.1. Results of elemental analysis, pH _{PZC} and surface specific area of AC samples	85
Tableau II.2. Limites de détection (ng.g ⁻¹) obtenues pour chacune des 6 substances étudiées. Les colonnes indiquent le type d'appareil et de détecteur utilisés pour la quantification : la colonne utilisée est indiquée entre parenthèses.	104

Troisième Partie : approche hydro-écologique

Table III.1. Location and physical characteristics of the four experimental sites.	117
Table III.2. An overview of selected studies monitoring field impact of discharges using in situ bioassays with caged <i>Gammarus species</i> . The column 'Field validation' indicates if the relationship between caged individuals and autochthonous population was assessed. ND: not detected.	142

Table III.3. Ecological characteristics of <i>Drésine</i> in the three experimental sites at both sampling dates.	146
Table III.4. Sediment contamination ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ dw) of active substances used in the wood treatment area (not detected, ND). Values are indicated by the mean of the replicates \pm standard error.	146
Table III.5. Average densities (ind.m^{-2}) \pm standard deviation of three size categories of <i>Gammarus fossarum</i> sampled in bryophyte settlement from site 1, site 2, and site 3 in the both studied periods (n=3). Notes of French standard biotic index (IBGN) obtained in site 1 and 2 from samples of October 11 are indicated in the bottom of the table.	147
Tableau III.6. Moyenne annuelle des densités d' <i>Elmidae</i> au sein des bryophytes (ind.m^{-2}) prélevés dans chacun des quatre sites étudiés.	159
Tableau III.7. Densités (ind.m^{-2}) des taxons échantillonnés avec <i>Gammarus fossarum</i> le 11 octobre 2006 au niveau des trois sites d'étude du ruisseau de la Drésine.	160

Quatrième Partie : approche écotoxicologique

Table IV.1. Main features of the tested chemicals: cypermethrin, IPBC, propiconazole, tebuconazole, and solvents used for dilutions.	168
Table IV.2. Composition of mineral water (Volvic [®]) used for dilutions and laboratory acclimatization of <i>Gammarus pulex</i>	168
Table IV.3. Concentrations of active substances in the commercial mixture EX 2002 E.S.E. [®] (M0). Pesticide ratios (%) calculated for mixture 1 (M1), and for mixture 2 (m2) based on <i>G. pulex</i> 96-h LC ₅₀ (*) of cypermethrin (mM) and on <i>G. pulex</i> 96-h LC ₅ (**) of fungicides (mM) . Toxic units ratio (%) based on respective <i>G. pulex</i> 96-h LC ₅₀ are indicated for mixture 1 and mixture 2.	170
Table IV.4. LC ₅₀ (95% IC) expressed in $\mu\text{g.L}^{-1}$ for cypermethrin, IPBC, propiconazole and tebuconazole obtained after 24, 48, 72, and 96 h of <i>G. pulex</i> exposure, and Pearson's correlation coefficient (r) between observed mortality data and predicted lethality values obtained by Hill's model.	172
Table IV.5. Location and main hillside cover of the experimental sites.	190
Table IV.6. Composition of mineral water (Volvic [®]) used for dilutions and laboratory acclimatization.	191
Table IV.7. Field densities (ind.m^{-2}) of <i>Gammarus sp.</i> populations sampled in bryophyte settlement, litter and gravel, and proportion (%) of the four size categories (< 3 mm, 3-5 mm, 5-7 mm, and > 7mm) among the overall population in the experimental sites.	193

Cinquième Partie : discussion générale et Perspectives

Tableau V.1. Estimation des PNEC (ng.L^{-1}) de la deltaméthrine, la cyperméthrine, du propiconazole, du tébuconazole et de l'IPBC pour <i>G. pulex</i> suivant 2 scénarios liés à la présence ou non d'interactions. * : Estimation de la PNEC (ng.L^{-1}) de la deltaméthrine pour <i>G. fossarum</i>	211
Tableau V.2. Estimation pour <i>G. pulex</i> de la PNEC _{sed} (ng.g^{-1} ou $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ou ppb) de la deltaméthrine, de la cyperméthrine, de l'IPBC, du tébuconazole et du propiconazole dans un sédiment contenant 5% de matière organique. * : Estimation de la PNEC _{sed} de la deltaméthrine pour <i>G. fossarum</i> . Les limites de détection des produits de préservation du bois dans le sédiment (ng.g^{-1}) sont celles de la méthode développée dans le présent travail (chapitre II.2.1).	212

Introduction générale

Introduction générale

Contamination généralisée des têtes de bassin

Environ 100 000 substances chimiques sont présentes sur le marché européen, la France étant la première consommatrice de pesticides en Europe, et la 3^{ème} au monde, avec 72 773 tonnes de produits phytosanitaires commercialisées en 2004 (IFEN 2006). Ainsi, selon cette même source, le seuil de détection d'au moins une matière active (parmi les 459 qui ont été recherchées) a été atteint dans 96% des points de mesure des cours d'eau en France en 2004. Bien que moins suivies, les têtes de bassin n'échappent pas à ce phénomène et sont très souvent contaminées par de nombreux micropolluants (Kreuger 1998, Neumann *et al.* 2002 et 2003a, Berenzen *et al.* 2005a, Liess et Ohe 2005). Or, les systèmes aquatiques apicaux composent une gamme de biotopes contrastés abritant des groupements d'espèces très variés (Verneaux 1973). Parallèlement, ils fournissent d'irremplaçables ressources en eau potable. Pourtant, les connaissances sur les perturbations engendrées par les substances toxiques sur le fonctionnement de ces systèmes aquatiques apicaux sont très parcellaires.

Intérêts de l'étude de l'impact du traitement du bois

La majeure partie des micropolluants présents en tête de bassin est d'origine agricole, même si ces substances peuvent aussi être d'origine domestique et/ou industrielle (IFEN 2006). Cependant, la caractérisation de l'impact des pesticides utilisés en agriculture est rendue difficile par le caractère diffus des apports dans le milieu aquatique. *A contrario*, les effluents industriels présentent l'avantage méthodologique d'être plus localisés. Or, comme les scieries utilisaient autrefois la force motrice de l'eau, les aires de traitement du bois sont souvent implantées à proximité immédiate de cours d'eau en tête de bassin. Parallèlement, le traitement du bois en scierie ou en forêt est susceptible d'employer des matières actives dont l'usage est très répandu par ailleurs. L'étude de l'impact de produits de préservation du bois peut ainsi contribuer à une meilleure compréhension des perturbations engendrées sur les écosystèmes aquatiques apicaux par des pesticides parmi les plus utilisés par ailleurs.

Importance de la filière bois en Franche-Comté

La filière bois en Franche-Comté occupe une place économique traditionnellement importante dans l'économie régionale avec 1 600 entreprises et 8 000 emplois. Environ la moitié des

scieries de résineux ont une activité de traitement de préservation du bois, ce qui représente 200 000 m³ de bois traité par an réparti dans 68 scieries (ADIB 2002).

Il existe plusieurs types de traitement préventif du bois selon la vulnérabilité des essences utilisées et leur future exposition. La présente étude se concentre sur l'activité de traitement qui est traditionnellement la plus utilisée en Franche-Comté, c'est-à-dire sur le traitement de classe 2 qui concerne essentiellement le traitement préventif des sapins et épicéas destinés à la fabrication de charpentes.

Choix des molécules étudiées

Les 55 solutions recommandées par le Centre Technique du Bois et de l'Ameublement pour ce type de traitement contiennent un panel de 13 matières actives différentes (CTBA 2004). Ne pouvant étudier l'ensemble de ces substances, un choix a été effectué parmi celles qui sont les plus représentatives en terme de fréquence d'emploi dans le cadre du traitement du bois mais aussi dans le cadre d'autres activités (agricoles et domestiques).

Le choix s'est porté sur quatre de ces substances : la cyperméthrine, le propiconazole, le tébuconazole et l'IPBC. Au moins un de ces pesticides est présent dans 53 des 55 solutions recommandées, et environ 35% de ces solutions sont constituées du mélange de ces 4 matières actives. La deltaméthrine, principale molécule utilisée pour le traitement préventif des grumes stockées en forêt ou en scierie, a été ajoutée à la liste des substances étudiées. Ces pesticides ont été ré-autorisées à être mises sur le marché européen dans le cadre du programme REACH (*Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals*), en particulier vis-à-vis de la Directive Européenne 91/414/EEC relative aux produits phytosanitaires.

Ces cinq substances ont aussi été choisies de façon à recouvrir une large gamme de mode d'action toxique. Ainsi, la cyperméthrine et la deltaméthrine sont des insecticides de la famille des pyréthrinoïdes de synthèse : ce sont des neurotoxiques qui paralysent en bloquant la transmission de l'influx nerveux (Bradbury et Coats 1989). Le propiconazole et le tébuconazole sont des fongicides de la famille des triazolés : ils inhibent la croissance des champignons en agissant sur le cytochrome P450 responsable de la biosynthèse des ergostérols (Egaas *et al.* 1999). Le mode d'action anti-fongique et bactéricide du carbamate IPBC n'est pas connu avec précision à ce jour, une action sur les cholinestérases étant suspectée (Jarrad *et al.* 2004).

Enfin, hormis l'IPBC, ces molécules sont parmi les plus utilisées en dehors du traitement du bois, et sont donc susceptibles d'être représentatives de pollutions de nombreux milieux aquatiques.

Impact sur la faune aquatique

Depuis la fin des années 1980, les gestionnaires des milieux aquatiques ont constaté une diminution de la biomasse piscicole ainsi que de nettes réductions de l'abondance de gammarus à l'aval de nombreux sites de traitement du bois. Ces observations ont été corroborées par plusieurs travaux universitaires (Eloy et Goguilly 2000, Adam 2002, Adam 2004). L'étude de la réponse de ces crustacés aux produits de traitement du bois s'est ainsi progressivement imposée, ainsi que la possibilité de les utiliser à des fins bioindicatrices.

Gammarus pulex (L.) et *Gammarus fossarum* (K.), deux espèces de gammarus autochtones des eaux douces en France, ont été choisis comme modèle d'étude. Ces organismes, potentiellement présents en fortes densités, ont un fort rôle structurant et fonctionnel dans de nombreux écosystèmes aquatiques, et ils sont relativement peu sensibles aux perturbations engendrées par un excès en éléments nutritifs ou en matière organique oxydable dans leur environnement. En revanche, ils font partie des invertébrés aquatiques parmi les plus sensibles à de nombreux micropolluants, tout en ayant un cycle de vie exclusivement aquatique qui ne leur permet pas d'échapper à des flux de contaminants, mêmes intermittents. Enfin, grâce à leurs faibles exigences écologiques, ces espèces peuvent être étudiées à la fois dans de nombreux cours d'eau et en conditions contrôlées en laboratoire.

La présente thèse vise à documenter l'impact de contaminations par des produits de traitement du bois chez *G. pulex* et *G. fossarum* ainsi qu'à mieux comprendre certains des processus conduisant à l'altération de leurs populations. Dans cet optique, une approche transdisciplinaire faisant intervenir de la chimie environnementale, de l'écotoxicologie ainsi que de l'hydro-écologie a été réalisée. Ces approches visent en particulier à une meilleure compréhension du degré de contamination du milieu et donc de l'exposition des organismes aux contaminants, ainsi qu'à une évaluation de la réponse *in natura* (échelle de la population) et de la sensibilité physiologique (échelle de l'individu) de *G. pulex* et *G. fossarum*. La réalisation de ces objectifs doit contribuer à une meilleure évaluation de la vulnérabilité de ces espèces et ainsi contribuer au développement d'une méthode de bioindication utilisant ces crustacés.

Première Partie

Etat de l'art

I.1. Traitement du bois

I.2. Impact des produits de traitement du bois sur les biocénoses aquatiques

I.3. Méthodes biologiques de diagnose de l'impact de substances toxiques sur les macro-invertébrés aquatiques

I.4. Sources, transferts et devenir de la deltaméthrine, de la cyperméthrine, de l'IPBC, du propiconazole et du tébuconazole

I.5. Toxicité aiguë de la deltaméthrine, de la cyperméthrine, de l'IPBC, du propiconazole, et du tébuconazole

I.6. Biologie et écologie des organismes étudiés

I.1. Traitement du bois

I.1.1. Risque biologique et traitement du bois

Le matériau « bois » peut subir des détériorations altérant la structure du bois ou son aspect (piqûres, action des xylophages, pourriture...). Les risques de dégradations de ses performances, de son aptitude à l'usage ou de sa durée de vie par des agents biologiques, chimiques ou physiques varient selon l'environnement dans lequel il est exposé et son type d'utilisation. Les classes d'exposition aux agents biologiques, dites « classes de risque biologique », sont caractérisées dans la norme NF EN 335 (Tableau I.1). Lorsqu'une protection s'avère nécessaire pour une essence non naturellement résistante à ces altérations, un traitement préventif approprié, comme l'application de certaines substances biocides peut être mis en œuvre (AFNOR 1989, Dirol et Deglise 2001).

Classes de risques	Situation en service	Exemples d'emplois	Risques biologiques
Classe 1	Bois toujours sec. Humidité inférieure à 20 %	Emplois intérieurs uniquement: meubles, parquets, lambris, menuiseries et aménagements intérieurs...	- Insectes - Termites
Classe 2	Bois sec mais dont l'humidité peut occasionnellement dépasser 20 %	Charpente, ossatures correctement ventilées en service	- Insectes - Termites - Champignons de surface
Classe 3	Bois à une humidité fréquemment supérieure à 20 %	Toutes pièces de construction ou menuiseries extérieures soumises à la pluie : bardages, fenêtres...	- Insectes - Termites - Pourriture
Classe 4	Bois à une humidité toujours supérieure à 20 %	Bois horizontaux en extérieur (balcons, coursives,...) et bois en contact avec le sol ou une source d'humidification prolongée ou permanente	- Insectes - Termites - Pourriture
Classe 5	Bois en contact permanent avec l'eau de mer	Piliers, pontons, bois immergés	- Insectes - Ténébrants marins - Pourriture

Tableau I.1. Classes de risques biologiques établies pour certaines essences de résineux dont les sapins et épicéas selon leur future utilisation et exposition (Norme NF EN 335).

Le sujet d'étude de cette thèse porte sur les impacts environnementaux de substances biocides utilisées dans la partie amont de la filière bois, en s'intéressant plus particulièrement aux aires de traitement industrielles implantées en scierie. Les impacts liés à la partie aval de la filière bois, avec notamment l'impact de bois déjà traité et en cours d'utilisation, n'ont pas été évalués.

Les essences de bois traitées sur les sites étudiés sont le sapin et l'épicéa. Ces deux essences de résineux sont susceptibles d'être attaquées par des insectes dits « de bois sec » par opposition aux insectes dits « de bois frais » qui se développent dans les couches externes des arbres vivants (Dirol et Deglise 2001). Les insectes de bois sec rencontrés dans le bois d'œuvre en France appartiennent en grande majorité à l'ordre des Coléoptères. En France, trois principaux groupes d'espèces sont susceptibles d'attaquer les résineux : leurs principaux représentants sont le capricorne des maisons *Hylotrupes bajulus* (L.), la petite vrillette *Anobium punctatum* (G.), et la grosse vrillette *Xestobium rufovillosum* (G.). Les scolytes sont également très répandus avec par exemple le bostryche *Bostrychus capucinus* (L.). Le cycle de développement de ces espèces sont similaires en de nombreux points : les œufs sont pondus dans les fentes du bois (parfois dans les gros vaisseaux du bois), puis, une fois éclos, leurs larves creusent des galeries avec leurs mandibules afin de se nourrir de lignine et de cellulose (parfois d'amidon). Une fois la nymphose effectuée, les adultes sortent du bois par des trous d'envols ou de sortie, ce sont les « piqûres » du bois. La présence de ces insectes dans le bois entraîne un risque structurel car elle est susceptible de diminuer fortement la résistance mécanique (Rayzal 1998, Dirol et Deglise 2001).

Les grumes de sapin et d'épicéa font donc fréquemment l'objet d'un traitement préventif, mais non durable, contre l'attaque de ces coléoptères lors de leur stockage en forêt ou en scierie avant sciage (CTBA 2004). Trois solutions commerciales sont autorisées en France pour ce type d'usage, toutes à base d'un insecticide de la famille des pyréthrinoïdes de synthèse: le Fastac[®] et le Stimeur[®] dont la matière active est l'alphaméthrine et la K-Othrine[®] dont la matière active est la deltaméthrine. La deltaméthrine est de loin la substance la plus utilisée par les professionnels pour ce type de traitement. L'aspersion des grumes par aérosols se fait directement sur le site stockage des grumes, les recommandations d'usage précisant qu'il ne faut pas être situé à moins de 50 mètres d'un cours d'eau, et qu'il convient d'éviter d'appliquer la solution avant un épisode pluvieux. La dose de deltaméthrine recommandée par l'industriel pour ce type de traitement est de 25 mg.m⁻³.

Ces grumes sont essentiellement destinées à fabriquer de la charpente. Or, dans des conditions normales de pose et d'utilisation, le bois œuvré en charpente est exposé à une humidité qui ne dépasse qu'occasionnellement 20%. Elle est donc exposée à une classe de risque de niveau 2. En plus d'être protégés durablement contre les insectes de bois sec (particulièrement contre le capricorne des maisons et la petite vrillette), le sapin et l'épicéa destinés à être transformés en

charpente doivent également résister à long terme aux dégradations engendrées dans les premiers millimètres de son volume par des champignons lignivores. Ces derniers sont de deux types : les lignicoles, responsables de taches de coloration du bois et peu destructeurs, et les lignivores vrais, responsables du pourrissement du bois. Les bactéries, quant à elles, se développent dans des conditions environnementales particulières, et sont moins destructrices pour le bois que les champignons (Rayzal 1998, Dirol et Deglise 2001).

I.1.2. Procédé et produits de traitement du bois (risque biologique de classe 2)

Le procédé de traitement doit permettre de faire pénétrer dans le bois la quantité nécessaire de produit de préservation pour obtenir la protection de la zone vulnérable, afin d'aboutir aux performances souhaitées dans les conditions d'une classe de risque donnée. Ainsi, pour un traitement préventif de classe 2, ce sont les trois premiers millimètres à partir de la surface qui devront être protégés des attaques des agents pathogènes (norme française NF B 50-105.3 «*Performances des bois adaptées à la France métropolitaine et attestation de traitement* »). Ce type de traitement de surface est obtenu par trempage court : les pièces de bois sont assemblées en piles qui doivent être complètement immergées dans le produit de préservation contenu dans le bac métallique (bacs de trempage). En général, l'absorption est importante en début d'opération (10 à 20 secondes) mais ralentit progressivement ; la durée du trempage ne doit cependant pas être inférieure à 3 minutes, avec un temps d'égouttage de 15 minutes environ et un délai de fixation sous abri de 4 heures minimum (Dirol et Deglise 2001). Une fois traité, le bois fraîchement scié devra être durablement résistant aux altérations engendrées par les divers organismes xylophages et lignivores. L'efficacité intrinsèque d'un produit de préservation du bois par classe de risque (dont le niveau 2) est définie par la norme NF EN 599 parue en 1996 : «*Performance des produits préventifs de préservation du bois établies par des essais biologiques – Spécifications par classe de risque* ».

Un produit de traitement du bois élaboré pour le traitement préventif de résineux destinés à faire de la charpente comporte trois types d'éléments de base : les matières actives (i), les solvants (ii), les adjuvants (iii).

(i) Les matières actives confèrent l'efficacité biologique au produit. Concernant les produits de traitement destinés à un traitement de classe 2, il s'agit de mélanges d'insecticides et de fongicides. En France, les insecticides sont essentiellement de la famille des pyréthrinoïdes de

synthèse, avec plus particulièrement la cyperméthrine et la perméthrine. Les fongicides sont généralement de la famille des triazolés, avec plus particulièrement le propiconazole et le tébuconazole. Le 3-Iodo-2-propynyl butyl carbamate (IPBC) est aussi fréquemment employé pour son action mixte fongicide et bactéricide. Quelques produits de traitement de niveau 2 utilisent des sels d'ammonium quaternaire en mélange avec un pyréthriinoïde de synthèse : chlorure de benzalkonium, chlorure de diméthyl-didecyl ammonium, chlorure de diméthylcocobenzyl ammonium. En revanche, le pentachlorophénol et le pentachlorophénate de sodium seront définitivement interdits de mise sur le marché européen le 31 décembre 2008 au terme de la période de dérogation actuelle (Directive européenne 1999/CE/CE).

(ii) Les solvants véhiculent les matières actives à l'intérieur des cellules ligneuses et sont éliminés ensuite par simple séchage. Ils sont de deux natures : l'eau, et les dérivés pétroliers de type « *white-spirit* ». Ces derniers sont de deux types : les solvants légers, qui ont une évaporation relativement rapide, et les solvants lourds qui ont un bon pouvoir de diffusion mais qui sèchent moins rapidement.

(iii) Les adjuvants assurent la fixation des matières actives au sein de la paroi cellulaire ligneuse et ceci pendant toute la durée de vie du bois d'oeuvre. Cette fixation peut se faire par adjonction de résines alkydes ou glycérophthaliques qui retiennent particulièrement les substances de synthèse (Rayzal 1998, Dirol et Deglise 2001, INRS 2006).

I.1.3. Cadre juridique et réglementation française

Conformément au seuil fixé dans la nomenclature des Installations Classées pour la Protection de l'Environnement (ICPE, décret du 20 mai 1953 modifié), les scieries ayant une activité de traitement de préservation du bois sont soumises au régime de l'autorisation préfectorale d'exploitation. L'arrêté préfectoral d'autorisation fixe alors les prescriptions techniques qui sont applicables au site. L'arrêté type stipule, entre autres, que « L'exploitant prend toutes dispositions nécessaires dans la conception, la construction et l'exploitation des installations pour limiter les risques de pollution accidentelle de l'air, des eaux ou des sols. » (Article 7, Arrêté du 2 février 1998 paru au JO français le 3 mars 1998).

En revanche, l'aspersion des grumes sur leurs aires de stockage est moins encadrée réglementairement. L'absence d'installations spécifiquement prévues à cet usage, ainsi que

l'aspect facultatif, occasionnel et temporaire de ce type de traitement, font qu'il est très difficile d'obtenir des données relatives à ce type de traitement.

Résumé relatif au traitement du bois

Le matériau « bois », surtout lorsqu'il est issu d'essences résineuses comme le sapin et l'épicéa, est susceptible d'être traité préventivement à diverses étapes de sa transformation primaire (de la forêt à la scierie), afin de le protéger de l'attaque de champignons lignivores et d'insectes xylophages. Ces traitements emploient des procédés et des biocides qui varient selon le futur usage du bois et donc son exposition potentielle aux agents pathogènes.

Le travail entrepris dans cette thèse porte sur les aspects environnementaux potentiels des traitements de type 2, à base d'insecticides et de fongicides en solution dans un bac, ainsi que des pulvérisations de deltaméthrine en aérosol sur les grumes stockées avant sciage.

I.2. Impact des produits de traitement du bois sur les biocénoses aquatiques

Les études existantes sur l'impact des produits de traitement du bois sur les milieux aquatiques concernent soit des modes de traitement très différents de ceux étudiés dans cette thèse, soit d'autres types de traitements employant d'autres substances que celles présentement étudiées. Plusieurs de ces substances sont désormais interdites de mise sur le marché ou à utilisation très restreinte dans l'Union Européenne (mélange cuivre-chrome-arsenic, pentachlorophénol, créosote, par exemple). De plus, ces travaux ont été essentiellement réalisés en Amérique du nord où les communautés aquatiques diffèrent fortement de celles présentes en Europe. Néanmoins, ces études apportent des informations, d'une part, sur l'écotoxicologie de substances également employées dans notre domaine d'étude (effets chroniques et aigus d'une aspersion), et, d'autre part, sur la dynamique de transferts de substances utilisées en scieries.

Peu d'études relatives à l'impact d'une pulvérisation de pyréthrinoïdes sur les biocénoses aquatiques sont disponibles dans la littérature, hormis une expérimentation où un suivi bisannuel a été réalisé pendant cinq ans sur des sites forestiers canadiens ayant reçu une émulsion de perméthrine (pyréthrinoïde de synthèse) pulvérisée annuellement par avion (Kreutzweiser et Kingsbury 1987). Alors que les nématodes, plathelminthes, rotifères, annélides et mollusques n'étaient pas affectés par ces pulvérisations de perméthrine, les arthropodes aquatiques ont été particulièrement altérés. Les densités de crustacés ont été considérablement réduites après traitement, l'abondance des amphipodes et des isopodes restant réduites un an après alors que les densités de cladocères et de copépodes se sont reconstituées en 6 mois. Chez les insectes, les éphémères et les trichoptères se sont révélés les plus sensibles avec une recolonisation s'effectuant en environ 6 mois, alors que les plécoptères, odonates, hémiptères et coléoptères n'étaient que partiellement affectés et retrouvaient leurs densités d'origine en quelques semaines. Cet impact se fait ressentir jusqu'à au moins deux kilomètres à l'aval de la zone traitée. Toutefois, le niveau de détermination est trop peu précis pour permettre une analyse fine de la sensibilité de ces taxons qui sont pour la plupart absent d'Europe. Dans des conditions similaires, Kreutzweiser et Sibley (1991) ont temporairement observé des grands taux de dérives vers l'aval de nombreux taxons dont le trichoptère *Dolophilodes distinctus*, l'éphéméroptère *Baetis spp.* et le plécoptère *Leuctra spp.*

Les conséquences sur la faune piscicole sont plus contrastées du fait de leur mobilité. Néanmoins les auteurs ont constaté une réduction de la densité des poissons (essentiellement des salmonidés) et du taux de croissance de certains *Cyprinidae*, *Umbridae* et *Percidae* durant les 4 mois suivant une aspersion de perméthrine (Kingsbury et Kreutzweiser 1987). Ce type de traitement, qui fait intervenir une pulvérisation par avion sur un massif forestier, se rapproche des pulvérisations occasionnelles de deltaméthrine en France visant à préserver les grumes de bois en milieu forestier ou sur l'aire de stockage implantée en scierie.

Si les conséquences d'une exposition aiguë à un pyréthrianoïde de synthèse sont partiellement documentées, les conséquences à long terme pour les biocénoses aquatiques d'une exposition chronique à ces substances sont peu connues. Tout au plus, Kreutzweiser et Kingsbury (1987) ont remarqué que la vitesse de recolonisation des invertébrés aquatiques était plus lente après une seconde application de perméthrine sur le massif forestier, que lors du tout premier passage de l'avion un an plus tôt. De plus, d'autres pesticides sont utilisés au niveau de scieries, rendant plus complexes les phénomènes d'interactions et de perturbations combinées.

L'étude des transferts de pesticides au niveau d'aires de traitement régulier du bois, essentiellement en scierie, a permis de mettre en évidence à plusieurs reprises une contamination des milieux aquatiques (Gifford *et al.* 1996, Hingston *et al.* 2002), ces ruissellements altérant la vie aquatique environnante (Bailey *et al.* 1999a). Un déversement accidentel d'une solution de pesticides depuis un bac de traitement est capable de détruire complètement les communautés d'invertébrés à l'aval de l'aire de traitement, aucune recolonisation de certains taxons de plécoptères, trichoptères et éphéméroptères n'ayant été observée 4 ans après le déversement (McNeill 1989).

Plusieurs travaux ont montré que des apports chroniques peuvent à la longue contaminer significativement les sols et d'importants volumes d'eau environnants tels que des lacs (Lyytikäinen *et al.* 2001, Schultz *et al.* 2004). Néanmoins, ces études concernent essentiellement des métaux lourds et quelques organohalogénés, dont ni la rémanence et ni les propriétés de transfert ne sont comparables avec celles des substances étudiées dans cette thèse.

Enfin, à notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature d'études portant sur les conséquences pour les écosystèmes aquatiques de l'emploi de cyperméthrine, d'IPBC et de fongicides triazolés en mélange dans des produits de traitement du bois. Seuls quelques tests

toxicologiques ont réalisé par Lebkowska *et al.* (2003) sur une solution de traitement du bois contenant du propiconazole, du tébuconazole, de l'IPBC et de la cifluthrine (pyréthrianoïde de synthèse). Les auteurs concluent à une plus forte sensibilité des poissons (*Lebistes reticulatus*) et des crustacés (*Daphnia magna*) par rapport à la bactérie luminescente *Vibrio fisheri*. Il existe donc d'importantes lacunes dans la connaissance des perturbations engendrées par les produits de traitement du bois sur les écosystèmes aquatiques.

Résumé et conclusion relatifs à l'impact des produits de traitement du bois sur les biocénoses aquatiques

Quelques études, essentiellement nord-américaines, ont permis d'observer des perturbations engendrées par d'autres types de traitement du bois. En particulier, elles ont démontré que des traitements massifs mais ponctuels par pulvérisation de pyréthrianoïdes sont susceptibles d'engendrer un appauvrissement durable de la faune macrobenthique et piscicole plusieurs kilomètres à l'aval des zones d'épandage. Parallèlement, de rares approches ont mis en évidence l'importance des perturbations affectant les milieux aquatiques à l'aval de rejets chroniques ou accidentels de certains produits de préservation du bois au niveau de sites de traitement régulier, comme les scieries. Toutefois, ces travaux concernent des substances et des procédés d'application différents de ceux qui composent notre domaine d'étude.

En conclusion, les impacts potentiels sur les biocénoses aquatiques d'aires de traitement régulier du bois utilisant des pesticides dits de classe 2, ainsi que les impacts de pulvérisations occasionnelles de deltaméthrine sur des grumes demeurent très mal connues et nécessitent d'être étudiés en détail et avec précision.

I.3. Méthodes biologiques de diagnose de l'impact de substances toxiques sur les macro-invertébrés aquatiques

Dans le contexte de vulnérabilité des ressources en eau, l'une des considérations majeures à avoir vis-à-vis des effets délétères d'une contamination concerne la préservation de la structure (approche structurelle) et du fonctionnement (approche fonctionnelle) de l'écosystème (Jepson 1993, European Commission 2002a et 2003a, Ramade 2007). Ainsi, dans le cadre de l'évaluation de la qualité des milieux naturels, plusieurs stratégies biologiques complémentaires peuvent être utilisées (Amiard *et al.* 1998). Ce chapitre s'attache à décrire les principaux types d'approches utilisées pour caractériser l'impact de contaminations des eaux douces par des substances toxiques. En revanche, il ne prétend pas faire un bilan exhaustif des méthodes écotoxicologiques et bioindicatrices développées dans cet objectif. Plusieurs revues et ouvrages détaillées ont porté sur la bioindication, les bioessais et l'évaluation du risque (Lagadic *et al.* 1997 et 1998, Hallenbeck et Gochfeld 2000, Solomon 2001, Markert *et al.* 2003, Aubertot *et al.* 2005, Hansen *et al.* 2007, Ramade 2007).

Cette partie se limitera aux principaux types de méthodes de diagnose utilisant des macro-invertébrés aquatiques, bien que de nombreuses données écotoxicologiques et méthodologiques existent aussi vis-à-vis des autres organismes aquatiques. Le macrobenthos est très souvent utilisé en bioindication, en raison de son caractère intégrateur, de sa mobilité réduite, de la durée mensuelle à pluriannuelle des cycles de vie de ses composantes, ainsi que de son abondance et de sa variété (Linthurst 1995). La pertinence des observations réalisées dépend notamment du choix de l'espèce utilisée comme indicateur de changement. Il doit s'agir d'une « espèce-clé » (i) ou d'une « espèce indicatrice » (ii). La difficulté réside alors dans la signification à donner à ces deux termes (European Commission 2002a).

(i) Le terme « espèce-clé » peut être défini par rapport à sa sensibilité intrinsèque, à son rôle fonctionnel dans l'écosystème, ou à son influence sur la dynamique des autres espèces (Calow 1995, Babut *et al.* 2006). Elle est définie par Jepson (1993) comme étant l'espèce qui provoquerait les plus grands effets si elle était éliminée du système, et par Ramade (2007) comme une espèce dont le rôle est déterminant dans la structuration de la communauté. La Commission Européenne (2002) définit une « espèce-clé » comme étant une espèce ayant un rôle prépondérant dans le fonctionnement, la productivité, la stabilité ou la résilience d'un écosystème.

(ii) Une « espèce indicatrice » désigne soit une espèce susceptible d'être très informative sur l'état de l'écosystème, soit une espèce rare, en danger ou protégée par la loi (Giesy et Graney 1989, Jepson 1993, European Commission 2002a et 2003a)

Le choix de la variable écologique indicatrice doit également s'effectuer en fonction de sa pertinence socio-économique, de sa pertinence biologique, de sa capacité à être mesurable ou prédictible. La mesure de cette variable doit se faire de façon directe, être adaptée à l'échelle spatiale étudiée, à la voie d'exposition et à la dynamique de l'aire d'étude, avoir une faible variabilité naturelle, avoir une valeur diagnostic, être largement applicable à d'autres sites, et doit pouvoir être standardisée (Linthurst 1995).

I.3.1. Niveaux d'organisation biologique concernés par la bioindication

Le concept de bioindication peut concerner différentes échelles biologiques : de la molécule à la cellule, de l'individu à l'organe, de la population à la biocénose. La réponse de ces compartiments au stress engendré par des substances toxiques s'inscrit aussi dans une large gamme d'échelles temporelles allant de la réaction enzymologique instantanée à la modification pluriannuelle ou irréversible de la réponse des biocénoses (Caquet et Lagadic 1998, Fränzele 2006, Ramade 2007). Des paramètres biologiques peuvent être mesurés à ces différents niveaux et constituer autant de signaux indiquant qu'une perturbation a eu lieu et peuvent être utilisées pour évaluer l'état du système aquatique (Ramade 2007).

a) Réponses à l'échelle sub-individuelle (biomarqueurs)

Selon Lagadic *et al.* (1997), un biomarqueur désigne « un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'individu à au moins une substance chimique à caractère polluant ». Ces auteurs distinguent trois types de biomarqueurs : ceux informant quant à l'exposition à un xénobiotique, ceux révélant les effets des xénobiotiques, et ceux relatifs à la sensibilité aux effets provoqués par l'exposition.

Ces biomarqueurs opérant à l'échelle sub-individuelle, en particulier ceux dits d'effets et de sensibilité aux effets, ils permettent de détecter des effets à des concentrations inférieures au seuil engendrant une modification physiologique à l'échelle de l'individu. Ce type d'outil peut donc constituer une mesure intégrative à court terme, ce qui est qualifiée par Hagger (2006) d'approche « proactive » dans une démarche d'évaluation du risque. Néanmoins, afin de trouver sa pleine signification écotoxicologique, un biomarqueur mesuré au niveau individuel

doit permettre de décrire, d'expliquer, voire même parfois de prédire, les effets des contaminants sur les populations et communautés évoluant dans leur environnement naturel (Aubertot *et al.* 2005). La principale difficulté d'utilisation des biomarqueurs est alors liée à l'extrapolation des informations obtenues à cette échelle sub-individuelle.

Plusieurs auteurs ont travaillé sur l'évaluation de réponses de *G. pulex* à l'aide de divers biomarqueurs, avec, par exemple, l'activité de l'acétyl-cholinestérase et de la glutathione-S-transferase (McLoughlin *et al.* 2000, Triebkorn *et al.* 2002, Heckmann *et al.* 2005).

b) Réponses à l'échelle de l'individu

Certains changements biochimiques peuvent avoir des effets physiologiques chez l'ensemble de l'organisme. Des méthodes bioindicatrices peuvent ainsi utiliser les réponses obtenues à l'échelle de l'individu. Wogram et Liess (2001) ont tenté de classer les principaux ordres de macro-invertébrés aquatiques en fonction de leur tolérance physiologique respective à des pesticides organiques. Selon ces auteurs, l'ordre de sensibilité décroissante est le suivant :

Plecoptera (sensibles) < *Amphipoda* < *Ostracoda* < *Cladocera* < *Ephemeroptera* < *Decapoda* < *Copepoda* < *Diptera* < *Trichoptera* < *Odonata* < *Heteroptera* < *Coleoptera* < *Tricladida* < *Isopoda* < *Oligochaeta* < *Gastropoda* < *Hirudinea* < *Lamellibranchia* (tolérants).

Toutefois, ce classement peut être sujet à discussion tant les différences de sensibilité entre espèces d'un même groupe peuvent être importantes. En outre, la vulnérabilité relative des taxons est susceptible d'être profondément remaniée d'un pesticide à l'autre.

Chez *G. pulex*, les effets les plus communément mesurés à l'échelle individuelle sont la mortalité, le taux de nutrition, le taux de désappariement des amplexus précopulatoires et la vitesse de battement des pléopodes (Naylor 1989, Poulton et Pascoe 1990, Crane *et al.* 1995a, Malbouisson *et al.* 1995, Lawrence et Poulter 1998, Schulz et Liess 1999a...). Les effets létaux des produits de traitement du bois étudiés dans cette thèse sont documentés chez plusieurs organismes aquatiques dans le chapitre I.5.

c) Réponses à l'échelle de la population

Lorsqu'un grand nombre d'individus est affecté, les effets des substances toxiques sont décelables au sein des populations dont les performances écologiques peuvent être perturbées (Aubertot *et al.* 2005). Ainsi, l'effet le plus évident et le plus visible d'une contamination du milieu aquatique est l'élimination d'une partie des organismes au niveau de la zone d'impact

(Ramade 2007). Par conséquent, l'analyse d'une population au niveau d'un site contaminé, et sa comparaison avec celles de sites témoins ou référentiels, fournissent des informations quant à la modification des structures démographiques engendrées par la contamination (Newman 2001). Ces effets sur les densités et la structure de la population peuvent être la conséquence directe d'une surmortalité, mais peuvent aussi résulter d'une sélection naturelle ou d'une altération de paramètres sub-létaux tel que le succès reproducteur (Newman 2001, Ramade 1995 et 2007). Afin de pouvoir estimer pertinemment les effets de la contamination sur les divers paramètres mesurés au sein de la population, ce type d'étude exige donc une bonne connaissance du cycle de vie de l'espèce en question ainsi qu'une bonne compréhension de son comportement au niveau du site d'étude (Newman 2001). Les réponses de *G. pulex* aux contaminations par des substances toxiques sont évoquées dans le chapitre suivant.

d) Réponses à l'échelle de la communauté

A terme, les déséquilibres engendrés par la disparition ou l'expansion excessive de quelques populations peuvent se répercuter sur l'ensemble des communautés, modifiant ainsi le fonctionnement de l'écosystème dans son ensemble (Aubertot *et al.* 2005). L'altération du milieu aquatique par des substances toxiques peut ainsi se traduire par une réduction de la densité et la diversité spécifique du peuplement. Le raisonnement se fera alors à l'échelle de la communauté.

Selon Verneaux (1980), deux principaux groupes de méthodes de bioindication sont utilisées à l'échelle de la communauté : d'une part les méthodes fondées sur la présence d'organismes considérés comme indicateurs d'un type de contamination (systèmes des « saprobies » par exemple), et d'autre part les méthodes globales fondées sur l'examen de tout ou partie des peuplements aquatiques et où l'absence de certaines espèces est aussi importante que leur présence (catégorie à laquelle appartient l'Indice Biologique Global Normalisé, par exemple).

Gray (1980) indique que l'évaluation de l'impact d'une pollution via des indices de diversité basés sur les communautés benthiques est souvent biaisée par le cycle de vie propre à chaque taxon : ce sont parfois les espèces ayant une plus grande faculté d'adaptation qui prédominent, y compris sur les espèces intrinsèquement davantage tolérantes. Ainsi, plutôt que d'évaluer la sensibilité intrinsèque des différentes espèces aux substances toxiques, Sherratt *et al.* (1999) ainsi que Barnthouse (2004) ont tenté de modéliser la capacité de recolonisation de grands groupes taxonomiques à partir de certains de leurs caractères biologiques afin d'évaluer les conséquences écologiques à long terme d'une exposition à des pesticides.

Avec le même type de démarche prédictive, Liess et Ohe (2005) ont proposé d'établir une liste d'espèces « à risque » et une liste d'espèces dite « non à risque » qui tiennent compte de leur sensibilité intrinsèque, mais aussi de certains caractères biologiques comme le temps de génération, la capacité migratoire, ou la vulnérabilité de leur stade de développement lors des périodes d'exposition aux pesticides (Tableau I.2).

Embranchement	Classe	Ordre ou sous-Ordre	Famille	Espèce	"Espèces à risque" selon Liess et Ohe (2005)	Bioindicateur "positif" ou "négatif" selon Neumann <i>et al.</i> (2003b)		
Annelida	Hirudinea		Erpobdellidae		-			
				<i>Erpobdella octoculata</i>		P		
			Glossophoniidae		-			
				<i>Glossiphonia complanata</i> <i>Glossiphonia heteroclita</i>		N P		
			Oligochaeta		Hirudidae		-	
					Piscicolidae		-	
	Lumbricidae				-			
	Lumbriculidae				-			
	Naididae				-			
	Crustacea	Amphipoda	Corophiidae		-			
				<i>Gammarus pulex</i>	-*	P		
			Cladocera	Daphniidae	<i>Daphnia sp.</i>	-		
		Decapoda	Astacidae	<i>Orconectes limosus</i>	-			
Atyidae			<i>Atyaephyra desmarestii</i>	+				
Isopoda		Asellidae	<i>Eriocheir sinensis</i>	+				
			<i>Asellus aquaticus</i> <i>Proasellus coxalis</i>	+	N -			
Insecta	Coleoptera	Donaciidae		-				
		Dryopidae		-				
		Dytiscidae		-	P			
			<i>Agabus sp.</i> <i>Platambus maculatus</i>	-	N N			
		Elmidae		-				
	<i>Elmis sp.</i>		P					

Tableau I.2. Partie 1/4 : classification des taxons macrobenthiques selon leur sensibilité aux contaminants. Selon Liess et Ohe (2005), « + » : espèce à risque ; « - » : espèce non à risque ; « * » : taxon classé non à risque en raison de sa mobilité. Selon Neumann *et al.* (2003a et 2003b), « P » : taxon positivement corrélé avec le degré de contamination ; « N » : taxon négativement corrélé avec le degré de contamination (adapté et modifié de Liess et Ohe 2005 et Neumann *et al.* 2003b).

Embranchement	Classe	Ordre ou sous-Ordre	Famille	Espèce	"Espèces à risque" selon Liess et Ohe (2005)	Bioindicateur "positif" ou "négatif" selon Neumann <i>et al.</i> (2003b)	
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Gyrinidae		-		
			Halipilidae		-		
				<i>Brychius elevatus</i>	-		
				<i>Haliplus sp.</i>		N	
				<i>Helodidae</i>	-		
				<i>Helodes sp.</i>		P	
				<i>Hydraenidae</i>	-		
				<i>Hydrophilidae</i>	-		
				<i>Noteridae</i>	-		
				<i>Scirtidae</i>	<i>Scirtes sp.</i>	-	
			Diptera	Ceratopogonidae	-	P	
				Chaoboridae	-		
				Chironomidae	-	N	
				Culicidae	-		
		Dixidae		+			
		Dolichopodidae		<i>Poecilobothrus sp.</i>	+		
		Limoniidae		+			
		Muscidae		<i>Limnophora sp.</i>	+		
		Psychodidae		-			
		Ptychopteridae		<i>Ptychoptera sp.</i>	+	N	
		Rhagionidae		-			
		Simuliidae		<i>Simulium sp.</i>	-	N	
		Stratiomyiidae		<i>Stictotarsus duodecimpustulatus</i>	+		
		Syrphidae		-			
		Tabanidae		+			
		Tanyopodinae		-			
		Tipulidae		+	N		
		Heteroptera		Coroxidae	+		
					<i>Corixa punctata</i>	-	
					<i>Sigara sp.</i>	+	
				Gerridae	-		
				Hydrometridae	<i>Hydrometra stagnorum</i>	-	
				Naucoridae	<i>Hyocoris cimicoides</i>	-	
			Nepidae	-			
			Notonectidae	-			
			Pleidae	-			
			Veliidae	<i>Velia caprai</i>	-		
		Megaloptera	Sialidae	+			
			<i>Sialis lutaria</i>		N		
		Plecoptera	Capniidae	<i>Capnia bifrons</i>	-		
			Chloroperlidae		+		
				<i>Isoptena serricornis</i>	-		
				<i>Siphonoperla sp.</i>	-		
			Leuctridae		+		
				<i>Leuctra hipopus</i>	-		
			<i>Leuctra niveola</i>	-			
			<i>Leuctra proma</i>	-			

Tableau I.2. Suite (Partie 2/4).

Embranchement	Classe	Ordre ou sous-Ordre	Famille	Espèce	"Espèces à risque" selon Liess et Ohe (2005)	Bioindicateur "positif" ou "négatif" selon Neumann <i>et al.</i> (2003b)		
Arthropoda	Insecta	Plecoptera	Nemouridae	<i>Nemoura sp.</i>	+			
				<i>Nemoura cinerea</i>	+	N		
			Perlodidae	<i>Perlodes microcephalus</i>	+			
					-			
			Taeniopterygidae	<i>Brachyptera risi</i>	-			
					-			
			Trichoptera	Beraeidae			+	
					Brachycentridae	<i>Brachycentrus subnubilus</i>	-	
				Ecnomidae	<i>Ecnomus tenellus</i>	+		
				Glossosomatidae	<i>Agapetus fuscipes</i>	+		
				Goeridae			+	
				Hydropsychidae	<i>Hydropsyche angustipennis</i>			N
				Hydroptilidae	<i>Hydroptila vectis</i>	+		
					-			
		Lepidostomatidae				+		
						+		
		Leptoceridae				+		
						+		
		Limnephilidae		<i>Anobolia nervosa</i>	-*		N	
				<i>Chaetopterix villosa</i>			N	
			<i>Halesus radiatus</i>			P		
			<i>Ironoqia dubia</i>			N		
			<i>Limnephilus lunatus</i>	-*		N		
			<i>Limnephilus extricatus</i>			N		
			<i>Limnephilus rhombicus</i>			N		
			<i>Micropterna sp.</i>	-				
			<i>Molania augustata</i>	+				
			<i>Odontocerum albicorne</i>	+				
		Philopotamidae	<i>Wormaldia occipitalis</i>	+				
				+				
		Phryganeidae	<i>Oligostomis reticulata</i>	-				
			<i>Oligotricha striata</i>	-				
		Polycentropodidae	<i>Plectrocnemia conspersa</i>	+		N		
		Psychomyiidae			+			
		Rhyacophilidae			+			
		Sericostomatidae			+			
		Uenoidae			+			
		Ephemeroptera	Baetidae	<i>Baetis rhodani</i>	-			
				<i>Baetis vemus</i>		N		
				<i>Baetis sp.</i>		N		
			<i>Centroptilum luteolum</i>	-				
			<i>Cloeon dipterum</i>	+				
<i>Procloeon sp.</i>	+							
Caenidae			+					
Ephemereliidae			+					

Tableau I.2. Suite (Partie 3/4).

Embranchement	Classe	Ordre ou sous-Ordre	Famille	Espèce	"Espèces à risque" selon Liess et Ohe (2005)	Bioindicateur "positif" ou "négatif" selon Neumann <i>et al.</i> (2003b)	
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Ephemeridae	<i>Ephemera danica</i>	+	N	
			Heptageniidae	<i>Heptagenia sulphurea</i>	-		
			Leptophlebiidae		+		
			Siphonuridae		+		
			Odonata	Aeshmidae	<i>Aeshna cyanea</i>	-	
				Calopterygidae		+	
		Coenagrionidae			+		
		Cordulegasteridae		<i>Cordulegaster boltoni</i>	-		
		Corduliidae			-		
		Gomphidae			-		
		Lestidae			-		
		Libellulidae			-		
		Platycnemididae		<i>Platcnemis pennipes</i>	-		
		Mollusca	Basommatophora	Acroloxidae		-	
				Ancylidae	<i>Ancylus fluviatilis</i>	-	
Lymnaeidae	<i>Lymnaea stagnalis</i>			-			
	<i>Radix ovata</i>			-	P		
Physidae	<i>Physa acuta</i>			-			
				-			
Mollusca	Eulamellibranchia	Planorbidae		-			
		Dreissenidae		-			
		Sphaeriidae		-			
			<i>Pisidium sp.</i>	-	P		
		Unionidae		-			
Mollusca	Prosobranchia	Bithyniidae		-			
		Hydrobiidae		-			
			<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	-	P		
		Valvatidae		-			
Mollusca	Prosobranchia	Viviparidae	<i>Viviparus contectus</i>	-			
				-			
Plathelminthes	Turbellaria	Dendrocoelidae	<i>Dendrocoelum lacteum</i>	-			
		Dugesiidae	<i>Dugesia gonocephala</i>	-	P		
		Planariidae		-			

Tableau I.2. Suite et fin (Partie 4/4).

Plutôt que d'interpréter des caractères écologiques et biologiques afin de prédire une tolérance théorique dans le milieu naturel, Friberg *et al.* (2003) ont observé les corrélations entre les abondances de certains invertébrés aquatiques et le degré de contamination des sédiments de 29 cours d'eau danois. Les auteurs ont alors constaté une corrélation négative pour

l'amphipode *Gammarus pulex*, alors que les densités d'oligochètes et d'hirudinés étaient corrélées positivement avec le niveau de contamination.

Le système LIMPACT développé par Neumann *et al.* (2003b), est aussi basé sur des observations de terrain. Il repose sur les compositions faunistiques de 104 ruisseaux implantés dans des aires agricoles plus ou moins polluées. Une classification des taxons est proposée selon que leurs abondances sont positivement ou négativement corrélées avec le degré de contamination (Tableau I.2). Ce classement illustre, notamment, la forte hétérogénéité entre groupes taxonomiques quant à leur vulnérabilité aux substances toxiques. En outre, les auteurs indiquent un effet notable de la présence de sections non influencées à l'amont sur la composition faunistique des zones contaminées, en particulier vis-à-vis de la présence de taxons classés comme « à risque ».

Contrairement à ce qui a été observé par Friberg *et al.* (2003), et conformément à ce qui a été prédit par Liess et Ohe (2005), *Gammarus pulex* est classé par le système LIMPACT comme faisant partie des taxons tolérant aux substances toxiques. Ces contradictions, peut-être seulement apparentes, illustrent la nécessité de mieux appréhender la variabilité de la vulnérabilité des espèces ainsi que la résilience des écosystèmes aquatiques.

I.3.2. Approches holistiques et réductionnistes

a) Tests écotoxicologiques réalisés en conditions contrôlées

Les tests réalisés en conditions contrôlées sont relativement simples, reproductibles et standardisables. Ils correspondent à une approche réductionniste de la problématique, cette dernière étant par essence mécanistique. Les tests d'écotoxicité aigu, sub-chronique ou chronique réalisés selon cette démarche doivent favoriser l'établissement d'un lien de causalité entre une variable et l'effet mesuré (Ramade 2007). Ainsi, ces tests sont utilisés entre autres pour déterminer la NOEC (*No Observed Effect Concentration*), la LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*) et des EC50 (*Effect Concentration on 50% of individuals*) par des courbes dose-réponse. Une PNEC (*Predicted No-Effect Concentration*) peut être ainsi évaluée, le rapport PEC (*Predicted Environment Concentration*) sur PNEC servant à évaluer le risque pour l'écosystème.

Les invertébrés *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia dubia* sont de loin les organismes d'eau douce les plus utilisés pour les tests d'écotoxicité aiguë. L'amphipode

Hyallela azteca et les chironomes *Chironomus tentans* et *Chironomus riparius* sont également fréquemment utilisés pour l'évaluation de la toxicité de sédiments d'eau douce (Linthurst 1995, Fränzle 2006). Bien que de nombreux autres tests de toxicité aiguë et chronique aient été développés et proposés, très peu d'entre eux sont utilisés en routine pour l'évaluation de la toxicité. C'est le cas, par exemple, du test de toxicité aiguë utilisant *Gammarus sp.* proposé par l'US E.P.A. (1996). Les principales raisons sont la difficulté de maintenir la culture d'une population saine en laboratoire pendant une longue période, ce qui entrave la standardisation du test (Calow 1994).

Les résultats issus de ces tests réalisés en conditions très contrôlées sont difficilement extrapolables à des réponses produites en conditions naturelles en raison de la complexité des interactions opérant dans les écosystèmes (Wogram et Liess 2001, Fränzle 2006, Ramade 2007). A titre d'exemple, Lopes (2005) a tenté de modéliser les conséquences d'une contamination sur une population dans son milieu naturel à partir de données écotoxicologiques obtenues en laboratoire (variations de sensibilité selon l'âge notamment). La capacité prédictive de cette modélisation et son extrapolation à diverses situations ont été limitées en raison de son application à une seule variable (la mortalité), à une unique espèce (*Chironomus riparius*), et à un seul pesticide (le methiocarb).

b) Tests écotoxicologique réalisés en conditions semi-contrôlées

En intégrant davantage de complexité au système, les tests écotoxicologiques réalisés en conditions semi-contrôlées permettent de gagner en représentativité écologique. L'inconvénient de ce type de dispositif est qu'il perd de la reproductibilité. Ce type d'expérimentation permet donc de faire le lien entre des approches réductionnistes et holistiques (Ramade 2007).

Plusieurs types de dispositifs destinés à des expérimentations en conditions semi-contrôlées ont été développés. Les microcosmes et les mésocosmes sont particulièrement destinés à pallier à la déficience de représentativité des conditions opérantes en milieu naturel, tout en essayant de conserver un lien de causalité entre la présence d'une substance toxique et l'effet mesuré (Ramade 2007). Ainsi, de nombreuses études réalisées en mésocosmes ont permis de tester la réponse de *G. pulex* à diverses contraintes (Crane *et al.* 1999, Heckmann et Friberg 2005, Roessink *et al.* 2005, Van Wijngaarden *et al.* 2006...).

Les tests de toxicité ambiante consistent à tester en conditions contrôlées la toxicité d'une eau (ou d'un effluent) prélevé moins de 24h auparavant dans le milieu naturel. Ces tests sont rapides et intègrent l'ensemble des substances dissoutes dans l'eau au moment du prélèvement, mais ils ne permettent pas d'établir avec certitude un lien de causalité entre la présence d'une substance toxique en particulier et l'effet mesuré. Là encore, les amphipodes se sont révélés très sensibles aux divers effluents testés (Roddie *et al.* 1992, Maltby *et al.* 2000).

Les tests d'exposition d'organismes réalisés *in situ*, ou bioessais *in situ*, concerne généralement une seule espèce, leur nombre et leur état physiologique initiale étant contrôlés. L'exposition aux substances toxiques est proche des conditions naturelles en raison de l'installation *in situ* de dispositifs standardisés, souvent des cages, dans le milieu naturel contaminé. Ce procédé permet notamment de réaliser des réplicats dans des études du type amont-aval ou avant-après (Calow 1995). On parle alors de bioindication active, par opposition à la bioindication passive où les organismes sont prélevés directement dans le milieu. La pertinence de ce type d'expérimentation dépend directement du choix de l'organisme test et de la variable mesurée : l'effet observé doit avoir un lien direct avec l'état de perturbation de l'écosystème (Calow 1989).

L'amphipode *Gammarus pulex* figure parmi les invertébrés les plus utilisés dans ce type d'expérimentation (Chappie et Burton 2000) : on mesure principalement son taux de nutrition et sa mortalité (Naylor 1989, Schulz et Liess 1999a, Crane *et al.* 1995a, Veerasingham et Crane 1992, Maltby *et al.* 2002, Matthiessen *et al.* 1995, Forrow et Maltby 2000, Mulliss *et al.* 1996a et 1996b, Bloor et Banks 2006, Bascombe *et al.* 1990, Crane et Maltby 1991). D'autres amphipodes (*G. minus*, *G. pseudolimnaeus*, *Hyallolella azteca*), d'autres crustacés (*Asellus aquaticus*), certains insectes (*Limnephilus lunatus*, *Chironomus riparius*, *C. tentans*, *Aedes aegypti*), ou des mollusques (*Anodonta cygnaea*) sont aussi parfois utilisés dans ces dispositifs implantés *in situ* (Schulz et Liess 1999a, Crane *et al.* 1995b, Tucker et Burton 1999, Bloor et Banks 2006, Helson *et al.* 1986, Lieb et Carline 2000, Schulz 2003). Cette liste d'organismes-test est loin d'être exhaustive.

c) Tests écotoxicologique réalisés en conditions naturelles

Les études effectuées *in natura* sont les plus informatives quant à l'intégrité biologique du système aquatique. Cette approche, qualifiée d'holistique par Ramade (2007), relève donc des concepts et paradigmes propres à l'écologie. Elle fait appel en particulier à la notion de

bioindication passive, les organismes étant naturellement présent dans le milieu. En fonction des caractéristiques biologiques de l'espèce ou du groupe choisi, mais aussi de la structure physique du milieu et des objectifs de l'étude, l'échantillonnage pourra se faire de façon aléatoire, stratifiée, ou non aléatoire (Linthurst 1995).

Il n'existe pas de méthode normalisée pleinement satisfaisante pour évaluer l'impact *in natura* de substances toxiques sur les milieux aquatiques. Ceci s'explique notamment par la complexité et l'unicité de chaque écosystème aquatique (absence de reproductibilité), ainsi que par le très grand nombre de types de substances toxiques avec chacune sa spécificité en terme de devenir environnemental et de mode d'action toxique (Ramade 2007). L'impact sur une population dépend notamment du degré et de la fréquence de contamination mais aussi de la nature des substances toxiques et de la configuration du site (Linthurst 1995, Newman 2001, Barnthouse 2004, Caquet *et al* 2007). L'extrapolation de la perturbation de la population d'un site à un autre est par conséquent délicate à réaliser. Ainsi, par exemple, l'indice oligochète IOBS (Lafont 1984, Norme AFNOR NF T90-390 2002) a été élaboré afin de traduire une perturbation engendrée par des métaux lourds. Cependant, la valeur de cet indice est également influencée par la teneur en matière organique du milieu, par la granulométrie du substrat, et elle est directement liée à la qualité des eaux hyporhéiques (Lafont 1984, Prygiel *et al.* 1999).

Dans ce type d'étude, il est essentiel de connaître la part de la réponse biologique imputable à la contamination du milieu, et la part imputable aux fluctuations naturelles de facteurs environnementaux (température, luminosité, pH...). Ces paramètres peuvent ainsi avoir une part considérable dans les modifications populationnelles entre différents sites, et ils peuvent même être prépondérants sur les effets imputables aux pesticides (Topping et Odderskaer 2004). Pour toutes ces raisons, lors d'études réalisées en conditions naturelles, il est toujours difficile d'établir un lien de cause à effet qui soit à la fois clair, précis et indiscutable. De manière générale, les observations *in natura* sont simplement corrélées à une ou des variable(s), et on ne peut exprimer avec certitude un lien de causalité.

Résumé relatif aux méthodes biologiques de diagnose de l'impact de substances toxiques sur les macro-invertébrés aquatiques

Le concept de bioindication peut faire appel à tous les niveaux d'organisation biologique, chacun ayant son propre caractère intégrateur. Les démarches utilisées peuvent faire appel à des approches réductionnistes, holistiques, ou intermédiaires entre ces deux niveaux de complexité. Ces stratégies biologiques sont complémentaires entre elles.

Des classifications des macro-invertébrés aquatiques réalisés sur la base de leur sensibilité physiologique aux pesticides, de leurs caractères biologiques et écologiques, ou d'observations réalisées *in natura* ont été établies par plusieurs auteurs. Aucune de ces approches n'est pleinement satisfaisante, notamment du fait de la complexité des systèmes naturels. A titre illustratif, la sensibilité de réponse *in natura* d'organismes tel que *Gammarus pulex* est encore un sujet qui ne fait pas consensus.

I.4. Sources, transferts et devenir de la deltaméthrine, de la cyperméthrine, de l'IPBC, du propiconazole et du tébuconazole

La présente thèse a trait à cinq matières actives parmi les plus utilisées dans le traitement du bois. Ces molécules appartiennent à trois familles de pesticides, chacune ayant ses propres propriétés physico-chimiques et donc son comportement propre dans le milieu environnant.

Ce chapitre a pour objet de résumer les principales caractéristiques physico-chimiques de ces substances, et les principaux mécanismes qui régissent leurs transferts depuis leurs sources jusqu'à leur dégradation. La compréhension de ces phénomènes est un préalable à une estimation pertinente du risque d'exposition des organismes aquatiques à ces molécules, et donc du risque engendré par leur utilisation.

Les pyréthrinoïdes de synthèse, cyperméthrine et deltaméthrine, sont de loin les substances les plus étudiées parmi les cinq molécules étudiées. Le chapitre suivant décrit les sources potentielles de ces cinq molécules, leurs principales propriétés de transferts, ainsi que leur dégradation respective.

1.4.1. Pyréthrinoïdes de synthèse

a) Sources

Les premières substances synthétisées pour leurs propriétés insecticides ont été développées à la fin du 19^{ème} siècle et au début du 20^{ème} siècle avec le dinitro-orthocresol (1892) et le chloropicrin (1907). Les composés insecticides sont usuellement groupés en plusieurs familles : la famille du DDT (qui contient entre autres le methoxychlor et le perthane), les autres substances organo-chlorées (lindane, aldrine, dieldrine, endosulfan...), les composés organo-phosphorés (parathion, malathion, dichlorvos...), les insecticides carbamates (propraxur, aldicarb, pirimicarb...). En 1974, ces 3 familles représentaient 97.0% du marché mondial des insecticides, avec une prédominance des organochlorés (55.0%, Roussel UCLAF 1982). Par la suite, une autre famille d'insecticides, les pyréthrinoïdes de synthèse, a été développée à partir des composés naturellement insecticides présents dans le pyrethrum, i.e. de la poudre de fleurs séchées de *Chrysanthemum roseum* et de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. La propriété insecticide du pyrethrum a été découverte par Staudinger et Ruzicka en 1924, puis afin d'en améliorer les performances, de nombreuses substances ont été

créées, dont la deltaméthrine et la cyperméthrine qui ont été synthétisées en 1974 et 1977 respectivement (Roussel UCLAF 1982).

Plus de 45 spécialités autorisées pour un usage agricole en France renfermaient de la cyperméthrine et 45 autres spécialités renfermaient de la deltaméthrine en 2007. Ces matières actives peuvent être utilisées sur toutes cultures pour le traitement contre les noctuelles. Elles sont aussi employées sur certains types de cultures selon les insectes nuisibles à éliminer : grandes cultures (betterave, céréales, crucifères oléagineuses, féverole, lin, maïs, pois, pomme de terre...), viticulture, arbres fruitiers (abricotier, amandier, cerisier, châtaignier, figuier, kiwi, noisetier, noyer, olivier, pêcher, poirier, pommier, prunier, mirabellier...), ou cultures légumières (ail, échalote, oignon, poireau, asperge, aubergine, betterave potagère, bette, chou, concombre, cornichon, courgette, cresson alénois, épinard, haricot, fraisier, laitue, scarole, frisée, pissenlit, lentille, maïs doux, poivron, tomate, radis...). La deltaméthrine est aussi utilisée en cultures ornementales (arbres et arbustes d'ornement, platane, rosier) et en cultures forestières afin de lutter contre la chenille processionnaire du pin, la cochenille du pin maritime, l'hylobe et les ravageurs des très jeunes plants de forêt.

Ces molécules sont généralement appliquées sur les parties aériennes des plantes. Quelques utilisations se font par une application directe sur le sol notamment pour lutter contre le vers gris et les noctuelles terricoles (Ministère de l'agriculture 2007, e-phy.agriculture.gouv.fr). Les lieux de stockage des produits agricoles (entrepôts, caquettes en bois) et les produits de récolte tels que les céréales ou les bois abattus sont aussi susceptibles d'être traités par ces substances. D'autres utilisations de ces pyréthrinoïdes de synthèse sont rapportées dans des pays étrangers (liste non exhaustive) : élevage de moutons en Australie ou de saumons atlantiques en Norvège (lutte contre des ectoparasites), lutte anti-moustiques et autres vecteurs de grandes endémies en Afrique (directement dans le milieu naturel ou sur les moustiquaires), lutte contre les invasions de criquets notamment en Afrique, imprégnation de la laine en industrie du textile en Grande-Bretagne (lutte contre les mites).

La cyperméthrine et la deltaméthrine sont donc utilisés en agriculture, en milieu forestier, en horticulture, contre les pestes animales ou les parasites du bois ou des plantes, ainsi que pour la démoustication des zones infestées. Malgré l'importance de ces molécules pour l'économie et la santé, il est très difficile d'obtenir des données chiffrées concernant les quantités de substances mises sur le marché français ou européen. De nombreux auteurs soulignent l'utilisation intensive de ces molécules dans diverses régions du monde. La consommation

mondiale de ces insecticides totalisant plus de 100 000 tonnes par an à la fin des années 1990 (White 1999). A titre d'exemple, entre 1992 et 2002, environ 125 tonnes de pyréthrinoïdes étaient utilisées annuellement pour l'agriculture en Californie, les usages non agricoles de ces pesticides n'étant pas négligeables puisqu'ils atteignaient 231 tonnes en 2002, soit cinq fois plus qu'au début des années 1990 (Amweg *et al.* 2005).

b) Transferts dans le milieu aquatique : dissolution, mobilité et adsorption

Les caractéristiques physico-chimiques de la cyperméthrine et de la deltaméthrine les rendent *a priori* peu mobiles dans l'environnement (Tableaux I.3 et I.4). Leurs transferts sont limités par leurs très faibles pression de vapeur et solubilité dans l'eau, ainsi que par leurs forts coefficients de partage (K_d , K_{oc} et K_{ow}) indiquant la propension de ces pesticides à être fortement adsorbés sur les particules solides en particulier organiques. En conséquence, les pyréthrinoïdes sont très peu sujets aux transferts verticaux dans les sédiments ou les sols. Ainsi, près de 99% de la cyperméthrine restent dans les 5 premiers centimètres du sol à l'issue d'une précipitation simulée de 67,5 cm, y compris dans les sols ayant une faible teneur en matière organique qui sont *a priori* moins adsorbants (Sakata *et al.* 1986, WHO 1989). La deltaméthrine se comporte de manière similaire : 92-97% restent dans les 2,5 premiers centimètres (Kaufman *et al.* 1981, Zhu et Selim 2002a). En théorie, si l'on se réfère à leurs propriétés, ces pesticides sont donc dégradés dans le sol plutôt que transférés vers le compartiment aquatique. Néanmoins, la plupart de ces études ont été réalisées en laboratoire, dans des conditions ne rendant pas compte de l'intégralité des phénomènes opérant en milieu naturel. De plus, il semblerait qu'une application répétée de ces pesticides tend à augmenter leur mobilité dans le sol (Ismail et Kalithasan 2003).

Si le transfert vertical des pyréthrinoïdes de synthèse dans le sol est très limité, les transferts horizontaux par ruissellement des particules contaminées sont en revanche plus probables. Ainsi, même si la grande majorité des pesticides épandus reste « sur place » (entre 78 et 97%), une fraction non négligeable (pouvant dépasser 10%) est susceptible d'être transférée vers le milieu aquatique environnant *via* le transport des particules solides, surtout si un évènement pluvieux intervient peu de temps après un traitement (Zhu et Selim 2002b). De la même façon, le transport de particules sédimentaires vers l'aval est susceptible d'exporter les contaminants vers des zones éloignées du lieu de traitement. Néanmoins, ce mécanisme de transfert serait beaucoup moins fort qu'une arrivée directe de pesticides dans le milieu aquatique *via* une dérive de l'aérosol selon Hadfield *et al.* (1993).

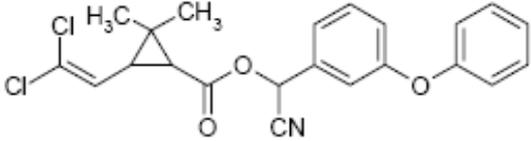
Nom commun (F-ISO)	Cyperméthrine
Nom chimique (IUPAC)	(RS)-alpha-cyano-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate
No CAS	52315-07-8
Formule moléculaire	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃
Structure moléculaire	
Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	416,3
Température de fusion	61-83°C
Température d'ébullition	216°C
Stabilité thermique	jusqu'à 220°C
Apparence	cristaux visqueux brun-jaune
Densité relative	1,204 g.mL ⁻¹ à 25°C, 1,240 à 20°C
Pression de vapeur	3.10 ⁻⁹ mm Hg à 20°C, 2.10 ⁻⁴ mPa à 20°C
Constante de Henry	2.10 ⁻² Pa.m ³ .mol ⁻¹
Solubilité dans l'eau	4-10 µg.L ⁻¹
Solubilité dans les solvants organiques	Acétone : >450 g.L ⁻¹ à 20°C Chloroforme : > 450 g.L ⁻¹ à 20°C Cyclohexanone : > 450 g.L ⁻¹ à 20°C Xylène : > 450 g.L ⁻¹ à 20°C Ethanol : 337 g.L ⁻¹ à 20°C Hexane : 103 g.L ⁻¹ à 20°C
Coefficient de partage octanol/eau (log Kow)	4,47-6,60 (généralement 5,5-5,6 à 25°C)
Absorption aux UV (lambda max)	204 et 278 nm
Photostabilité dans l'eau (DT50)	12,4 - 14,8 jours
DT50 hydrolyse	cis- : 221 jours ; trans- : 136 jours (25°C) 7-63 jours
DT50 dans l'eau en présence de sédiment	0,4-2,4 jours / 3 -17 jours (selon sources)
DT50 dans le système eau + sédiment	6,4-50 jours
Stabilité dans le sol (DT50)	60 jours en conditions aérobiques et anaérobiques 7-50 jours
Principaux produits de dégradation décrits	Acide 3-phenoxybenzoïque (PBAc) (DT50 = 2,1-3 j) Acide carboxylique de cyclopropane (CPA) (DT50 = 13,9-36,8 j) Alcool 3-phenoxybenzoïque (PBAI)
Constante de dissociation avec le carbone organique (Koc)	20800 to 385000 L.kg ⁻¹ (LogKoc : 3,3-5,0)
Constante de dissociation (Kd)	821-1042

Tableau I.3 Principales caractéristiques physico-chimiques de la cyperméthrine. Sources : US EPA 2006a, UK Environment Agency 2002, European Commission 2005.

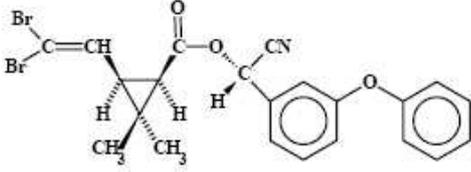
Nom commun (F-ISO)	Deltaméthrine
Nom chimique (IUPAC)	(S)-alpha-cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate
No CAS	52918-63-5
Formule moléculaire	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃
Structure moléculaire	
Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	505,2
Température de fusion	100-102 °C
Température d'ébullition	Se décompose avant d'entrer en ébullition
Stabilité thermique	Jusqu'à au moins 190°C
Apparence	Poudre blanche
Densité relative	0,550 g.cm ⁻³
Pression de vapeur	1,24.10 ⁻⁸ - 4.10 ⁻⁸ Pa, 25 °C
Constante de Henry	3,1.10 ⁻² Pa.m ³ .mol ⁻¹ , 25 °C
Solubilité dans l'eau	< 0,2 µg.L ⁻¹ (25°C) - 2 µg.L ⁻¹ (20°C)
Solubilité dans les solvants organiques	1,2-dichloroéthane : > 600 g.L ⁻¹ , 20°C Acétone : 300-600 g.L ⁻¹ , 20°C Diméthylsulfoxyde : 200-300 g.L ⁻¹ , 20°C Ethyl acetate : 200-300 g.L ⁻¹ , 20°C Xylène : 175 g.L ⁻¹ , 25°C Acétonitrile : 60-75 g.L ⁻¹ , 20°C Méthanol : 8,15 g.L ⁻¹ , 20°C n-heptane : 2,47 g.L ⁻¹ , 20°C
Coefficient de partage (log Kow)	4,6 (25°C, pH 7,6) - 5,43
Absorption aux UV (lambda max)	267, 271 and 278 nm
Photostabilité dans l'eau	Phototransformation directe t _{1/2} = 48 jours Phototransformation indirecte t _{1/2} = 4 jours
DT50 hydrolyse	2,5 jours (25°C, pH9)
DT50 dans l'eau en présence de sédiment	17 heures
DT50 dans le système eau + sédiment	40-90 jours
Stabilité dans le sol (DT50)	26 jours en conditions aérobiques à 25°C 35 à 55 jours en conditions aérobiques à 10°C 7 à 28 jours en conditions naturelles
Principaux produits de dégradation décrits	Acide décaméthrinique (Br ₂ CA) (DT50 = 2,3-21 j) Acide cyclopropanocarboxylique (CPAc) (DT50 = 13,9-36,8j)
Constante de dissociation avec le carbone organique (Koc)	4,6.10 ⁵ - 1,63.10 ⁷ cm ³ .g ⁻¹
Constante de dissociation (Kd)	3 790 - 30 000

Tableau I.4. Principales caractéristiques physico-chimiques de la deltaméthrine. Sources : *European Commission 2002b, WHO 1990.*

Lorsque les pyréthriinoïdes de synthèse sont pulvérisés par aérosol et contaminent le milieu aquatique, ils restent à la surface du système aquatique à l'image d'une substance huileuse. Seule une petite partie est transférée à l'intérieur de la colonne d'eau (8-16% selon Crossland *et al.* 1982). Cette colonne d'eau se décontamine en quelques jours (90% en 3 jours selon ces mêmes auteurs). Cette rapide dissipation est essentiellement liée à l'adsorption des contaminants sur les substrats aquatiques, la partie organique du sédiment jouant un rôle majeur dans ce phénomène. A teneur organique équivalente, les sédiments composés de particules très fines (limons et surtout argiles) adsorberont davantage que ceux présentant une granulométrie plus grossière et donc une surface d'adsorption moindre. Le transfert des pyréthriinoïdes de synthèse dépend du type de substrat, du taux de matières en suspension et de la teneur en carbone organique (Rawn *et al.* 1982, Sundaram 1991, Caquet *et al.* 1992, Hadfield *et al.* 1993).

Les mécanismes régissant la désorption de molécules non-polaires, tels que les pyréthriinoïdes de synthèse, sont incomplètement élucidés. En effet, l'hydrosolubilité de la molécule n'explique pas son taux de désorption. En revanche, les mécanismes en jeu lors d'une phase de désorption lente sont liés au coefficient de partage de la molécule avec le carbone organique : plus le Koc sera faible, plus la phase de désorption lente sera intense (Birdwell *et al.* 2007). Selon Ali et Baugh (2003), la deltaméthrine a tendance à davantage désorber que la cyperméthrine. Malgré la possibilité pour ces pyréthriinoïdes de synthèse de désorber des particules, Berenzen *et al.* (2005b) n'ont pas détecté ces insecticides dans les eaux de ruissellement d'une zone récemment traitée par ces molécules. Pour ces raisons, la biodisponibilité de ces pesticides pour les organismes aquatiques est très variable selon les conditions environnementales (Zhou *et al.* 1997, Bondarenko *et al.* 2006).

c) Bioaccumulation

Dans le milieu aquatique, la cyperméthrine s'accumule fortement dans les algues avec, par exemple, un facteur de bioconcentration (BCF) de 3 280 pour l'algue verte unicellulaire *Chlorella fusca*. Cependant, ce fort BCF est probablement dû en partie à l'adsorption sur la surface externe des organismes plutôt qu'à une vraie bioaccumulation intra-cellulaire. Bien que ces algues soient à la base de nombreuses chaînes alimentaires, aucune étude ne rapporte de biomagnification de la cyperméthrine. Les invertébrés et les poissons bioaccumulent la cyperméthrine d'une façon moindre, avec des BCF variant entre 31-238 pour des larves de chironomes et 84-1 200 pour les poissons (Roussel UCLAF 1982).

De façon similaire, la deltaméthrine se bioaccumule peu dans les poissons (BCF entre 248-907) en regard de son fort coefficient de partage (Kd). Ces taux de bioaccumulation modérés sont probablement dus au fait que les invertébrés et les poissons métabolisent et excrètent rapidement les pyréthriinoïdes, avec une demi-vie de dépuración (métabolisation et excrétion) généralement comprise entre 8 et 27 jours (Roussel UCLAF 1982). De plus, dans un système naturel, ces BCF peuvent être réduits par divers facteurs environnementaux. Ces facteurs peuvent être par exemple une rapide adsorption, une réduction de la biodisponibilité, une dégradation des formes dissoutes et des faibles concentrations susceptibles d'arriver dans le milieu aquatique lors d'un usage normal de ces molécules (Roussel UCLAF 1982).

d) Devenir : dégradation et rémanence

i. Hydrolyse

Tous les pyréthriinoïdes de synthèse résultent de l'estérification du cyclopropane avec différents acides carboxyliques. Les liaisons de cet ester peuvent être hydrolysées en milieu aqueux. Ainsi, la principale voie de dégradation de la cyperméthrine par hydrolyse conduit à la formation de dérivés de l'acide 3-phénoxybenzoïque (PBAC), d'un alcool 3-phénoxybenzoïque (PBAI), et d'un acide cyclopropane-carboxylique (CPA). L'hydrolyse de la deltaméthrine conduit aussi principalement à la formation de PBAC, ainsi que de l'acide 2,2-diméthyl-3-(2,2-dibromovinyl)cyclopropane carboxylique ou acide décaméthrinique (Br2CA). La biodégradation de la deltaméthrine par les micro-organismes conduit également à la formation de PBAC (Maloney *et al.* 1988).

Les produits de dégradation de la cyperméthrine (essentiellement CPA et PBAI) et de la deltaméthrine (essentiellement Br2CA et PBAI) sont plus mobiles que leurs molécules-mères, en particulier le PBAC (Kaufman *et al.* 1981). Lorsqu'ils sont adsorbés par les sédiments, ces produits poursuivent lentement leur minéralisation en dioxyde de carbone. Ils ne sont pas considérés comme susceptibles de s'accumuler fortement. Cependant, leur dégradation sera d'autant plus lente que les conditions sont anaérobiques (Roberts et Standen 1981, Roussel UCLAF 1982, Zhang *et al.* 1984, Kaufman 1981, Ostiz et Khan 1994).

La demi-vie de la cyperméthrine liée à son hydrolyse en milieu aqueux dans un environnement naturel (rivière, plan d'eau, mer) est généralement comprise entre 1 et 9 semaines, le *trans*-isomère étant beaucoup moins résistant à l'hydrolyse que le *cis*-isomère.

De plus, l'hydrolyse de la cyperméthrine est beaucoup plus rapide en milieu basique qu'en condition acide (Roussel UCLAF 1982, Sakata *et al.* 1986).

ii. Photodégradation

La disparition de la cyperméthrine est accélérée et complétée par la photodégradation. La principale voie de photodégradation de la cyperméthrine est le clivage de la liaison ester et l'isomérisation *cis/trans* du cyclopropane, donnant l'équivalent amide de la molécule intacte, ainsi que plusieurs dérivés du PBAC (alcools tel que PBAI, acides et aldéhydes) et des dérivés du *cis*- et du *trans*- de l'acide carboxylique de cyclopropane. La photodégradation de la deltaméthrine conduit aussi à la formation d'isomères *cis* et *trans*, ainsi qu'au clivage de liaison ester (production de PBAC), et à la formation de Br₂CA. De faibles concentrations de décarboxy-deltaméthrine ont aussi été détectées (WHO 1989).

Les demi-vies liées à la photodégradation de la cyperméthrine et de la deltaméthrine en eau de rivière, eau de mer ou sols sont comprises entre 0,6 et 16 jours, en fonction de la teneur en carbone organique dans le milieu, ce dernier étant susceptible d'agir comme un catalyseur de la photodégradation (WHO 1989). Néanmoins des études contradictoires rapportent une très faible photolabilité de cette molécule, seuls 10% étant dégradés en 32 jours (WHO 1989, Samsonov et Pokrovskii 2001).

iii. Dégradation de la fraction adsorbée

La minéralisation de la deltaméthrine dans le sol est estimée complète en 128 jours (Roussel UCLAF 1982). Néanmoins cette valeur n'est qu'indicative, de nombreux facteurs étant susceptibles de la modifier. Ainsi, lorsque la cyperméthrine et la deltaméthrine sont adsorbées, leurs demi-vies sont très dépendantes de la température (Jordan *et al.* 1982). Par exemple, la demi-vie de la cyperméthrine est de 30,8 et 9,6 jours et celle de la deltaméthrine est de 0,8 et 0,5 jours à respectivement 15°C et 19°C (Lutnicka *et al.* 1999). Ces auteurs classent la deltaméthrine comme étant rapidement dégradable et la cyperméthrine comme étant une substance semi-persistante. Outre la température, le type de sol et l'activité microbienne sont aussi susceptibles de fortement modifier la vitesse de dégradation.

1.4.2. IPBC

a) Utilisations

L'IPBC est essentiellement utilisé dans le cadre du traitement du bois. A titre d'exemple, 36 020 kg d'IPBC ont été utilisés dans les scieries de Colombie Britannique (Canada) en 1996 (Juergensen *et al.* 2000). Ce fongicide/bactéricide est aussi utilisé comme conservateur dans divers types de produits industriels particuliers, tels que les peintures, certains cosmétiques et cirages (Badreshia et Marks 2002). En revanche, cette molécule n'est pas utilisée en agriculture. L'IPBC est donc relativement peu répandu sur le marché français, bien qu'il n'existe pas de donnée chiffrée disponible à ce sujet.

b) Transferts et dégradation

Selon le *Canadian Department of environment* (1989), l'adsorption de l'IPBC décroît avec le temps à faible concentration ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$), alors qu'elle augmente pendant plus de 24h à fortes concentrations ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$). L'IPBC est modérément soluble et stable dans l'eau mais il se dégrade en quelques heures au contact du sol ou du sédiment (Tableau I.5). Ainsi, le seul article ayant recherché cette molécule dans l'environnement n'a pas réussi à la détecter ni dans l'eau ni dans le sédiment (Harino *et al.* 2005). Bien que plus stable que sa molécule-mère, le produit de dégradation propargyl-butyl carbamate (PBC) est lui-même dégradé en quelques jours, et par conséquent ne présente pas de fort risque d'accumulation dans l'environnement.

Le facteur de bioconcentration (BCF) maximum de l'IPBC enregistré pour *Cyprinus carpio* étant inférieur à 5, cette substance est considérée comme peu bioaccumulée par les organismes aquatiques (*Canadian Department of Environment* 1989). La probabilité d'une forte contamination du milieu aquatique par l'IPBC est donc *a priori* relativement faible.

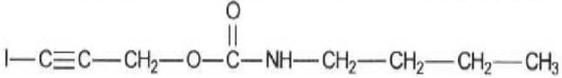
Nom commun (F-ISO)	IPBC, 3-Iodo-2-propynyl butyl carbamate
Nom chimique (IUPAC)	3-Iodo-2-propynyl butyl carbamate
No CAS	55406-53-6
Formule moléculaire	C ₈ H ₁₂ INO ₂
Structure moléculaire	
Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	281,1
Température de fusion	63,6 - 66,5°C (98,8% de pureté)
Température d'ébullition	Se décompose avant
Stabilité thermique	Se décompose à 85°C-192,2°C
Apparence	Solide cristallin légèrement jaunâtre
Densité relative	1,714 (98,8% de pureté)
Pression de vapeur	2,36 à 4,5.10 ⁻³ Pa (25°C)
Constante de Henry	3,38 à 6,45.10 ⁻³ Pa.m ³ .mol ⁻¹ (25°C)
Solubilité dans l'eau	168 mg.L ⁻¹ (20°C)
Solubilité dans les solvants organiques	Heptane : 3,5 g.L ⁻¹ (20°C) Ether de pétrole : 3,6 g.L ⁻¹ à 20°C Acétate d'éthyle : 281 g.L ⁻¹ (20°C) Octanol : 150 g.L ⁻¹ à 20°C Méthanol : > 1000 g.L ⁻¹ (20°C)
Coefficient de partage (log Kow)	2,81 à 25°C (se comporte plutôt en acide)
Constante de dissociation	Ne se dissocie pas
Absorption aux UV (max)	191 et 227 nm
Photostabilité dans l'eau	Relativement photostable (dégradation < 25% après 17 jours)
	139-248 jours (25°C, pH 7)
	Très stable à pH 5
	Très instable à pH 9 (DT50 < 1 jour)
DT50 dans l'eau en présence de sédiment	3,1 h (12°C) et 1,5 h (22°C)
DT50 dans sédiment (anaérobie)	1,5 h (conditions non stériles)
	13,3 h (conditions stériles)
DT 50 dans sol (aérobie)	2,6 h (22°C) - 8,6 h (5°C) en conditions aérobiques et non stériles
Principaux produits de dégradation décrits	Propargyl butyl carbamate (PBC) (DT50 = 11,5 j) 2-Propenyl butyl carbamate (2-PBC) 4,7 h à 12°C
Constante de dissociation avec le carbone organique (Koc)	61-309
Constante de dissociation (Kd)	3,43 - 31,3

Tableau I.5. Principales caractéristiques physico-chimiques de l'IPBC. Sources : *US EPA 1997, Canadian Department of Environment 1989.*

1.4.3 Fongicides triazolés

a) Utilisations

Le propiconazole et le tébuconazole sont autorisés en agriculture en France pour la protection d'arbres fruitiers (abricotiers, pêchers, bananiers en Outre-Mer...), des fleurs et cultures ornementales (rosiers, œillets, chrysanthème, glaïeuls, plantes d'intérieur...), de céréales (blé, avoine, seigle...), de légumes (céleri), et aussi des pommes de terre, du gazon, du raisin, du thé... En 2007, 45 spécialités autorisées en agriculture en France renfermaient du propiconazole et 40 du tébuconazole (Ministère de l'Agriculture, e-phy.agriculture.gouv.fr). A notre connaissance, il n'existe pas de données chiffrées relatives aux quantités de fongicides triazolés mis sur le marché français, européen ou mondiale qui soient disponibles.

b) Transferts, dégradation et bioaccumulation

i. Transferts

Le propiconazole et dans une moindre mesure le tébuconazole, sont modérément solubles dans l'eau et modérément polaires (Tableaux I.6 et I.7). Ces fongicides ont ainsi été détectés dans des eaux de ruissellement issues d'aires récemment traitées (Neumann *et al.* 2002, Berenzen *et al.* 2005b). Kronvang *et al.* (2004) ont observé que 0,0031% du propiconazole épandu sur une surface enherbée était transféré dans les eaux pluviales, ce qui suffisait à significativement altérer la survie de *G. pulex*.

Les coefficients d'adsorption de ces deux pesticides sont relativement élevés, sans toutefois atteindre le niveau de ceux des pyréthriinoïdes de synthèse (Tableaux I.6 et I.7). Kim *et al.* (2002) constatent que la très grande partie de ces substances reste concentrée dans les 10 premiers centimètres du sol, leur mobilité étant d'autant plus réduite que le sol est structuré de particules fines et riche en matière organique (Riise *et al.* 2001, Wu *et al.* 2003). Gardner et Branham (2001) concluent également à une très faible mobilité du propiconazole indépendamment du recouvrement plus ou moins végétalisé du sol.

Ces pesticides sont également susceptibles de désorber du compartiment sédimentaire vers le milieu aqueux où ils seront davantage biodisponibles pour les organismes aquatiques et où ils seront exportés plus en aval. Cependant, une part très importante des fongicides adsorbés résiste à la désorption, et de ce fait les sédiments situés à proximité d'aires traitées par ces

pesticides sont susceptibles de devenir des réservoirs à propiconazole et tébuconazole, en particulier au niveau des particules inférieures à 2 µm (Riise *et al.* 2001, Wu *et al.* 2003).

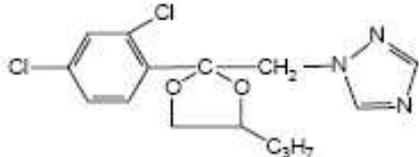
Nom commun (F-ISO)	Propiconazole
Nom chimique (IUPAC)	(+)-1-[2-[2,4-dichlorophenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-ylmethyl]-1H-1,2,4-triazole
No CAS	60207-90-1
Formule moléculaire	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂
Structure moléculaire	
Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	342,2
Température de fusion	-23°C (99,8% de pureté)
Température d'ébullition	Ne boue pas: décomposition à partir de 355°C
Apparence	Claire, liquide visqueux
Densité relative	1,32 à 20°C (99,8% de pureté)
Pression de vapeur	5,6.10 ⁻⁵ Pa à 25°C (99,1% de pureté)
Constante de Henry	9,2.10 ⁻⁵ Pa.m ³ .mol ⁻¹
Solubilité dans l'eau	150 mg.L ⁻¹ à 20°C (pH 5,2)
Solubilité dans les solvants organiques	Complètement miscible à 20°C dans l'acétone, le dichlorométhane, le méthanol, l'acétate d'éthyle et le xylène: 1,585 g.L ⁻¹ à 20°C
Coefficient de partage (log Kow)	3,72 à 25°C à pH 6,6
Constante de dissociation	pKa = 1,09 à 20°C
Absorption aux UV (max)	220 nm
Photostabilité dans l'eau	47-984 jours à 30-50° de latitude nord
DT50 hydrolyse	non significative (après 249 jours)
DT50 dans l'eau en présence de sédiment	5,4 à 6,4 jours
DT50 dans le système eau + sédiment	485 à 636 jours ou 25-85 jours (selon les sources)
DT50 dans le sol	29 à 70 jours en conditions aérobiques à 20-25°C 430 jours en conditions aérobiques à 10°C
Principaux produits de dégradation décrits	1,2,4-triazole (DT50 2-98 jours)
Constante de dissociation avec le carbone organique (Koc)	382-1789
Constante de dissociation (Kd)	455-2279

Tableau I.6. Principales caractéristiques physico-chimiques du propiconazole. Sources : *US EPA* 2006b, *European Commission* 2003b et 2006, *Agriculture Canada* 1987.

ii. Dégradation

Le propiconazole et le tébuconazole sont stables dans l'eau, et très stables lorsqu'ils sont adsorbés. Cette lente dégradation a été observée pour divers types de sols : 40, 70 et 82% du propiconazole était toujours présent après 84 jours dans un sol respectivement enrichi en matière organique, sableux et argilo-limoneux (Thortensen et Lode 2001). Le temps de demi-

vie de leur principal produit de dégradation, c'est-à-dire le 1,2,4-triazole, est néanmoins un peu plus rapide que celui des deux molécules-mères (Tableaux I.6 et I.7). Ainsi, après 2 ans dans un sol argilo-limoneux, seuls 7,1 % du propiconazole sont complètement minéralisés (Kim *et al.* 2002). La dégradation des triazolés étant très lente, les concentrations de propiconazole et de tébuconazole dans le milieu aquatique dépendent donc essentiellement de l'équilibre entre adsorption et désorption, et donc à l'équilibre entre la part transférée et la part accumulée.

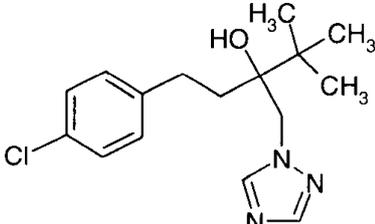
Nom commun (F-ISO)	Tébuconazole
Nom chimique (IUPAC)	(RS)-1- <i>p</i> -chlorophenyl-4,4-diméthyl-3-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-pentan-3-ol
No CAS	107534-96-3
Formule moléculaire	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O
Structure moléculaire	
Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	307,80
Température de fusion	105°C
Température d'ébullition	se décompose vers 350°C
Apparence	poudre blanche à beige
Densité relative	1,25 g.cm ⁻³ à 26°C
Pression de vapeur	3,9.10 ⁻⁶ à 25°C (95,6% de pureté)
Constante de Henry	1.10 ⁻⁵ Pa.m ³ .mol ⁻¹ à 20°C
Solubilité dans l'eau	29-32 mg.L ⁻¹ à 20°C, pH7
Solubilité dans les solvants organiques	2 propanol : 89,3 g.L ⁻¹ à 10°C; 140 g.L ⁻¹ à 30°C n-Hexane : 0,543 à 10°C; 0,841 à 20°C; 1,36 à 30°C Acétone : 222 à 10°C; 403 à 30°C Acétonitrile : 61,9 à 10°C; 172 à 30°C 1,2-Dichloroéthane : 205 à 10°C; 322 à 30°C Octanol : 95,5 à 10°C; 98,1 à 20°C; 126 à 30°C
Coefficient de partage (log Kow)	3,35 à 10°C; 3,49 à 20°C; 3,47 à 30°C
Absorption aux UV (max)	221,4 nm
DT50 dans eau	186 jours
DT50 dans l'eau en présence de sédiment	43 jours
DT50 dans le système eau + sédiment	54 à 77 jours
DT50 dans le sol	> 1an en conditions aérobiques à 20°C 77 jours en conditions naturelles
Principaux produits de dégradation décrits	1,2,4-triazole (DT50 2-98 jours)
Constante de dissociation avec le carbone organique (Koc)	902

Tableau I.7. Principales caractéristiques physico-chimiques du tébuconazole. Source : US EPA 1999.

iii. Bioaccumulation

Le propiconazole et le tébuconazole sont généralement métabolisés et excrétés en quelques jours par les organismes aquatiques. Par exemple, 98% du propiconazole est éliminé en 14 jours chez *Lepomis macrochirus*. Le BCF du tébuconazole est généralement inférieur à 78, et celui du propiconazole est de 116 chez le poisson *Lepomis macrochirus*. Ces fongicides sont donc *a priori* modérément bioaccumulés par les organismes aquatiques (US EPA 1999 et 2006).

Résumé relatif aux sources, transferts et devenir de la deltaméthrine, de la cyperméthrine, de l'IPBC, du propiconazole et du tébuconazole

Les trois familles de molécules étudiées ont des caractéristiques physico-chimiques qui leur confèrent des propriétés contrastées quant à leurs transferts dans l'environnement.

Le transfert des pyréthrinoïdes de synthèse est avant tout régi par leurs propriétés d'adsorption. Ces molécules sont très rapidement adsorbées par les particules solides et faiblement présentes sous forme dissoute dans l'eau. Elles sont *a priori* peu enclines à être transportées loin de leur source d'émission à moins d'un fort transport par des particules contaminées. Cependant, la dynamique de désorption de ces molécules reste encore peu connue, et leur très large utilisation pour des usages très divers augmente la probabilité de contamination des milieux aquatiques.

L'IPBC est avant tout caractérisé par une biodégradation très rapide et donc une faible rémanence dans l'environnement. N'étant pas utilisée en agriculture, et relativement peu fréquente dans les produits industriels, cette substance peut présenter l'avantage de servir de « marqueur » d'une activité de traitement du bois de classe 2 en scierie (une des principales utilisations de cette substance).

Les fongicides triazolés ne sont que modérément solubles et présentent une affinité moyenne à forte pour les particules en suspension et le sédiment. Ces molécules sont relativement rémanentes, particulièrement lorsqu'elles sont adsorbées. Elles sont donc à la fois susceptibles d'être adsorbées et accumulées dans le sédiment, et d'être transférées entre les différents compartiments terrestres et aquatiques.

I.5. Toxicité aiguë de la deltaméthrine, de la cyperméthrine, de l'IPBC, du propiconazole et du tébuconazole

Malgré toute l'incertitude que cela comporte, l'évaluation des effets sur l'écosystème aquatique repose parfois sur l'extrapolation de données de toxicité aiguë de quelques espèces. En outre, la sensibilité de l'écosystème dépend des espèces les plus sensibles qui le composent, et, par conséquent, protéger la structure de l'écosystème revient à protéger les fonctions remplies par l'ensemble des communautés. En établissant en laboratoire quelles sont les espèces les plus sensibles aux effets toxiques d'une molécule, l'évaluation du risque pour le milieu naturel pourra alors être basé sur les données écotoxicologiques existantes pour ces espèces. Le risque d'un fort déséquilibre de la structure d'un écosystème est alors réduit, conduisant à une meilleure protection de son fonctionnement (European Commission 2003a).

Les Tableaux I.8 à I.10 récapitulent des bases de données de toxicité aiguë des 5 molécules étudiées pour certaines des espèces les plus sensibles parmi les crustacés, les insectes aquatiques, les mollusques, les poissons et les amphibiens. Les données relatives aux micro-organismes aquatiques ou aux végétaux aquatiques n'ont pas été indiquées notamment à cause du manque de données pertinentes relatives à la toxicité aiguë des 5 molécules pour ces organismes. Cette synthèse a été réalisée principalement à partir de la base de données écotoxicologiques AQUIRE de l'Agence Américaine pour la Protection de l'Environnement (source : cfpub.epa.gov/ecotox, 2007) et complétée par la base de données écotoxicologiques françaises AGRITOX gérée par Agence française de sécurité sanitaire des aliments (source : www.dive.afssa.fr, 2007) Les listes de ces bases de données n'étant pas exhaustives, surtout pour certaines des molécules étudiées (IPBC, tébuconazole), des références complémentaires ont été jointes en cas de besoin.

Les valeurs issues des tests standards utilisant le cladocère *D. magna* ont été répertoriées pour chacune des molécules afin de pouvoir comparer la toxicité relative de ces molécules. Toutefois, *D. magna* tend à être moins sensible que les autres espèces de cladocères, et elle est peu représentative des espèces les plus sensibles de l'écosystème aquatique (Sarma et Nandini 2006). Les valeurs de toxicité aiguë pour *G. pulex* ou d'autre *Gammarus sp.* (ou à défaut pour l'amphipode *Hyaella azteca*) ont également été précisées quand elles étaient disponibles.

Enfin, les espèces naturellement présentes en France ont été privilégiées quand les valeurs de toxicité aiguë indiquent qu'elles figurent parmi les espèces les plus sensibles.

Pour une même espèce, des valeurs de toxicité aiguë très différentes sont citées parmi les données présentées dans les Tableaux I.8 à I.10. L'importance de ces écarts est liée à différents facteurs de variation comme :

- les modes opératoires et types d'exposition (statique, en flot continue, en solution continuellement renouvelée...);
- les solutions réellement testées (souvent il s'agit de solutions commerciales contenant des adjuvants susceptibles d'interagir avec la matière active étudiée);
- les types de spécimens exposés (les tests sont parfois réalisés par classe d'âge ou de taille).

Dans ce contexte, les Tableaux I.8 à I.10 privilégient les études relatives aux matières actives « pures » (solutions techniques), et les tests ayant montré les plus grandes toxicités. Cette synthèse permet de dégager les molécules les plus toxiques parmi celles étudiées ainsi que les organismes qui y sont le plus sensibles. Les chapitres suivants font état des principaux modes d'action toxique de chacune des trois familles de pesticides ainsi que de la toxicité aiguë des cinq molécules étudiées pour les organismes aquatiques.

I.5.1 Insecticides pyréthrinoïdes de synthèse (cyperméthrine et deltaméthrine)

a) Mode d'action toxique chez les invertébrés

L'activité insecticide du *pyrethrum* (substance présente dans les fleurs de pyrèthres *Chrysanthemum sp.*) était bien connue dès sa découverte : les insectes contaminés par cette substance subissent d'abord une phase d'intense agitation, puis sont généralement très rapidement paralysés. Après quoi, soit l'individu retrouve ses capacités après une dizaine de minutes, soit ils meurent. La durée et la vitesse de passage d'une phase à l'autre sont directement dépendantes de la dose de la contamination (Bradbury et Coats 1989, Roussel UCLAF 1982).

Les pyréthrinoïdes, dérivés du *pyrethrum*, sont des neurotoxiques agissant sur la transmission de l'influx nerveux : ils bloquent les canaux sodium, entraînant une brusque dépolarisation de

la membrane. Ainsi, dans un premier temps après l'exposition, une activité électrique répétée induit un drainage permanent de neurotransmetteurs musculaires, comme le glutamate et l'acide gamma-aminobutylique (gaba), ce qui provoque une contraction permanente, observée chez les insectes lors de la première phase suivant l'intoxication. Une dose élevée de pyréthriinoïdes entraîne dans un second temps une dépolarisation complète de la membrane, et donc une paralysie totale de l'individu (Bradbury et Coats 1989, Bradberry *et al.* 2005, Roussel UCLAF 1982).

Cette famille de pesticide a la particularité d'être plus active à basse température (maximale à 5°C) qu'à des températures plus élevées (Kumaraguru et Beamish 1981, Coats *et al.* 1989 ; Motomura et Narashashi 2000). La température interne des insectes étant directement contrôlée par la température de leur environnement, la CL90 de la deltaméthrine pour les larves de *Aedes aegypti* passe de 5 µg.L⁻¹ lorsque l'eau est à 8°C à 140 µg.L⁻¹ pour une eau à 28°C (Roussel UCLAF 1982). Ce phénomène est lié à modification de la fluidité des lipides constituant la membrane des axones et à une modification de l'activité d'oxydases et d'estérasés responsables de la métabolisation des pyréthriinoïdes. La photo-période peut aussi avoir un rôle important dans la détoxification des pyréthriinoïdes (Roussel UCLAF 1982).

Si le mode d'action moléculaire des pyréthriinoïdes sur les canaux sodium est assez bien connu, en revanche les voies de contamination par lesquelles ces pesticides pénètrent sont moins bien établies. Bradbury et Coats (1989) suggèrent que la rapidité d'action des pyréthriinoïdes chez les arthropodes peut être liée à leur facilité de pénétration à travers la complexe barrière cuticulaire. Ainsi Coats *et al.* (1989) rapporte que la toxicité du pyréthriinoïde fenvalerate pour la larve de moustique *Culex pipiens pipiens* est 6 fois plus élevée par voie cuticulaire que par voie orale. Ceci peut être lié au plus grand taux de métabolisation et d'élimination observé lorsque l'ingestion se fait par voie orale par rapport à une absorption cuticulaire (Bradbury et Coats 1989).

Même si une contamination par contact direct et une contamination par voie orale sont généralement concomitantes, il semble que les insectes absorbent ces molécules surtout par leurs chimio-récepteurs externes, particulièrement ceux situés sur les pattes. Dans ce cas, la majeure partie de la substance toxique n'entre pas en contact avec le système nerveux, ce qui engendre le phénomène « Knockdown » : les individus sont totalement paralysés mais les fonctions vitales, telle la respiration trachéale, sont encore opérantes (Roussel UCLAF 1982).

Coats *et al.* (1989) suggèrent que l'extrême toxicité des pyréthrinoïdes n'est ni systématiquement ni uniquement liée au degré d'absorption de ces pesticides, le contenu en lipides de l'organisme jouant un rôle de premier rang dans la disponibilité de la substance toxique pour l'organisme. Ainsi, les transferts de la matière active au sein de l'organisme sont souvent lents et incomplets, la plus grande partie restant fixée plusieurs heures au niveau de la surface externe de la cuticule (Bradbury et Coats 1989).

b) Toxicité aiguë de la deltaméthrine et de la cyperméthrine

Que ce soit chez les invertébrés aquatiques (à l'exception des mollusques) ou chez les poissons, les CL50 de ces deux molécules sont fréquemment inférieures à $1 \mu\text{g.L}^{-1}$, indiquant une très forte toxicité pour les organismes aquatiques en général (Tableau I.8, Helson et Surgeoner 1986, Bradbury et Coats 1989, Coats *et al.* 1989, Mian et Mulla 1992, Solomon *et al.* 2001, Sanchez-Fortun et Barahona 2005). Coats *et al.* (1989) supposent que ce phénomène est lié à une moindre efficacité des organismes aquatiques dans la détoxification (métabolisation et excrétion) par rapport aux animaux terrestres (essentiellement mammifères et oiseaux).

Plusieurs études indiquent que les crustacés, et plus particulièrement *Gammarus sp.*, figurent parmi les espèces aquatiques les plus sensibles aux pyréthrinoïdes de synthèse, ces derniers étant synthétisés dans le but de tuer des arthropodes (Anderson et Shubat 1984, Helson et Surgeoner 1986, Bradbury et Coats 1989, Coats *et al.* 1989, Mian et Mulla 1992, Cold et Forbes 2004, Van Wijngaarden *et al.* 2004). Plus généralement, les invertébrés aquatiques (à l'exception des mollusques) sont plus sensibles que les vertébrés aquatiques (poissons et amphibiens) à la toxicité aiguë engendrée par la cyperméthrine et la deltaméthrine (Tableau I.8).

Bien que non répertoriées dans le Tableau I.8, les études relatives à la toxicité des pyréthrinoïdes pour les micro-organismes indiquent que ces organismes (essentiellement algues et cyanobactéries) sont parmi les moins sensibles à ces molécules : 5 000 à 50 000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cyperméthrine sont nécessaires pour altérer leur croissance (UK Environmental Agency 2002).

Des études comparatives relatives aux effets toxiques des pyréthrinoïdes pour les invertébrés aquatiques ont démontré la très grande toxicité de la deltaméthrine suivie de près par la

cyperméthrine (Bradbury et Coats 1989 ; Mian et Mulla 1992). Il existe une différence de toxicité entre isomères d'un même pyréthrianoïde (la cyperméthrine en compte huit) chez les poissons (Bradbury et Coats 1989). Cette différence de toxicité entre isomère est néanmoins beaucoup moins marquée chez les invertébrés aquatiques (Liu *et al.* 2005).

Classification	Espèce	Paramètre de toxicité	Valeur ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Référence
Deltaméthrine				
Crustacé	<i>Americamysis bahia</i>	CL50-96h	0.0017	<i>Environmental Fate and Effects Division, U.S.EPA, Washington, D.C., 2000</i>
	<i>Daphnia magna</i>	CE50-96h	0.003	Hydrobiologia 188/189:411-413, 1989
	<i>Daphnia magna</i>	CL50-96h	0.010	Hydrobiologia 188/189:411-413, 1989
	<i>Gammarus fasciatus</i>	CE50-96h	0.0032	Union Européenne
Insecte	<i>Culex quinquefasciatus</i>	CL50-24h	0.02	Mosq. News 38(1):90-96, 1978
Mollusque	<i>Lymnaea acuminata</i>	CL50-96h	440	Chemosphere 35(5):1011-1021, 1997
Poisson	<i>Cyprinus carpio</i>	CL50-96h	3.5	Organika 1987-1988:71-77, 1989 (Pol) (Eng Abs) <i>Environmental Fate and Effects Divisio, U.S.EPA, Washington, D.C., 2000</i>
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CL50-96h	0.25	2000
	<i>Gambusia affinis</i>	CL50-24h	0.23	J. Biol. Sci. Res. 20(3):528-536, 1989
Amphibien	<i>Bufo arenarum</i>	CL50-96h	4.37	Bull. Environ. Contam. Toxicol. 48(4):616-621, 1992
Cyperméthrine				
Crustacé	<i>Americamysis bahia</i>	CL50-96h	0.0047	<i>Environmental Fate and Effects Divisio, U.S.EPA, Washington, D.C., 2000</i>
	<i>Crangon septemspinosa</i>	CL50-96h	0.01	Bull. Environ. Contam. Toxicol. 25(6):950-955, 1980
	<i>Daphnia magna</i>	CE50-48h	0.3	Union Européenne
	<i>Daphnia magna</i>	CL50-48h	0.36	Organika 1987-1988:71-77, 1989 (Pol) (Eng Abs)
	<i>Gammarus pulex</i>	CE50-24h	0.04	Aquat. Toxicol. 2(3):175-185, 1982
	<i>Gammarus pulex</i>	CL50-24h	0.06	Pestic. Sci. 14(5):475-480, 1983
Insecte	<i>Baetis rhodani</i>	CL50-96h	0.01	<i>Environmental Fate and Effects Divisio, U.S.EPA, Washington, D.C., 2000</i>
	<i>Tanytarsus sp.</i>	CL50-24h	0.01	Mosq. News 41(1):157-161, 1981
Mollusque	<i>Lymnaea peregra</i>	CL50-24h	5	<i>Environmental Fate and Effects Divisio, U.S.EPA, Washington, D.C., 2000</i>
	<i>Pinna carnea</i>	CL50-24h	0.05	<i>Environmental Fate and Effects Divisio, U.S.EPA, Washington, D.C., 2000</i>
Poisson	<i>Barbus gonionotus</i>	CL50-96h	0.4	Monogr. Brit. Crop Prot. Council 40:237-243, 1988
	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	CL50-96h	0.4	Aquat. Toxicol. 2(3):175-185, 1982
	<i>Cyprinus carpio</i>	CL50-96h	0.8	Monogr. Brit. Crop Prot. Council 40:237-243, 1988
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CL50-96h	0.5	Aquat. Toxicol. 2(3):175-185, 1982

Tableau I.8. Toxicité aiguë de la deltaméthrine et de la cyperméthrine pour quelques espèces parmi les plus sensibles dans les principaux groupes de taxons aquatiques.

Les produits de dégradation de la deltaméthrine et de la cyperméthrine sont beaucoup moins actifs que leur molécule-mère respective. La différence est de plusieurs milliers de fois chez *D. magna* (Hill 1985). A titre d'exemple, pour la truite *Oncorhynchus mykiss* une CL50_{96h} de 3,1 ; 6,1 et 13,3 mg.L⁻¹ ont été rapportées pour le CPA, le PBAI, et le PBAC issues de la dégradation de la cyperméthrine (Hill 1985). Par conséquent, compte tenu de leurs propriétés physico-chimiques et de leurs toxicités relatives, Belfroid *et al.* (1998) concluent à un risque potentiel des produits de transformation de la cyperméthrine et de la deltaméthrine très inférieur à celui des composés parents pour les organismes aquatiques.

1.5.2. Carbamates fongicides/bactéricides (IPBC)

a) Mode d'action toxique chez les organismes aquatiques

Contrairement aux carbamates insecticides, le mode d'action toxique des carbamates fongicides sur les organismes aquatiques en général, et sur les invertébrés aquatiques en particulier, est très peu connu. Juergensen *et al.* (2000) ainsi que Cook et Dickinson (2004) suggèrent que cette propriété anti-fongique est liée au groupement iodé, alors que Jarrad *et al.* (2004) propose pour sa part que les carbamates agissent sur différentes cibles physiologiques en altérant l'activité de l'acétylcholine estérase.

b) Toxicité de l'IPBC

Au vu des très rares données écotoxicologiques relatives à la toxicité aiguë de l'IPBC pour les organismes aquatiques, il semblerait que cette molécule soit au moins aussi toxique pour les poissons que pour les invertébrés (Tableau I.9, Farrell *et al.* 1998). Tierney *et al.* (2006) ont rapportés que le mécanisme physiologique de détection de polluants du salmonidé *Oncorhynchus kisutch* était affecté en quelques minutes après une exposition aiguë de seulement 1 µg.L⁻¹ d'IPBC, alors que sa CL50_{96h} est d'environ 95 µg.L⁻¹ selon Farrell *et al.* (1998). Les micro-organismes entériques, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* et *Alcaligenes* sont susceptibles de dégrader l'IPBC, contrairement aux actinomycètes et *Bacillus*, ces derniers étant incapables de se développer à 59 mg.L⁻¹ d'IPBC (Cook et Dickinson 2004). Ainsi, malgré le faible nombre de données toxicologiques, l'IPBC ne semble donc que modérément toxique pour les organismes aquatiques.

Classification	Espèce	Paramètre de toxicité	Valeur ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Référence
Crustacé	<i>Daphnia magna</i>	CE50-48h	160	<i>Environmental Fate and Effects Division, U.S.EPA, Washington, D.C., 2000</i>
	<i>Daphnia magna</i>	CL50-48h	70	<i>Environ. Toxicol. 15(3):201-213, 2000</i>
	<i>Hyalella azteca</i>	CL50-48h	500	<i>Arch. Environ. Contam.Toxicol. 35(3):472-478, 1998</i>
Poisson	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CL50-96h	67	<i>Water Res. 33(10):2410-2414, 1999</i>

Tableau I.9. Toxicité aiguë de l'IPBC pour quelques espèces parmi les plus sensibles dans les principaux groupes de taxons aquatiques.

1.5.3. Fongicides triazolés (propiconazole et tébuconazole)

a) Mode d'action toxique chez les organismes aquatiques

La toxicité des fongicides triazolés est liée à l'inhibition de la 14 α -deméthylase qui est un cytochrome P450 responsable de la biosynthèse des ergostérols fongiques (Egaas *et al.* 1999, Iwasa *et al.* 2004). Ces fongicides sont ainsi susceptibles d'altérer la physiologie des organismes non-cibles en inhibant des cytochromes P450 non-cibles qui ont en charge une partie de la phase d'oxydation de leur métabolisme (Jackson *et al.* 2000).

Classification	Espèce	Paramètre de toxicité	Valeur ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Référence
Propiconazole				
Crustacé	<i>Daphnia magna</i>	CE50-48h	3200	<i>Environmental Fate and Effects Division, U.S.EPA, Washington, D.C., 2000</i>
	<i>Daphnia magna</i>	CL50-24h	1-10	<i>Norw. J. Agric. Sci. Suppl. 13:153-161, 1994</i>
	<i>Americamysis bahia</i>	CL50-96h	510	<i>Environmental Fate and Effects Division, U.S.EPA, Washington, D.C., 2000</i>
	<i>Gammarus lacustris</i>	CL50-96h	1300	<i>Int. Assoc. Theor. Appl. Limnol. Proc. /Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Verh. 24(4):2277-2281, 1991</i>
	<i>Gammarus kischineffensis</i>	CL50-96h	1800	<i>Hydrobiol. J. 27(6):33-36 / Gidrobiol. Zh. 27(3):107-111, 1991 (RUS)</i>
Insecte	<i>Baetis rhodani</i>	CL50-96h	900	<i>Int. Assoc. Theor. Appl. Limnol. Proc. /Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Verh. 24(4):2277-2281, 1991</i>
Mollusque	<i>Physa fontinalis</i>	CL50-96h	1300	<i>Int. Assoc. Theor. Appl. Limnol. Proc. /Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Verh. 24(4):2277-2281, 1991</i>
Poisson	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CL50-96h	830	<i>Environmental Fate and Effects Division, U.S.EPA, Washington, D.C., 2000</i>
Tébuconazole				
Crustacé	<i>Americamysis bahia</i>	CL50-?h	490	NR
	<i>Daphnia magna</i>	CE50-48h	11800	Bayer France
Poisson	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CL50-?h	4400	NR

Tableau I.10. Toxicité aiguë du propiconazole et du tébuconazole pour quelques espèces parmi les plus sensibles dans les principaux groupes de taxons aquatiques.

b) Toxicité aiguë du propiconazole et du tébuconazole

Les organismes aquatiques en général et *Gammarus sp.* en particulier sont relativement peu sensibles au propiconazole et au tébuconazole. Ces substances deviennent mortelles lorsque de très fortes concentrations altèrent massivement le métabolisme de l'organisme non-cible qui ne peut alors plus assurer ses fonctions vitales. Bien que les données écotoxicologiques disponibles soient très limitées, le tébuconazole serait légèrement moins toxique (à concentration égale) que le propiconazole. Les invertébrés semblent aussi tolérants à ces matières actives que les poissons (Tableau I.10).

Résumé et conclusion relatifs à la toxicité aiguë de la deltaméthrine, de la cyperméthrine, de l'IPBC, du propiconazole et du tébuconazole

Parmi les substances étudiées, les pyréthrinoïdes de synthèse sont de loin les pesticides les plus toxiques pour les animaux aquatiques. Les crustacés sont particulièrement sensibles à la deltaméthrine et à la cyperméthrine, une concentration de quelques centièmes de microgramme par litre suffisant pour tuer 50% des *Gammarus sp.* en quelques jours. Même si la toxicité aiguë de l'IPBC, du propiconazole et du tébuconazole pour les organismes aquatiques non-cibles est relativement modérée, le faible nombre d'informations disponibles rend délicate l'établissement de leur toxicité relative. Cette comparaison de toxicité aiguë est d'autant plus délicate à réaliser que les valeurs disponibles sont souvent issues de tests non standardisés.

I.6. Biologie et écologie des organismes étudiés

L'intérêt méthodologique du choix de *Gammarus pulex* (L.) et *Gammarus fossarum* (K.) comme principaux modèles d'étude, complétés par *Elmis aenea* (M.) pour les études *in natura*, découlent à la fois de leurs caractéristiques biologiques et écologiques respectives. Le présent chapitre se propose d'en faire la synthèse.

I.6.1. Gammarus pulex (Linnaeus, 1758) et Gammarus fossarum (Koch, 1836)

a) Classification et aire de répartition

Le genre *Gammarus* appartient au phylum des *Arthropoda*, au sub-phylum des *Crustacea*, à la classe des *Malacostraca*, au super-ordre des *Peracarida*, à l'ordre des *Amphipoda*, et à la famille des *Gammaridae*. Plus de 1000 genres appartenant à cette famille ont été décrits dont le genre *Gammarus*. Les espèces de ce genre ont colonisé la plupart des écosystèmes aquatiques existant sur Terre : des zones polaires aux zones tropicales, des ruisseaux de montagne aux estuaires, des zones côtières aux fosses océaniques abyssales, mais aussi lacs, fossés et rivières souterraines. Ainsi, au sein du genre *Gammarus sensu stricto*, on peut distinguer plus de cent espèces d'eau douce (Karaman et Pinkster 1977).

En France, *Gammarus fossarum* (Koch, 1836) et *Gammarus pulex* (Linnaeus, 1758) sont deux espèces autochtones des eaux douces du territoire. *G. pulex pulex* (Fig. I.1) est considérée comme étant « l'espèce typique » du genre *Gammarus*, du fait de son abondance et de sa présence dans toute l'Europe ainsi qu'en Asie mineure, en Asie orientale (Chine et lac Baïkal), en Afrique du Nord (Karaman et Pinkster 1977). *G. fossarum* est également une espèce très commune en Europe et présente au nord de l'Asie mineure (Karaman et Pinkster 1977) et des investigations récentes sous-entendent que l'aire de répartition de *G. fossarum* au sein de l'Europe continentale est plus étendue que ce qui était admis jusqu'à présent (Zivic et Markovic 2007). Cependant, de nombreuses espèces invasives, pour la plupart d'origine ponto-caspienne et parfois américaines, ont colonisés les systèmes lotiques et lentiques de la France. Les principales sont : *G. roeseli* (présente depuis plus d'une centaine d'années, et parfois considérée comme autochtone), *G. duebeni*, *G. tigrinus* et *G. lacustris*. Depuis quelques années une espèce d'un genre proche de *Gammarus*, *Dikerogammarus villosus*,

envahit très rapidement la plupart des bassins d'Europe de l'ouest en excluant les espèces autochtones.

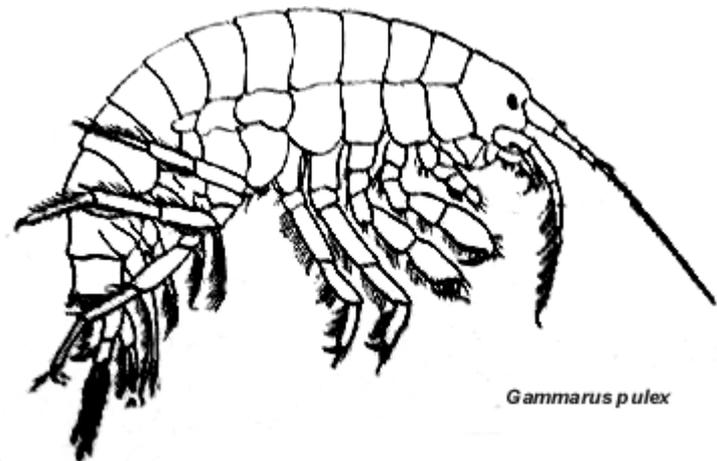


Figure I.1. Représentation schématique de *Gammarus pulex* (L.). Echelle : 1 cm = 2 mm (Source : Karaman et Pinkster 1977).

G. fossarum est davantage inféodé aux systèmes lotiques alors que *G. pulex* est capable de coloniser des systèmes lentiques tels que lacs, étangs, canaux, fossés, et parfois eaux souterraines (Hynes 1955, Karaman et Pinkster 1977, Janetzki 1994). *G. pulex* est ainsi certainement l'espèce d'amphipode la plus répandue en Europe de l'ouest (Maitland 1966). Néanmoins, Janetzki (1994) a constaté que *G. fossarum* était également très fréquent dans de nombreux sites. Ces deux espèces peuvent cohabiter depuis les petits ruisseaux de tête de bassin jusqu'aux grands fleuves, leur aire de répartition étant principalement limitée par la pérennité des cours d'eau et leur teneur en éléments minéraux à l'amont, et par la salinité des estuaires à l'aval (Maitland 1966, Schrimppff et Foeckler 1985, Janetzki 1994). Malgré le très faible nombre de données disponibles relatives à ce sujet, il semble que les anciennes descriptions faisant état d'un gradient amont-aval des aires de répartition avec d'abord *G. fossarum*, puis *G. pulex*, et enfin *G. roeseli* (Karaman et Pinkster 1977) ne soient pas justifiées (Janetzki 1994). Au contraire, *G. pulex* et *G. fossarum* trouvent tous deux leurs conditions optimales de développement dans les zones plutôt apicales des bassins de type ruisseau, plutôt que dans des cours d'eau de plus grande taille de type fleuve (Maitland 1966). Cette distribution longitudinale n'est pas exclusive au vu des capacités adaptatives de ces deux espèces.

b) Déroulement de la reproduction

Chez les amphipodes, une « hormone ovarienne permanente » est responsable du développement de 4 paires d'oostéogites, petites plaques translucides situées sous les branchies, qui permettent la formation d'une poche d'incubation ventrale, et qui sont le signe que la femelle est arrivée à maturité. Une « hormone ovarienne temporaire » contrôle le développement de caractères sexuels secondaires tels que la présence de soies sur les oostéogites, caractéristique des femelles prêtes à s'accoupler (Sutcliffe 1992). Une phéromone présente dans l'urine de la femelle relativement tôt avant sa mue (plusieurs jours à plusieurs semaines) rend cette dernière sexuellement attractive auprès du mâle.

Lorsque cette substance est excrétée par la femelle, alors le mâle la détecte par contact ou à distance grâce à la présence de récepteurs implantés sur sa deuxième paire d'antenne. (Sutcliffe 1992). Le mâle s'agrippe alors sur le dos de la femelle, et la maintient en place sous son corps. Le couple forme alors une figure appelée amplexus précopulatoire (ou *precopula*) qui permet au mâle de continuer à nager tout en maintenant la femelle prête à muer sous son corps. (Sutcliffe 1992). L'ovulation, et donc la fertilisation, des femelles adultes ne peuvent se produire qu'une fois la mue effectuée : l'expulsion des œufs vers la poche ventrale de la femelle, parfois appelée poche marsupiale, est alors rendue possible par la présence d'un oviducte relativement flexible. Aussitôt l'exuvie de la femelle éjectée et plusieurs fertilisations de la poche ventrale effectuées en quelques heures, le mâle et la femelle se séparent (Sutcliffe 1992). Il peut arriver parfois que des *G. fossarum* et *G. pulex* s'accouplent et produisent des œufs, mais ces derniers ne sont jamais fertiles (Sutcliffe 1992).

Une fois les œufs fécondés, la femelle sécrète une gélatine protectrice à l'intérieur de sa poche d'incubation. Le sac gélatineux ainsi formé contenant les œufs est retenu dans la poche incubatrice ventrale de la femelle par les quatre paires d'oostéogites prolongés de longues soies (Sutcliffe 1992). Le nombre d'œufs est globalement corrélé avec la taille de la femelle. Chez *G. pulex* il est d'en moyenne de 16 œufs par femelle avec des variations de 1 à 43 (Hynes 1955, Welton 1979).

Les œufs augmentent de taille et s'obscurcissent à mesure du développement embryonnaire qui se déroule en 7 étapes. Cette phase du cycle de vie est très légèrement plus longue chez *G. fossarum* que chez *G. pulex*, cette différence ayant tendance à s'accroître à de faibles températures (<5°C). Lors de l'éclosion les nouveaux-nés mesurent entre 1,5 et 2 mm chez *G.*

pulex. Ces derniers sont alors gardés un court laps de temps dans la poche incubatrice (environ 10% du temps d'incubation) avant d'être libérés dans le milieu. Le taux de survie des embryons de *G. fossarum* est le plus fort entre 8°C et 12°C (environ 70-80%), une température de 26°C provoquant 100% de mortalité (Sutcliffe 1992). La femelle redevient alors très rapidement « sexuellement attractive », des *precopula* avec un mâle et une femelle portant encore son sac d'œufs ayant déjà été observés (Hynes 1955).

A une certaine période de l'année, généralement située entre la mi-été et le début de l'hiver, les individus peuvent cesser de s'accoupler et entrer dans une phase de vraie diapause (Hynes 1955, Sutcliffe 1992). Le principal stimulus déclencheur de ce phénomène serait plutôt dû à une modification de la photopériode qu'à un changement de la température (Sutcliffe 1992). Néanmoins, cette phase ne concerne pas toujours toute la population en même temps, plusieurs observations faisant état de la présence de femelles ovigères durant toute l'année (Hynes 1955, Welton 1979, Sutcliffe 1992).

c) Cycle de vie

Les nouveaux-nés croissent puis deviennent matures après un nombre déterminé de mues (10 mues pour *G. pulex*), la rapidité de succession de celles-ci étant température-dépendante et sexe-dépendante, les mâles *G. pulex* ayant des phases inter-mues plus longues que les femelles (Hynes 1955, Welton et Clarke 1980).

La détermination spécifique de *G. pulex* et *G. fossarum* utilisant les caractères sexuels secondaires, on ne peut faire la différence entre ces deux espèces qu'en utilisant les individus arrivés à maturité. On peut alors également déterminer le sex-ratio de la population (des adultes) qui est généralement de 1:1 chez *G. pulex*. Néanmoins, ce ratio fluctue au cours des saisons pour divers raisons : la production de mâles ou de femelles peut être température dépendante, les mâles arrivent à maturité avant les femelles (ils sont donc plus rapidement identifiés), et il existe un léger décalage entre les périodes de mortalité maximale des deux sexes (Hynes 1955, Welton 1979, Hultin 1971). De plus, ce sex-ratio peut varier d'une population à l'autre sans explication apparente (Crane 1994). Obrdlik (1972) a également observé, chez *G. fossarum*, un sex-ratio très fluctuant au cours de l'année mais aussi en fonction du type de substrat : il a compté environ 1,28 mâle pour 1 femelle dans les substrats pierreux, contre environ 1,88 mâles pour 1 femelle dans le sable. Globalement, comme pour *G. pulex*, les femelles sont plus abondantes que les mâles en fin d'été. Ladewig (2006) a aussi

observé une proportion plus importante de mâles *G. fossarum* que de femelles dans deux cours d'eau, respectivement 1,11 et 1,25 mâle pour 1 femelle.

La durée des différentes phases du cycle de vie d'une espèce est intimement liée à la température du milieu (Tableau I.11). Cependant, les données disponibles sont issues d'expériences menées en conditions contrôlées (Tableau I.11). Or, il a été montré que, pour plusieurs espèces de *Gammarus*, le déroulement du cycle de vie peut être accéléré par des fluctuations naturelles de la température (Sutcliffe 1992). De plus, certains facteurs biologiques (comme la taille de la femelle), et environnementaux (comme l'oxygénation et le degré de salinité de l'eau) peuvent aussi jouer un rôle dans cette vitesse de développement des gammarus (Sutcliffe 1992). Ainsi, un décalage dans le temps d'exécution des différentes phases du cycle de *G. pulex* peut être observé selon le site d'étude (Hynes 1955, Welton 1979).

Généralement, la première phase de reproduction commence en décembre et atteint un maximum en avril-mai lors de la fin de la phase de la diapause. Une première génération de nouveaux-nés voit le jour de mars à juin et une partie la cohorte atteint la maturité en fin d'été. Les adultes qui ont survécu à l'hiver précédent et qui ont donné naissance à cette génération meurent progressivement.

Une seconde génération voit alors le jour en début d'automne grâce aux individus nés en début d'été et arrivés à maturité. Les quelques adultes survivants de la première génération passent alors l'hiver en diapause tandis que la nouvelle génération croît lentement durant l'hiver (Hynes 1955, Maitland 1966, Hultin 1971, Welton 1979, Gee 1988). Bien que l'on possède peu d'information à ce sujet, il semble que les juvéniles aient une mortalité beaucoup plus importante que les individus de plus grande taille à des températures inférieures à 2°C, comme cela a été observé pour *G. duebeni* (Kinne 1953, Maitland 1966).

Concernant *G. fossarum*, les données disponibles sont moins abondantes que pour *G. pulex*. Bien que ces deux espèces aient un cycle de vie relativement proche, il semblerait que la phase de reproduction de *G. fossarum* dans certains cours d'eau soit davantage décalée à des périodes moins chaudes de l'année (Karaman et Pinkster 1977). Toutefois, comme pour plusieurs populations de *G. pulex*, la reproduction de la population de *G. fossarum* observée par Obrdlik (1972) s'effectue essentiellement de la fin d'été à l'automne. La température optimum de fécondité pour *G. fossarum* est de 12,1°C selon Pöckl et Humpesch (1990).

	Température/période	<i>G. pulex</i>	<i>G. fossarum</i>	Références
<i>Amplexus</i> précopulatoire	10°C	8,8 jours		Sutcliffe 1992
	18°C	4,1 jours		Sutcliffe 1992
	Été	1 semaine		Ward 1985 et 1986
	Automne/Hiver	1 mois		Ward 1985 et 1986
Développement embryonnaire	5°C	54-80 jours	56-95 jours	Sutcliffe 1992
	5°C	65 jours		Nilsson 1977
	5°C	69,7 jours		Welton et Clarke 1980
	10°C	32-38 jours	30-41 jours	Sutcliffe 1992
	10°C	40 jours		Pinkster <i>et al.</i> 1977
	10°C	36,5 jours		Welton et Clarke 1980
	10°C	36 jours		Nilsson 1977
	11°C	20-23 jours		McCahon et Pascoe 1988a
	15°C	22-26 jours	19-27 jours	Sutcliffe 1992
	15°C	25-30 jours		Pinkster <i>et al.</i> 1977
	15°C	23,9 jours		Welton et Clarke 1980
	15°C	21 jours		Nilsson 1977
	20°C	16-20 jours	13-21 jours	Sutcliffe 1992
	20°C	18-21 jours		Pinkster <i>et al.</i> 1977
	20°C	19,2 jours		Welton et Clarke 1980
	Hiver	90 jours		Hynes 1955
	Été	16-17 jours		Sexton 1924
Nouveaux-nés dans la poche incubatrice	1-5°C	> 2 semaines		Sutcliffe 1992
	15-25°C	0-2 jours		Sutcliffe 1992
Croissance à maturité	5-10°C	210 jours		Hynes 1955
	10-15°C	90-120 jours		Hynes 1955
	15°C	133 jours		Welton et Clarke 1980
	15-20°C	120 jours		Hynes 1955
	15-20°C	100 jours		Mottram 1933
	20°C	87,5 jours		Welton et Clarke 1980
	Hiver	180 jours		Sexton 1924
Été	70 jours		Sexton 1924	

Tableau I.11. Table de vie de *G. pulex* et *G. fossarum* récapitulant la durée des phases de développement de ces organismes, en particulier en relation avec la saison et la température de l'eau.

L'espérance de vie théorique de *G. pulex* est estimée à 2,5 ans pour les mâles qui peuvent atteindre une taille de 16 mm, et à 17-23 mois pour les femelles qui peuvent atteindre une taille de 13 mm (Maitland 1966, Welton et Clarke 1980). Une femelle *G. pulex* est théoriquement susceptible d'avoir au maximum 10 portées par an, mais le maximum atteint en laboratoire est de 5 portées, la plupart des individus mourant après 3 ou 4 portées (Welton et Clarke 1980). Hynes (1955) estime que les femelles peuvent avoir 5 à 6 portées par an dans certains ruisseaux. Ainsi, une femelle *G. pulex* se reproduisant deux fois en début d'année et qui produit en moyenne 16 œufs, c'est-à-dire 6 ou 7 femelles, aura engendré, en théorie, une descendance de 100 à 200 individus en fin d'année (Hynes 1955). En revanche, on ne possède

que peut d'information sur la vitesse de développement de *G. fossarum*. Welton et Clarke (1980) précisent simplement que les temps nécessaires pour arriver à maturité peuvent varier considérablement d'une espèce de *Gammarus* à l'autre.

Globalement, à âge équivalent, les individus *G. pulex* sont plus gros et plus grands que les individus de *G. fossarum*, et les mâles le sont davantage que les femelles chez les deux espèces (Roux 1970, Obrdlik 1972). Toutefois les différences entre populations d'une même espèce sont parfois plus importantes que les différences existantes entre les deux espèces (Roux 1970, Karaman et Pinkster 1977). La taille n'est donc ni un critère absolu de détermination de l'âge, ni d'identification de l'espèce (Crane 1994). Néanmoins, plusieurs auteurs admettent pour *G. pulex* et *G. fossarum* la classification des stades de développement en plusieurs classes de taille (Hultin 1971, Obrdlik 1972, Sutcliffe *et al.* 1992, Graça *et al.* 1994a, Ladewig 2006). Les limites d'intervalle peuvent varier d'une étude à l'autre, mais les plus courantes sont les suivantes : < 3 mm pour les nouveaux-nés ou juvéniles, 3 à 6-7 mm pour les immatures, et >6-7 mm pour les adultes.

d) Dynamique des populations

Dans des conditions optimales d'habitat, d'abondance de nourriture, de conditions physico-chimiques et de qualité de l'eau, certaines populations de *G. pulex* peuvent atteindre des densités très élevées, parfois supérieures à 8 500 individus par mètre carré entre juillet et septembre. Les densités de ces mêmes populations chutent entre 800 et 4 000 individus par mètre carré de janvier à avril (Welton 1979, Gee 1992). Peu de données démographiques sont disponibles pour *G. fossarum*. Un maximum de densité de cette espèce a été observé en été (2 600 individus par mètre carré sur un substrat pierreux) et un minimum en hiver (100 individus par mètre carré sur un substrat pierreux) dans la rivière Ponavka (Obrdlik 1972).

Cette diminution hivernale des densités, c'est-à-dire l'augmentation du rapport mortalité / natalité, peut s'expliquer par une limitation de l'abondance de nourriture par rapport à l'été (Gee 1992), et par une variation de la qualité physico-chimique de l'eau, notamment avec une diminution de la teneur en magnésium, plutôt que par une variation de la qualité de la nourriture (Minshall et Minshall 1978).

Dans certains cas, la disparition des substrats préférentiels de *Gammarus sp.* peut aussi être un facteur important de la variation saisonnière des densités, cela malgré leur relative ubiquité (Gee 1992). Ainsi, des densités estivales de *G. pulex* plus modestes, de l'ordre de 150

individus par mètre carré par exemple, ne sont pas forcément imputables uniquement à une altération de la qualité de l'eau, mais peuvent également être dues à une quasi-absence d'habitats favorables à la colonisation. Ceci reste cependant un cas particulier tant l'ubiquité de cette espèce est importante, la simple présence d'interstices étant souvent suffisantes au développement de populations (Crane 1994).

Ces densités sont également dépendantes de la présence plus ou moins abondante de prédateurs. *G. pulex* peut être la proie de certaines espèces d'invertébrés aquatiques tels que les plécoptères *Perla bipunctata* (Pictet), *Perlodes microphala* (Pictet), et *Isoperla grammatica* (Poda) (Maitland 1966). Mais les principaux prédateurs des gammares sont les poissons (L.), particulièrement la truite *Salmo trutta* (L.) et le chabot *Cottus cobio* (L.). On a ainsi observé des individus *G. pulex* dans les contenus stomacaux de la plupart des espèces de poissons d'eau douce cohabitant avec cette espèce : anguille, vairon, saumon, loche franche, vandoise, gardon, goujon... (Maitland 1966).

La dynamique de population de *G. pulex* est également liée à de nombreux autres facteurs environnementaux : régime hydraulique, type de ripisylve du cours d'eau, caractéristiques et diversité des substrats, teneur en phosphore total... (Schleiter *et al.* 1999, Franker *et al.* 2007).

e) Exigences vis-à-vis des paramètres physico-chimiques du milieu

La large aire de répartition de ces deux espèces est notamment due à de faibles exigences vis-à-vis de la qualité physico-chimique de l'eau. La température de l'eau doit être comprise entre 0°C et 25°C, la température critique létale étant située entre 28°C et 32°C (Wijnhoven *et al.* 2003). Ces espèces sont des oxy-conformeurs, donc, contrairement aux isopodes du genre *Asellus*, ils ne possèdent pas de voie métabolique anaérobie. Par conséquent, bien que peu exigeants, une concentration minimum en oxygène dissous est nécessaire à leur survie (Maltby 1995). *G. fossarum* est un peu moins résistant que *G. pulex* à une hausse des températures et à une diminution de l'oxygénation de l'eau (Meijering 1991), mais des données contradictoires sont observées à ce sujet (Janetzki 1994).

Ces crustacés ont également besoin entre autres de calcium pour effectuer leurs mues (reconstitution de l'exosquelette), et par conséquent préfèrent les eaux calcicoles à pH neutre à légèrement alcalin, et fuient les eaux acides (Meijering 1991). Le seuil de concentration minimale (valeur critique) en calcium compatible avec le développement de populations de

Gammarus sp. varie selon les auteurs : il se situerait entre 2 et 3 mg.L⁻¹ selon Maitland (1966), ou à 5,2 mg.L⁻¹ selon Schumann (1928), aucune population n'ayant été trouvée dans des eaux contenant moins de 20 mg.L⁻¹ (Schrimppff et Foeckler 1985).

Des nuances ont été apportées quant à cette calcico-dépendance des gammares dont le développement serait plutôt lié à l'interaction entre le pH et les concentrations en calcium et en magnésium. Le pH n'a qu'un rôle sub-alterne, mais il doit être de préférence compris entre 7.0 et 9.0, *G. fossarum* étant plus sensible à des variations de ce paramètre que *G. pulex* (Schrimppff et Foeckler 1985, Meijering 1991). En revanche, le magnésium joue un rôle prépondérant dans la distribution de *Gammarus sp.* en étant souvent le principal facteur limitant. Sa valeur critique se situerait vers 10 mg.L⁻¹ (Schrimppff et Foeckler 1985).

Ainsi, une forte corrélation a ainsi été établie entre la présence de gammares et le fond géologique plus ou moins propice à la présence d'éléments minéraux dissous dans l'eau (Schrimppff et Foeckler 1985). *G. pulex* apparaît de façon générale comme plus tolérant que *G. fossarum* à de faibles concentrations en Ca (< 33 mg.L⁻¹) et en Mg (< 10 mg.L⁻¹, Foeckler 1983). Les modélisations réalisées par Dedecker *et al.* (2005) indiquent pour leur part que l'abondance de *G. pulex* est principalement liée au facteur « ammonium » et secondairement à la Demande Chimique en Oxygène (DCO). Schrimppff et Foeckler (1985) précisent que ces exigences vis-à-vis des paramètres physico-chimiques sont valables pour des eaux non perturbées par les activités anthropiques, mais qu'elles peuvent s'avérer moins pertinentes en présence de pollution.

f) Nutrition

Les fortes capacités recolonisatrices de *G. pulex* et de *G. fossarum* s'expliquent aussi par leur grande plasticité alimentaire (McNeil *et al.* 1997). Ils sont généralement considérés comme des détritivores rendant les débris végétaux plus comestibles et assimilables pour d'autres invertébrés aquatiques (Rawer-Jost *et al.* 2000). Néanmoins, cette classification simpliste ne rend pas compte de la complexité du mode de nutrition de ces organismes (McNeil *et al.* 1997, Kelly *et al.* 2002). En effet, les espèces du genre *Gammarus* sont des omnivores opportunistes pouvant avoir une prédation significative envers d'autres espèces d'invertébrés aquatiques. Il a été ainsi démontré que *G. pulex*, en présence ou en absence de nourriture végétale, était capable de modifier significativement le peuplement macrobenthique uniquement du fait de sa prédation. *Gammarus spp.* est ainsi capable de se nourrir de chironomes, d'éphémères, de plécoptères, de trichoptères, d'annélides, de cladocères et

d'aselles, ces dernières étant considérées avant tout comme une proie pour *G. pulex* plutôt que comme compétitrices pour les ressources alimentaires (McNeil *et al.* 1997).

La présence de populations de *Gammarus* en forte densité peut ainsi avoir une influence non négligeable sur la composition macrobenthique du milieu (Kelly *et al.* 2002). Occasionnellement, *G. pulex* peut aussi devenir prédateur de poissons en se nourrissant de leurs œufs riches en éléments énergiques (McNeil *et al.* 1997, Kelly *et al.* 2002). Le cannibalisme est également très courant chez *G. pulex*, particulièrement envers les juvéniles et les individus affaiblis telles les femelles venant de muer. La capacité prédatrice de cette espèce envers d'autres *Gammarus sp.* est un des éléments expliquant sa forte compétitivité par rapport à d'autres espèces du même genre (Dick 1996, McNeil *et al.* 1997).

G. pulex et *G. fossarum* peuvent également se nourrir de végétaux vivants, mais ils ont cependant une préférence pour les débris végétaux grossiers du type litière (Welton et Clarke 1980). Les essences de bois tendre, telles que *Alnus glutinosa* (aulne) ou *Acer pseudoplatanus* (sycomore), sont préférées aux essences dits de bois dur, telles que *Fagus sylvatica* (hêtre) ou *Quercus robur* (chêne), probablement en raison de leur composition chimique moins riche en lignines et en tannins, donc plus digeste (McNeil *et al.* 1997, Kelly *et al.* 2002).

Quelques études ont également révélé l'importance cruciale de la microflore, notamment des champignons associés à la matière végétale morte, dans la sélection des éléments consommés. Ainsi, une nette préférence pour la consommation des feuilles colonisées particulièrement par *Anguillospora longissima* et *Heliscus lugdunensis* a été observée, avec néanmoins de fortes disparités entre les individus d'une même population (Graça *et al.* 1994b). Ces micro-organismes contribuent à la modification des matières végétales mortes et facilitent leur digestion par les gammarus.

Comme pour tous les « omnivores sélectifs » ou « généralistes opportunistes », la proportion de la part prédatrice et de la part détritivore du régime alimentaire de *G. pulex* est déterminée par la qualité nutritionnelle de la ressource choisie et sa disponibilité ainsi que par la dépense énergétique nécessaire à son utilisation (McNeil *et al.* 1997, Kelly *et al.* 2002). Dans le cas de ce crustacé, l'importance de l'énergie utilisée pour la respiration requiert une nourriture à haut rendement calorique (McNeil *et al.* 1997).

g) Micro-distribution

De façon générale, *G. pulex* est ubiquiste quant à sa sélection d'habitats (Maitland 1966, Dick 1996). L'habitat-type des gammares varie sensiblement selon qu'il s'agisse d'un cours d'eau à dominante minérale (avec des veines de courants plus ou moins prononcées), ou d'un cours d'eau à dominante organique avec un courant faible et uniforme. Globalement, *G. pulex*, et plus encore *G. fossarum*, sont plutôt rhéophiles tout en évitant les zones de très fort courant, préférant les pierres recouvertes de mousses offrant plus de points d'accroche à celles qui sont dénudées (Maitland 1966, Janetzki 1994, Dahl et Greenberg 1996, Elliott 2002). De la même façon *G. pulex* est significativement plus abondant dans les prélèvements de *Callitriche* que dans ceux de *Ranunculus*, les prélèvements sans macrophytes présentant les plus faibles densités (Welton 1979). Ceci correspond davantage à un comportement d'évitement qu'à une inaptitude à lutter contre le courant, des spécimens de *G. pulex* ayant été observé en train de nager contre un courant de 30 cm.s^{-1} (Dahl et Greenberg 1996). De la même façon, *G. fossarum* a été observé en train de remonter un courant à 40 cm.s^{-1} pendant quelques secondes avant toutefois de se faire emporter par celui-ci (Scherer 1965).

La plupart des observations sont obtenues à partir de prélèvements réalisés le jour. Or, *G. pulex* étant nocturne, comme de nombreux autres invertébrés aquatiques, son habitat change significativement entre le jour et la nuit (Elliott 2005). Ses préférences habitationnelles varient également selon sa taille, et donc son âge. Ainsi, dans un cours d'eau à dominante minérale, les individus s'agrègent dans des habitats-refuge durant le jour. Les densités sont alors avant tout expliquées par la taille des particules et de leurs interstices : les plus fines (0,5 à 8 mm) abritant les plus jeunes individus ($< 4,4 \text{ mm}$), les plus grosses (8 à 256 mm) abritant les individus plus âgés (Graça *et al.* 1994a, Elliott 2005). Des observations similaires ont été réalisées par Obdrlik (1972) pour *G. fossarum* avec de plus fortes densités dans les pierres que dans le sable, particulièrement pour les individus de grande taille.

Les bryophytes abritent préférentiellement les immatures et les adultes ($> 4,4 \text{ mm}$). Durant la nuit, les gammares sont plus actifs et leur habitat n'est plus corrélé à la taille des particules mais plutôt aux conditions hydrauliques : les juvéniles préfèrent alors les bordures aux faibles courant, les femelles adultes se trouvant aussi dans les secteurs de courant modéré, alors que les mâles adultes ne présentent pas de micro-distribution préférentielle (Elliott 2005). Dans un cours d'eau à dominante organique, le lien entre la micro-distribution de *G. pulex* et la taille des particules est moins net. Cependant, on observe une présence plus marquée des gros

individus dans les zones d'accumulation des feuilles mortes, ce type d'habitat étant considéré avant tout par rapport à l'abri qu'il procure plutôt qu'en tant que source de nourriture (Dahl et Greenberg 1996, Gee 1982). Cette répartition spatiale à l'échelle de la mosaïque d'habitats est une tendance et ses causes sont multifactorielles : intensité du courant, taux de parasitisme, présence de prédateurs, densité des populations, présence d'autres espèces de *Gammarus sp.* ou d'invertébrés aquatiques... (Maitland 1966, Dahl et Greenberg 1996, Elliott 2005).

h) Mouvements migratoires

La capacité d'effectuer des déplacements vers l'amont (rhéotaxie positive) est particulièrement marquée chez *Gammarus*, celle de *G. pulex* étant une des plus importantes parmi les invertébrés aquatiques. Cette activité est d'abord fortement liée à la luminosité, puis à la température de l'eau, aux précipitations et au niveau d'eau (Hultin 1971). Comme beaucoup de crustacés, *Gammarus sp.* est lucifuge : il réagit « positivement » à de faibles intensités de luminosité et « négativement » à de fortes intensités. Les effets des variations saisonnières de la luminosité sont modulées par la température de l'eau : une température très froide de l'eau (2-3°C), réduira l'activité de *G. pulex* à son minimum, alors qu'une hausse de quelques degrés l'augmentera sensiblement. Des variations plus localisées dans le temps de l'activité migratoire sont également imputables aux précipitations et à une variation du niveau d'eau. Ainsi, une augmentation de la vitesse du courant, même légère, se traduit par une augmentation de l'intensité des mouvements vers l'amont (Hultin 1971). Cet auteur a ainsi observé que les mouvements de rhéotaxie positive atteignent un maximum en juin-juillet et un minimum en mars. Ces comportements migratoires vers l'amont sont pratiqués par toutes les classes d'âge (Hultin 1971, Elliott 2005). Les mouvements sont plutôt nocturnes et lents, opérés essentiellement en bordure du cours d'eau où la vitesse de courant est plus lente, et lorsque les individus sont en quête de nourriture (Elliott 2002 et 2005).

Les mouvements migratoires engendrés par une rhéotaxie négative (dérive vers l'aval) peuvent concerner, à une échelle locale, 4 à 10% des individus d'une population par jour en l'absence de perturbation anthropique. Ces mouvements vers l'aval sont prédominants sur ceux effectués vers l'amont (Williams et Williams 1993). Cependant, cette dérive ne se fait que sur quelques mètres, principalement la nuit (Elliott 2002). Les principaux facteurs influençant la dérive nocturne de *G. pulex* sont d'abord les variations d'intensité du courant, et ensuite la densité du macrobenthos, particulièrement celle des gammares eux-mêmes. En revanche, ces deux facteurs n'expliquent que 40% des dérives diurnes. La distance parcourue

vers l'aval, et donc le temps de dérive, est aussi corrélée au type de substrat : elle sera plus importante en présence de roches dénudées qu'en présence de macrophytes ou de roches recouvertes de mousse. Ceci est particulièrement vraie pour une dérive dite passive, c'est-à-dire subie (Elliott 2002).

Les mouvements migratoires, qu'ils soient dirigés vers l'amont ou vers l'aval, ne sont pas nécessaires au maintien des populations amont, leur capacité de reproduction étant suffisante pour assurer leur pérennité (Elliott 2002). La forte propension des gammares à migrer constitue donc avant tout un mécanisme de colonisation ou de recolonisation, voire de fuite.

I.6.2. *Elmis aenea* (Ph. Müller 1806)

a) Classification et répartition

Cette espèce (Fig. I.2) de coléoptère (*Insecta*) appartient à la super-famille des *Dryopoidea*. Les *Elmidae* font également partie du sous-ordre des *Polyphaga* comme de nombreux coléoptères xylophages terrestres (cibles du traitement du bois), contrairement à la majorité des familles aquatiques (*Ditiscidae*, *Gyrinidae*, *Hydrobiidae*...) qui appartiennent à l'ordre des *Adephaga* et qui sont plutôt prédateurs.

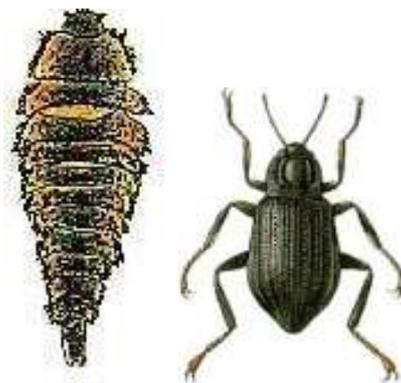


Figure I.2. Représentation schématique d'une larve (à gauche) et d'un imago (à droite) d'*Elmis aenea* (M.).
Echelle : 1 cm = 2 mm (Source : Olmi 1976).

L'aire de répartition de *E. aenea* recoupe celle de *E. maugetii* en s'étendant de la Lettonie au Portugal et au sud de l'Italie, et de l'Irlande à la Russie (Olmi 1976, Berthélemy 1979). *E. aenea* est une espèce microphage, et plus particulièrement cryptophage (Bertrand 1954). Cette espèce peut cohabiter dans les collines et en zone montagneuse avec *E. rioloides* (espèce un

peu plus alticole, Olmi 1976). *E. aenea* peut également cohabiter avec *E. maugetii* (espèce moins alticole, Berthélemy 1979). Cette zonation longitudinale est à moduler en fonction de la structure physique du milieu, celle-ci pouvant plus ou moins favoriser certaines de ces espèces et ainsi modifier la succession spécifique théorique (Berthélemy 1979).

b) Biologie et écologie

La présence d'*E. aenea* est fréquente dans les cours d'eau européens, les individus vivant souvent en forte densité (Malmqvist et Sjöström 1985, Elliott 2006). Cette espèce vit en zone lotique (Olmi 1976). Les adultes ont des griffes puissantes leur permettant de s'agripper à la végétation, alors que les larves s'abritent plutôt dans les anfractuosités (Bertrand 1954).

Cependant, qu'il s'agisse des larves ou des imagos, la vitesse moyenne du courant préférentielle déterminée par Malmqvist et Sjöström (1985) se situe aux alentours de 30 cm.s^{-1} . Toutefois, une étude portant sur trois autres espèces d'*Elmidae* a révélé que les larves avaient systématiquement une préférence pour des courants plus faibles que les adultes de la même espèce, par exemple de l'ordre de 60 cm.s^{-1} et 90 cm.s^{-1} pour respectivement les larves et les adultes d'*E. rioloides*.

En revanche, la profondeur préférentielle était sensiblement la même quel que soit le stade de développement, par exemple 30 cm pour *E. rioloides* (Degani *et al.* 1993). Néanmoins, tous les individus des trois espèces d'*Elmidae* étudiées (*E. rioloides*, *Grouvellinus caucasicus*, *Limnius letourneuxi*) sont susceptibles d'être rencontrés dans toutes les vitesses de courant et profondeurs étudiées, c'est-à-dire de 20 à 160 cm.s^{-1} et de 0 à 80 cm (Degani *et al.* 1993).

Toutefois, de fortes disparités écologiques peuvent être observées entre deux espèces d'un même genre d'*Elmidae* (Bertrand 1954). L'étude de Degani *et al.* (1993) est donc difficilement transposable à *E. aenea*, Malmqvist et Sjöström (1985) ayant observé une corrélation négative significative entre l'abondance des larves d'*E. aenea* et la profondeur.

Les imagos d'*E. aenea* vivent dans des substrats plutôt grossiers ($> 100 \text{ mm}$ de diamètre), les algues filamenteuses, les tiges et les feuilles de macrophytes, et plus particulièrement dans les bryophytes dans les zones à fort courant (Malmqvist et Sjöström 1985, Elliott 2006). Les larves de cette espèce se trouvent dans les mêmes substrats mais aussi et surtout dans des substrats à granulométrie plus fine ($< 80 \text{ mm}$ de diamètre, type gravier) ou sous les grosses pierres dans les zones à fort courant (Malmqvist et Sjöström 1985, Elliott 2006).

La présence de cette espèce, en particulier des imagos, est ainsi particulièrement dépendante de critères morphologiques du cours d'eau ainsi que de l'hétérogénéité des habitats présents

(Malmqvist et Sjöström 1985, Schleiter *et al.* 1999). L'abondance d'*E. aenea* dépend aussi de la conductivité du milieu (Schleiter *et al.* 1999).

Bien que les *Elmidae* constituent fréquemment une part importante des communautés macrobenthiques, leur cycle de vie n'a été détaillé que récemment (Elliott 2006). Selon cet auteur, les 6 phases de développement du cycle larvaire d'*E. aenea* se déroulent en un an, de l'éclosion des œufs (principalement en juin) à la nymphose sur les berges du cours d'eau (pendant 11 jours entre juillet à septembre). Les plus fortes mortalités sont enregistrées lors du déroulement de la première phase de ce cycle larvaire. Une autre année est nécessaire pour la maturation de l'adulte, c'est-à-dire de la métamorphose en imago à la production d'œufs (les femelles portent généralement entre 4 et 9 œufs pendant 31 jours). Les adultes matures sont présents toute l'année, mais plus abondants en mai et plus rares en janvier et février (Elliott 2006). Les *Elmidae* sont ainsi susceptibles d'être trouvés toute l'année dans l'eau contrairement à la plupart des autres représentant de la super-famille des *Dryopoidea* (Bertrand 1954). Elliott (2006) rapporte que pour 1000 œufs pondus, 851 arrivent à éclosion, 636 nouveaux-nés survivent jusqu'à l'hiver, 485 d'entre-eux entrent en nymphose, 408 adultes immatures apparaissent, dont 324 arrivent à maturité.

Contrairement aux larves, les imagos *E. aenea* sont très sensibles à un étiage sévère, ce qui est susceptible de perturber à long terme la population (Elliott 2006). Une explication à cette différence de sensibilité entre larves et adultes peut se trouver au niveau de leurs modes respiratoires respectifs. Les imagos respirent par des stigmates *via* la diffusion de l'air retenu par un plastron recouvert de soies hydrofuges sur la partie ventrale du thorax (Bertrand 1954). Or, cet air étant renouvelé par l'agitation de l'eau (les individus préférant les zones lotiques) ou par les bulles se formant à la surface de la végétation aquatique, les périodes d'étiage sévère sont particulièrement défavorables à la respiration des imagos (moins d'agitation de l'eau). Les soies hydrofuges d'imagos d'*E. aenea* étant particulièrement denses (10^6 à 10^8 soies.cm⁻²), et donc résistantes au « mouillage », elles nécessitent peu d'entretien (Kovac et Maschwitz 2000). Ainsi, à la différence de la plupart des autres familles de coléoptères aquatiques, ces imagos ne remontent jamais à la surface de l'eau ou sur les berges afin de nettoyer les soies ou de renouveler l'air au niveau du plastron, même lors de fortes températures ou d'une intense luminosité (Bertrand 1954, Kovac et Maschwitz 2000). Les larves ont une respiration branchiale dès l'éclosion (avec peut-être aussi une respiration cutanée lors des premiers stades), et ne sortent jamais de l'eau (Bertrand 1954). De tout le

cycle de vie d'*Elmis sp.*, seul le stade nymphal se fait en dehors du milieu aquatique (Bertrand 1954).

Résumé relatifs à la biologie et à l'écologie des organismes étudiés

G. pulex figure parmi les espèces d'invertébrés aquatiques les plus répandues à travers l'Europe et une partie de l'Asie et de l'Afrique du Nord. *G. fossarum* est également une espèce très répandue dans une grande partie de l'Europe. Ces vastes aires de répartition s'expliquent notamment par l'ubiquité de ces deux espèces d'amphipodes et par leur capacité à exploiter une grande variété de ressources alimentaires (détritivore, microphage, prédateur...). Par conséquent, ces deux taxons jouent un rôle clé dans la structure et le fonctionnement de nombreux écosystèmes aquatiques.

Bien que la biologie et l'écologie de *G. pulex* soient mieux connues que celle de *G. fossarum*, il semble que, à l'image de leurs morphologies très semblables, ces deux espèces aient un cycle de développement et un comportement assez proches. Ces caractéristiques, tels que le nombre de reproduction et la vitesse de croissance, sont largement dépendantes des conditions du milieu comme la température, le pH, le taux de calcium et de magnésium, la luminosité...

Elmis aenea appartient au sous-ordre des coléoptères *Polyphaga* comme une partie des organismes cibles des produits de traitement du bois. A l'image de *G. pulex* et *G. fossarum*, *E. aenea* a un cycle de vie quasi-exclusivement aquatique et cette espèce est largement répartie en Europe. En revanche, cette espèce est inféodée aux zones apicales lotiques, et on ne dispose pas d'information quant à sa sensibilité aux pesticides.

Synthèse et conclusion générale de l'état de l'art

Les essences de résineux (tels que le sapin ou l'épicéa) destinées notamment à faire de la charpente sont fréquemment traitées en scierie par immersion dans un bain contenant un mélange d'insecticides et de fongicides en solution. Les grumes stockées avant sciage sont également susceptibles de faire l'objet de traitements préventifs, particulièrement au printemps, par pulvérisation d'aérosols insecticides. Parmi les matières actives les plus utilisées dans les bacs de traitement figurent la cyperméthrine (insecticide pyréthrianoïde de synthèse), le propiconazole et le tébuconazole (fongicides triazolés), et l'IPBC (fongicide/bactéricide carbamate). Le traitement des grumes par aérosol utilise essentiellement de la deltaméthrine (insecticide pyréthrianoïde de synthèse).

Ces trois familles de pesticides ont des caractéristiques physico-chimiques qui leur confèrent des propriétés de transferts contrastées. Ainsi, les transferts des pyréthrianoïdes de synthèse sont avant tout régis par des mécanismes d'adsorption. En comparaison, les pesticides triazolés sont davantage rémanents et susceptibles d'être transférés entre les différents compartiments. D'utilisation beaucoup moins répandue que les précédentes molécules, l'IPBC peut servir de « marqueur » d'une activité de traitement du bois, dans les limites imposées par sa rapidité de biodégradation. Les pyréthrianoïdes de synthèse sont de loin les pesticides les plus toxiques parmi les trois familles de molécules étudiées, particulièrement pour les crustacés tels que *Gammarus sp.*. D'après les données disponibles, la toxicité aiguë de l'IPBC, du propiconazole et du tébuconazole pour les invertébrés aquatiques non-cibles est en comparaison relativement modérée voire faible.

Les milieux aquatiques situés à proximité d'aires de traitement régulier du bois (scieries) sont susceptibles d'être fortement et durablement contaminés par les produits de préservation utilisés. De plus, la fragilité des communautés aquatiques présentes dans les massifs forestiers traités par des pyréthrianoïdes de synthèse est avérée. Cependant, la connaissance de l'impact d'une aire de traitement du bois dite de « classe 2 » sur les biocénoses aquatiques environnantes demande à être très largement complétée. Cette lacune est notamment liée au déficit d'outils standardisés pour qualifier l'impact de substances toxiques sur les communautés aquatiques. L'évaluation de la vulnérabilité des taxons macrobenthiques engendrée par ces contaminants nécessite donc une meilleure compréhension des processus

d'impact. Dans cet optique, le choix d'un taxon bioindicateur doit s'effectuer selon sa sensibilité et son importance structurelle et fonctionnelle dans les écosystèmes. Ainsi *G. pulex* et *G. fossarum* (Crustacé, Amphipode) sont fréquemment retenus comme organismes-test en raison de leur rôle clé dans de nombreux écosystèmes aquatiques ainsi que de leurs faibles exigences écologiques leur conférant un aspect pratique pour un usage expérimental.

Afin de contribuer à une meilleure connaissance des processus d'altération des populations de ces deux espèces de crustacés, ainsi qu'au développement d'une méthode bioindicatrice utilisant ces taxons, des approches complémentaires propre à l'écotoxicologique doivent être mise en place. Cette complémentarité doit s'exprimer vis-à-vis du niveau d'organisation biologique concerné (échelle individuelle et populationnelle dans le cas présent) et vis-à-vis de la complexité du système étudié (approche holistique et réductionniste). En outre, l'écotoxicologie est par nature pluridisciplinaire : elle se trouve en particulier à la confluence de la chimie environnementale, de l'écologie ainsi que de la toxicologie environnementale (Ramade 2007). La complémentarité des observations réalisées devra donc aussi s'exprimer vis-à-vis de ces différentes disciplines.

Dans un premier temps, la présente thèse se propose d'appréhender par une approche chimique analytique, d'une part, les mécanismes d'adsorption d'une molécule utilisée dans le traitement du bois, et, d'autre part, d'évaluer le niveau de contamination du compartiment sédimentaire par les pesticides les plus fréquemment employés dans cette activité. Cette première approche vise ainsi à mieux cerner le risque d'exposition des organismes aquatiques aux produits de traitement du bois.

Dans un second temps, une approche hydro-écologique (qualifiée d'approche écotoxicologique holistique par Ramade 2007) permettra un suivi de populations de *G. pulex* et *G. fossarum* dans leur milieu naturel afin d'évaluer les conséquences *in natura* de la contamination par les produits de traitement du bois sur ces organismes.

Dans un troisième temps, une approche écotoxicologique (qualifiée d'approche toxicologique environnementale réductionniste par Ramade 2007) visera à établir, à l'échelle de l'individu, la toxicité aiguë de ces substances seules et en mélange, ainsi que les variations de la sensibilité de ces crustacés selon plusieurs modalités (espèce, origine géographique de la population, stade de développement).

Deuxième Partie

Approche chimique

II.1. Etude de l'adsorption du propiconazole sur un matériau adsorbant

Studies on adsorption of propiconazole on modified carbons. Separation and Purification Technology 46, p. 11–18, 2005.

II.2. Vers une évaluation de la contamination du compartiment sédimentaire d'un cours d'eau par les produits de traitement du bois

Approche chimique

L'impact des produits de traitement du bois sur les organismes aquatiques est notamment lié à leur exposition à ces pesticides. La compréhension des mécanismes régissant les transferts de ces biocides est donc primordiale à une compréhension des processus d'impact. L'adsorption conditionne fortement le transfert des substances dans l'environnement, particulièrement celles qui sont hydrophobes comme les substances utilisées dans le traitement du bois. Ainsi, selon leur capacité à être adsorbé en milieu aquatique, ces substances sont susceptibles d'être stockées dans le compartiment sédimentaire et/ou transportées par la phase aqueuse, et ainsi d'être plus ou moins biodisponibles (Maund *et al.* 2002).

Afin de mieux évaluer les transferts des produits de traitement du bois, une meilleure compréhension de certains mécanismes régissant leur adsorption doit être réalisée conjointement à un état de contamination du milieu aquatique. Par son approche chimique, le présent chapitre s'attache à :

- i) identifier un matériau adsorbant capable d'adsorber une matière active utilisée dans le traitement du bois,
- ii) déterminer la capacité d'adsorption maximale de ce matériau,
- iii) étudier les mécanismes d'adsorption,
- iv) développer une méthode analytique de dosage des produits de préservation du bois dans le sédiment,
- v) établir un état de contamination du compartiment sédimentaire d'un système aquatique à proximité d'une aire de traitement.

II.1. Etude de l'adsorption du propiconazole sur un matériau adsorbant

II.1.1. Rappels sur l'adsorption

a) Qu'est-ce que l'adsorption ?

L'adsorption liquide/solide est un phénomène physico-chimique de séparation par lequel des substances chimiques présentes dans un liquide se fixent à la surface d'un matériau solide. Le terme surface correspond à la totalité de la surface du solide, surface géométrique pour un solide non poreux, à laquelle s'ajoute, pour un matériau poreux, la surface interne des pores accessible aux substances chimiques (molécules ou ions). L'adsorption est donc un processus de partage de la substance chimique (appelée adsorbat) entre la solution aqueuse et le solide (appelé adsorbant). Les trois paramètres de l'adsorption sont l'adsorbant, l'adsorbat et la solution : c'est un système ternaire à trois composants où chacun possède ses caractéristiques propres. Différentes interactions peuvent alors se produire entre ces trois composants.

Les interactions entre un solide et un adsorbat font appel principalement à des mécanismes réactionnels. Il existe deux grands types d'adsorption :

- le premier type est l'adsorption physique (ou physisorption) où l'interaction de l'adsorbat avec la surface peut se faire simplement grâce aux forces d'attraction physiques (interactions intermoléculaires, forces de polarisation, dipôle, forces de van der Waals...) pour aboutir à de l'adsorption de surface.
- le second type est la chimisorption qui met en jeu la formation de liaisons chimiques.

La physisorption se produit rapidement car aucune énergie d'activation n'est nécessaire, et elle est parfaitement réversible. La chimisorption étant une réaction chimique (formation de liaison ionique ou covalente), elle nécessite une certaine énergie d'activation, et le processus est moins réversible que la physisorption, voire irréversible dans certains cas. La chimisorption est dite complète quand tous les centres actifs présents à la surface ont établi une liaison avec l'adsorbat.

A ces deux types d'adsorption, il faut ajouter les phénomènes de diffusion dus à la forme et à la structure de la particule solide, à savoir la diffusion de surface (diffusion externe ou diffusion de film) et la diffusion à l'intérieur de la particule (par exemple dans les pores, diffusion de pore ou diffusion intraparticulaire). Les phénomènes de diffusion permettent

d'obtenir des informations sur le type de mécanisme et ce sont, en général, les étapes qui limitent les cinétiques d'adsorption. Les phénomènes de diffusion dus à la solution peuvent être négligés dans le cas de solutions homogènes (ce qui est le cas dans les solutions dites en *batch*, méthode analytique que nous avons choisie dans notre cas). De même, on peut aussi négliger les mécanismes d'échanges de chaleur liés à au transfert et à la fixation de l'adsorbat.

b) Les paramètres de l'adsorption

Le phénomène d'adsorption liquide/solide, et en particulier le type de réaction (physisorption, chimisorption, ou les deux processus simultanément), dépend principalement des caractéristiques du matériau solide. Pour comparer et déterminer la capacité d'adsorption de deux matériaux donnés, on utilise souvent les différences dans leurs caractéristiques intrinsèques (origine et type de matériau, structure physique, chimie de surface) pour expliquer les résultats d'adsorption obtenus. Les données de la littérature montrent effectivement que le processus d'adsorption dépend principalement des caractéristiques texturales et des propriétés physico-chimiques de l'adsorbant (Crini 2005 et 2006). Les caractéristiques texturales à prendre en compte sont le type de particule (forme, nature), sa granulométrie (distribution), sa porosité et sa surface spécifique. Les propriétés chimiques du matériau sont ses fonctions de surface (présence de sites actifs, nature et nombre de ligands), et leur caractère chimique (ionique, amphotère et/ou amphiphile). Il est donc indispensable de bien choisir et de caractériser chaque matériau adsorbant utilisé en fonction de celle de l'adsorbat.

Cependant, la substance chimique est adsorbée non seulement parce qu'elle est attirée par le solide (par exemple pour former une liaison chimique), mais aussi parce que la solution peut la rejeter en raison de son hydrophobicité (dans le cas d'une substance organique). L'adsorption dépend alors non seulement du matériau solide et des caractéristiques de l'adsorbat (masse moléculaire, hydrophobicité, pKa, structure chimique), mais aussi des caractéristiques du liquide (solution). Il faut donc tenir compte de l'ensemble des interactions pouvant exister entre ces trois paramètres.

c) Méthode analytique

L'une des méthodes les plus utilisées dans la littérature est la méthode statique dite en *batch* (Crini 2006). Cette méthode a été utilisée dans l'étude présentée ci-après. Elle consiste à mettre en contact un volume fixe de solution contaminée à épurer avec une masse d'adsorbant

donnée, dans des conditions préalablement établies (temps d'agitation, concentration, pH, température...). L'ensemble (solution + adsorbant) est alors agité pendant un certain temps dit temps de contact, puis séparé par centrifugation ou filtration. La comparaison du surnageant et de la solution initiale par dosage analytique permet alors de déterminer l'efficacité de l'adsorbant (Figure II.1). Les méthodes en *batch* sont très utilisées car elles sont simples, faciles à mettre en place, et rapides. De plus, elles permettent de faire varier un nombre important de paramètres (type de particule, concentration, force ionique, présence d'impuretés, etc...) tout en obtenant facilement des résultats reproductibles.

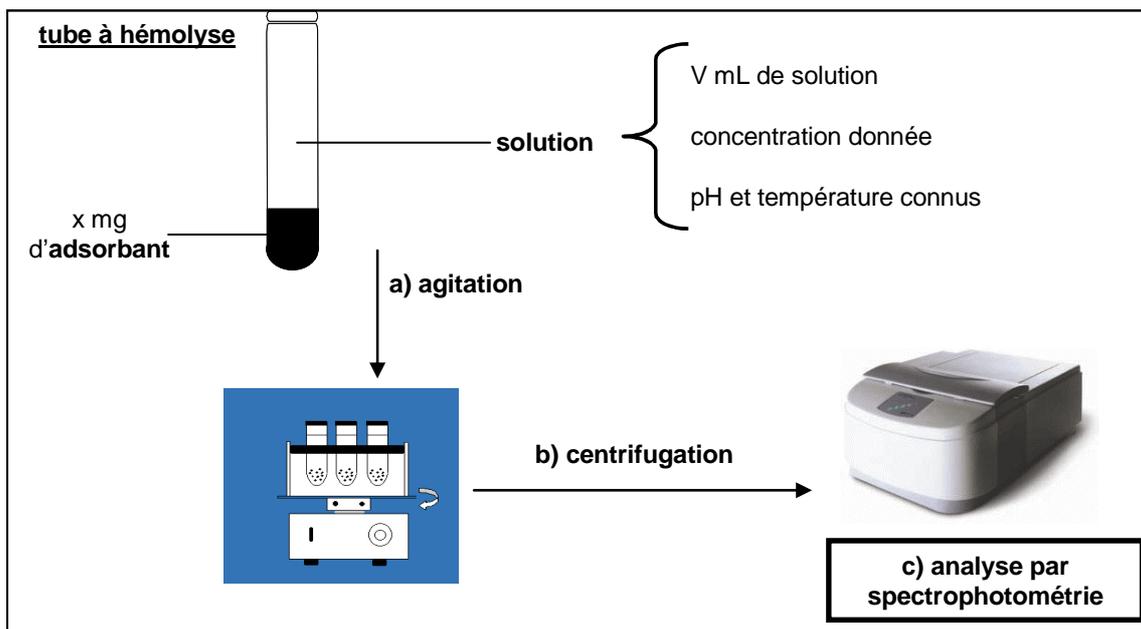


Figure II.1. Méthode analytique statique dite en *batch*.

d) Les matériaux adsorbants : les charbons actifs commerciaux (CAC)

Notre choix de matériau adsorbant s'est porté sur les charbons actifs (CA). Les CA sont les systèmes les plus utilisés pour décontaminer une solution contenant des contaminants. Ils sont largement utilisés en raison de leur grande efficacité vis-à-vis d'une large gamme de polluants incluant les métaux lourds, les colorants, les pesticides, les dérivés aromatiques et phénoliques (HAP, PCB...) ou encore les odeurs (Crini 2006).

Les charbons actifs commerciaux (CAC) sont obtenus à partir de différentes ressources comme le bois (exemple le pin maritime des Landes), la noix de coco, la houille bitumeuse, la lignite ou encore la tourbe. Ils sont activés physiquement ou chimiquement à haute température. Cette activation confère aux CAC leur structure poreuse, leur chimie de surface

et leurs fortes propriétés d'adsorption. Par exemple, un traitement de charbon par des substances oxydantes est susceptible de modifier ses propriétés de surface via la formation de groupes fonctionnels oxygénés, ce qui améliore ses propriétés intrinsèques d'adsorption. Afin de contrôler un maximum de paramètres dans le dispositif expérimental (approche réductionniste), et ainsi de mieux comprendre les mécanismes opérant sur l'adsorption du pesticide, le choix a été fait de travailler avec ce type de matériau adsorbant.

e) Choix de la molécule testée

Parmi les matières actives les plus utilisées dans le cadre du traitement du bois figurent les pyréthriinoïdes de synthèse (Chapitre I.1). Les mécanismes d'adsorption de ces insecticides sont relativement connus (Zhou et Rowland 1997, Oudou et Hansen 2002, Zhu et Selim 2002a, Bondarenko *et al.* 2006), et leur rapide adsorption, notamment par les particules en suspension ou sédimentaire, a été de nombreuses fois observée (Zhou *et al.* 1995a et 1995b, Maund *et al.* 2002, Liu *et al.* 2005, Gan *et al.* 2005, Bondarenko *et al.* 2006). Le choix de la molécule testée avec le CA s'est donc fait parmi les trois fongicides étudiés dans cette thèse et dont les observations disponibles quant à leur adsorption sont beaucoup moins nombreuses que pour les pyréthriinoïdes de synthèse.

Les caractéristiques physico-chimiques de ces fongicides leurs permettent d'être à la fois dissous dans l'eau et/ou adsorbés par les particules solides (voir Tableaux I.5 à I.7 du chapitre I.4). L'IPBC posant des problèmes de stabilité en milieu aqueux, le choix de la molécule-test s'est porté sur un des deux fongicides triazolés (le propiconazole et le tébuconazole). Ces deux molécules ont un coefficient de partage entre la phase aqueuse et la phase organique (K_{ow}) du même ordre de grandeur : leur $\log K_{ow}$ est compris entre 2,81 et 3,72 à 25°C.

Le choix s'est porté sur le propiconazole en raison de sa plus grande solubilité dans l'eau, et donc de sa plus grande potentialité à être présent sous forme dissoute dans la phase aqueuse que le tébuconazole. D'un point de vue pratique, cela nous a permis de travailler à de fortes concentrations afin d'évaluer la capacité maximale d'adsorption du charbon. D'un point de vue environnemental, le propiconazole est relativement rémanent (demi-vie en milieu aquatique comprise entre 25 à 636 jours) et ce fongicide est largement utilisé en agriculture à travers le monde. Sa présence dans le milieu aquatique est susceptible de poser des problèmes environnementaux et de santé pour l'Homme (Juntunen et Kitunen, 2003; Ekelund *et al.*, 2000; Lode *et al.*, 1995). Pour information, les caractéristiques physico-chimiques de ce pesticide sont indiquées dans le Tableau I.6 (chapitre I.4.3) et son écotoxicité pour les

organismes aquatiques est récapitulée dans le Tableau I.10 (chapitre I.5.3). A notre connaissance, il n'y a pas de donnée expérimentale entre le propiconazole et les CA.

II.1.2. Etude de l'adsorption du propiconazole sur du charbon actif modifié

La présente étude vise, d'une part, à étudier l'adsorption du propiconazole sur des charbons modifiés, et d'autre part, à évaluer l'influence d'un certain nombre de paramètres sur les cinétiques et les isothermes d'adsorption du propiconazole par du CA. Les paramètres étudiés sont les suivants : la chimie de surface du CA, la température, le temps de contact et la concentration en fongicide. La modification de la chimie de surface du charbon a été étudiée dans l'objectif de mieux appréhender les mécanismes d'adsorption, et d'identifier le type d'interaction impliqué à savoir la chimisorption ou la physisorption. Pour se faire, trois charbons différents, deux acides (notés AC1 et AC3), et un basique (AC2), ont été préparé à partir d'un charbon commercial (UAC) ; les charbons UAC, AC2 et AC3 présentant une surface spécifique quasiment identique (de l'ordre de $1000 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$).

Cette étude expérimentale a fait l'objet d'un article publié dans la revue *Separation and Purification Technology* 46, p. 11–18, 2005. Les auteurs sont Olivier Adam, Maud Bitschené, Giangiacomo Torri, François Degiorgi, Pierre-Marie Badot et Grégorio Crini.



Studies on adsorption of propiconazole on modified carbons

Olivier Adam^a, Maud Bitschené^b, Giangiacomo Torri^c, François De Giorgi^a,
Pierre-Marie Badot^a, Grégorio Crini^{b,*}

^a *Laboratoire de Biologie Environnementale, EA 3184 USC INRA, Université de Franche-Comté, Place Leclerc, 25000 Besançon, France*

^b *Centre de Spectrométrie, SERAC, Université de Franche-Comté, 16 route de Gray, 25030 Besançon cedex, France*

^c *Istituto Scientifico di Chimica e Biochimica "G. Ronzoni", 81 Via G. Colombo, 20133 Milano, Italy*

Received 15 November 2004; received in revised form 30 March 2005; accepted 31 March 2005

Abstract

The adsorption capacity and kinetics of propiconazole in aqueous solution using untreated and treated activated carbons as adsorbents have been studied, providing new experimental data at different temperatures which were obtained using the bottle-point method. Untreated carbon was oxidized with HNO₃, H₂O₂, NaOCl and NaOH to produce a series of samples with different surface chemical properties. The surface chemistry was characterized by the determination of the point of zero charge. It was found that the physical morphology of the sample is affected by the strength of the oxidizing agent and the operating conditions. The surface chemistry of the activated carbon plays a key role in pollutant adsorption performance. Results of sorption experiments showed that carbon modified with NaOH is the best material for the adsorption of propiconazole at pH 6.5. Sorption of propiconazole reached equilibrium in 120 min. The maximum adsorption onto untreated activated carbon was 101 mg/g. As expected, the adsorption increased with increasing temperature. Adsorption kinetics obeyed a second-order kinetic model.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Activated carbon; Propiconazole; Adsorption

1. Introduction

Adsorption is an effective separation process for a wide variety of applications. In particular, adsorption is a well-established technique for treating domestic and industrial effluents. It is now recognized as an efficient and economic method for the removal of pollutants from wastewaters. Although many different adsorbents were tested to remove toxic compounds from wastewaters (Crini and Morcellet, 2002; Bailey et al., 1999b; Pollard et al., 1992), activated carbons, in granular or powdered form, were still the most widely used sorbents to this end (Chern and Chien, 2002). Extensive experimental and modelling studies have been reported to date on the activated carbon adsorption of a broad spectrum of hazardous compounds from aqueous solution.

The presence of pollutants such as triazole fungicides in waters poses health and environmental risks (Juntunen and Kitunen, 2003; Ekelund et al., 2000; Lode et al., 1995). The triazole fungicides are agrochemicals used world wide in the agricultural industry due to their wide spectrum of action. The European Union has listed the persistent and potentially

toxic compounds. Propiconazole (1-(2-(2,4-dichlorophenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-ylmethyl)-1*H*-1,2,4-triazole), a systematic foliar triazole fungicide, is one of them in this priority list. Its toxicity is moderate: the acute oral LD₅₀ is around 1500 mg/kg in rats (European Commission Document, SANCO/3049/99, 2003). However, this organic compound has been classified as a possible human carcinogen by the U.S. Environmental Protection Agency (Vialaton et al., 2001).

In this paper, we are describing the complexing properties of untreated and treated carbons toward propiconazole, using the bottle-point method. The influence of several parameters (kinetics of sorption, i.e., contact time, effect of the pollutant concentration, temperature) on the sorption capacity of these carbons is evaluated. The modifications in the surface chemistry resulting from the oxidizing treatments are also studied.

2. Apparatus and methods

2.1 Apparatus

The UV measurements were recorded on an Uvikon XL spectrophotometer (UVK-LAB, Trappes, France). All measurements were carried out at 20 °C with quartz cells having a 10 cm optical path.

2.2 Adsorbent and solute

Adsorb GN-AZ carbon, kindly supplied by Asseau SA (Belgium), was used in this study. According to the supplier specifications, this carbon has a surface area of approximately 1000 m²/g and a neutral pH. Prior to use, the untreated carbon was washed several times with distilled boiling water to remove water soluble material present in the carbon. It was then dried at 110 °C for 24 h. Propiconazole was obtained from Janssen (Belgium) and used without purification (see Fig. II.2 for the chemical structure).

2.3 Procedure for the treated activated carbons

The treatments outlined below were carried out in order to obtain carbons with different surface chemistries. Nitric oxidation was carried out as follows: 100 cm³ of a concentrated HNO₃ solution (3M) was slowly poured on 5 g of untreated AC (UAC) located in a flask. The

solution was heated to boiling for 2 h. After cooling, the solution was then stirred with a vortex mixer for 20 h at room temperature. The carbon was filtered, extensively washed with distilled water until neutral pH, and then dried under vacuum at 110 °C for 24 h (sample AC1). The modification of carbon with NaOH (sample AC2) was achieved in conditions similar to those used for nitric oxidation. The NaOH ions in excess in the solution were neutralized by HCl. Oxidation with H₂O₂ (sample AC3) was prepared by mixing UAC with a solution of 6 M H₂O₂ at room temperature until complete degradation of the H₂O₂. Samples AC2 and AC3 were separated by filtration, washed and dried by the same procedures as described above.

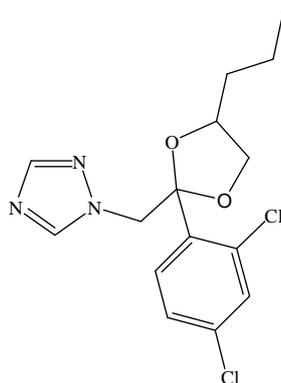


Fig. II.2. Chemical structure of propiconazole.

2.4 Point of zero charge (PZC) measurements

Mass titration, proposed by Noh and Schwarz (1989), was carried out to estimate the point of zero charge (PZC). This was done by placing various amounts of carbon in 20 ml solutions of 0.1 N NaCl. The solutions were placed on a shaker for 24 h, after which the pH was measured. The PZC occurs when there is no change in the pH after contact with the carbon.

2.5 Adsorption of propiconazole

Adsorption isotherms, kinetics and maximal adsorption capacities were determined by the bottle point method. This method has already been described in detail (Crini, 2003; Delval et al., 2003). In each adsorption experiment, 100 ml of propiconazole solution of known concentration were added to 100 mg of carbon in a 250-ml round-bottom flask at 25±1°C. The initial pH of the solutions was 6.5±0.1. The solution was then stirred on a horizontal shaker operated at 100 rpm. Kinetics of sorption were determined by analyzing the adsorptive uptake of the propiconazole from aqueous solutions at different time intervals to determine when adsorption equilibrium was reached and the maximum removal of pollutant was

attained. The carbon was removed by centrifugation before measurements. The residual concentration of the pollutant was measured by spectrophotometry. The adsorption capacity was then calculated and expressed in percentage uptake (R in %), which represents the ratio between the amount of adsorbed pollutant and the starting amount of propiconazole. Initial pollutant concentration in the solution was varied to investigate its effect on the adsorption capacity. Adsorption experiments were also carried out at different temperatures. This was done by maintaining the water bath with a magnetic stirrer at 20, 25, 30 and 35 °C.

3. Results

3.1. Characterization of the carbons

The untreated carbon (UAC sample) was modified by HNO₃, NaOH and H₂O₂ in order to introduce various oxygen functional groups on the carbon surface. Table II.1 shows the elemental analysis of the samples of AC. The oxygen content was obtained by difference. It can be seen that treatment with HNO₃ (AC1 sample) leads to a substantial increase in oxygen content. It is well known that oxidation causes an increase in the surface oxygen content of the carbon. Oxidations with HNO₃ and H₂O₂ are known to generate acidic carbons with large amounts of surface acidic groups, mainly carboxylic and phenol groups, whereas treatments with H₂O₂ produce less acidic materials (Pereira et al., 2003; Shim et al., 2001; Figueiredo et al., 1999). Samples AC2 and AC3 also have a higher amount of oxygen than commercial carbon. The nitrogen content remains 0.3 % except for the sample treated with nitric acid that shows a higher content. Moreno-Castilla et al. (1995) showed that nitro surface groups are present on the surface after such a treatment. Recently, Haydar et al. (2003) reported similar results.

Sample	C %	H %	N %	O %	pH _{PZC}	S _{BET} (m ² /g)
UAC	97.35	0.56	0.32	1.77	7.6	1050
AC1	85.41	0.74	0.59	13.26	2.9	862
AC2	89.29	0.83	0.32	9.56	10.9	1012
AC3	89.91	0.86	0.31	8.91	5.2	1024

Table II.1. Results of elemental analysis, pH_{PZC} and surface specific area of AC samples.

Measurements of the pH of the point of zero charge (pH_{PZC}) for all carbons - i.e. the pH above the total surface of the carbon particles is negatively charged - are also reported in Table II.1.

The pH_{PZC} values showed that the nature of an activated carbon surface can be changed by chemical treatment. As the carbon surface becomes oxidized, its point of zero charge value is lowered. As expected, HNO_3 and H_2O_2 oxidations yielded carbons with the lowest pH_{PZC} . Therefore, the PZC can be considered as an excellent reference index for correlating changes in the surface acidity of carbons, as suggested by Ania et al. (2002). Sample AC3 has a more acidic character than the untreated carbon and sample AC2 has the highest basic character.

No major differences in the specific surface areas of samples AC2 and AC3 were observed. The specific surface areas of sample AC1 are decreased by the chemical treatment. Nitric acid oxidation not only alters the surface chemical properties of the carbon but also its texture. Shim et al. (2001) reported that the BET surface area values are considerably decreased due to the blocking of the narrow pores by the surface complexes introduced by chemical modification with HNO_3 . Ania et al. (2002) also showed that nitric acid produced a mechanical destruction of the pores.

3.2. Effect of carbon surface modifications on adsorption

In order to examine the effects of the surface properties of activated carbon on the adsorption of propiconazole, commercial AC was treated under different conditions, to alter its surface properties. The comparison between adsorption capacity of propiconazole on untreated and treated carbons obtained at 50.6 mg/l in distilled water is presented in Fig. II.3. All the carbons showed their ability to adsorb the pollutant with various levels of efficiency. If the carbons are ranked in terms of pollutant removal capacity at $\text{pH} = 6.5$ they come in the following order: $\text{AC2} > \text{UAC} > \text{AC3} > \text{AC1}$. Carbon treated with NaOH (sample AC2) possessed the highest adsorption capacity due to its high specific surface area: all the pollutant present in the solution was adsorbed ($R = 100\%$). However, as described in Table II.1, no drastic changes in the specific surface area values of samples UAC, AC2 and AC3 were observed, suggesting that the differences in the capacities of these three samples will be mainly due to their acid surface properties. We also supposed that for samples AC2 and AC3, surface oxygen groups have the same effect on adsorption (Table II.1). Using these results, it was assumed that the physical adsorption in the carbon network and the presence of other interactions (pollutant-carbon interactions and hydrogen bonding), were involved in the mechanism of sorption.

Propiconazole is an organic molecule with an acid character ($pK_a = 1$); thus, when dissolved in water ($pH = 6.5$), it was expected that this pollutant would preferably adsorb onto carbons with basic characteristics. At $pH = 6.5$, if the acid-base interactions were the main adsorption mechanism, acid pollutant would be expected to have greater affinity for sample AC2 ($pH_{PZC} > pH$). In fact, when comparing the adsorption capacity, we observed that sample AC2 has a better performance for propiconazole than sample AC3. This confirmed that the acid-base interactions play an important role in the sorption mechanism.

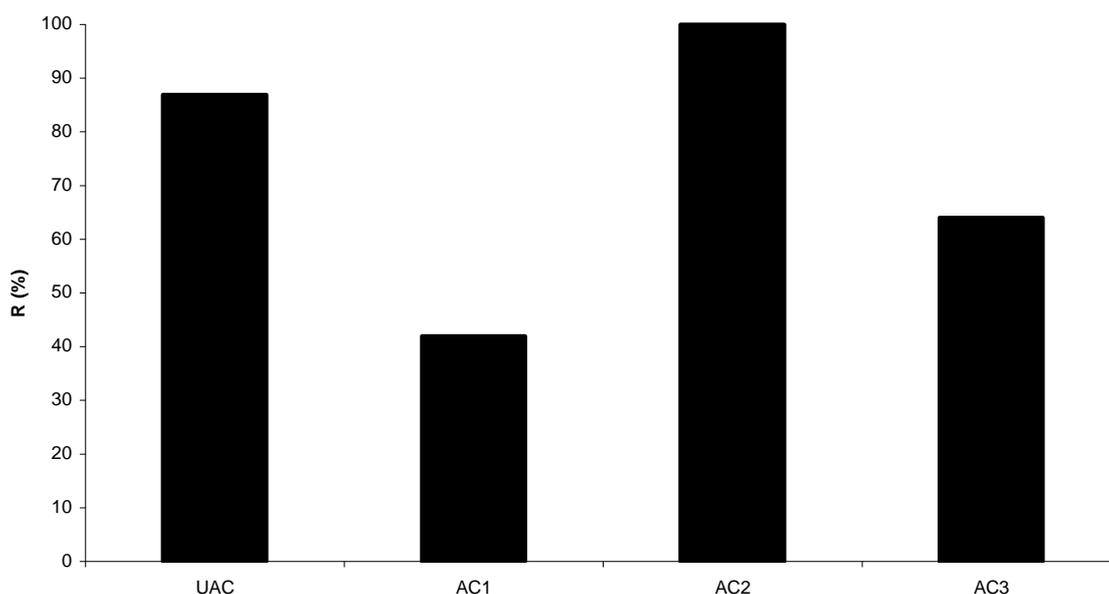


Fig. II.3. Comparison between adsorption capacity (R in %) of propiconazole on untreated and treated carbons (carbon dose = 100 mg/100 ml; initial concentration = 50.6 mg/l; initial pH = 6.5; contact time = 120 min; temperature = $25 \pm 1^\circ C$).

Since samples AC1 and AC3 have PZC values less than 6.5, at this pH, the overall charge of the carbon surface is negative, and the more oxygenated surfaces have a stronger negative charge. For these samples, we observed a decreasing capacity of propiconazole adsorption upon increasing surface oxygen content of carbon. These groups reduced the electron density on the surface of the carbon. A similar conclusion was reported by Radovic et al. (1997). When the surface is oxidized it becomes more hydrophilic than that of the untreated surface at this pH. As a result, the pollutant uptake is reduced. We also supposed that carboxylic groups created by nitric treatment may block micropore entrances and consequently prevent the access of propiconazole molecules to adsorption sites (Franz et al., 2000; Biniak et al., 1990). Untreated carbon was also efficient for the removal of propiconazole at $pH = 6.5$ ($R = 87\%$).

In this case, the difference in adsorption capacity could be attributed to the better physical structure and surface area of the UAC sample compared to treat of samples AC1 and AC3. The results showed that the adsorption capacity for propiconazole on activated carbon is to a large extent dependent, on the chemistry of the sample.

3.3. Effect of contact time

A plot of adsorption capacity (R in %) versus adsorption time (contact time in min) is shown in Fig II.4, indicating that the process is uniform with time. The initial pollutant uptake was not so rapid and it attained equilibrium gradually. However, the kinetics of sorption was fast: equilibrium is achieved in about 45 min at 25 °C; thereafter it remains almost unchanged with time. 120 min were found to be sufficient for reaching the plateau for all carbons and for the next experiments we used this contact time.

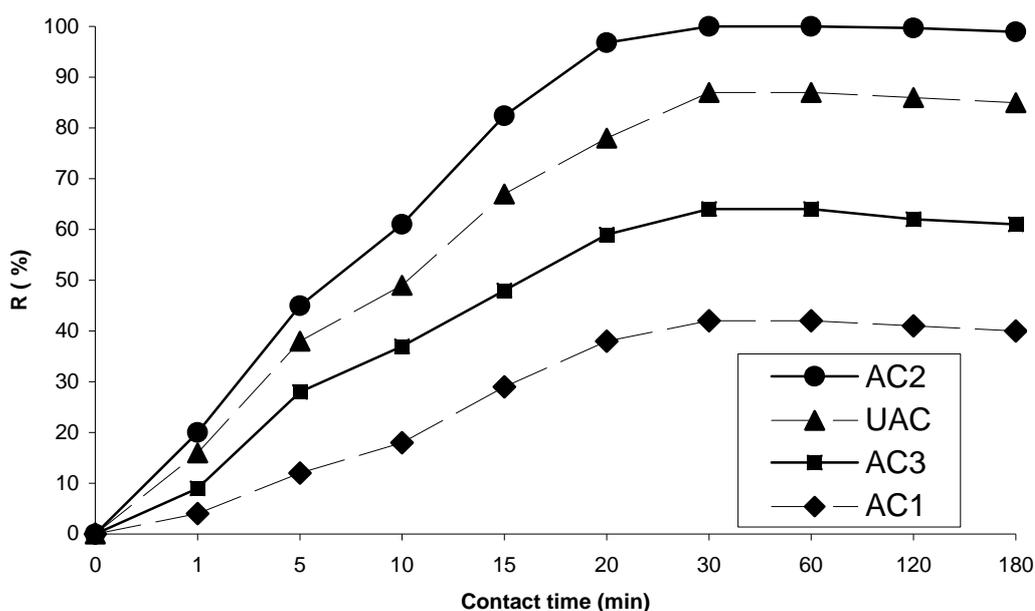


Fig. II.4. Effect of contact time on propiconazole adsorption (carbon dose = 100 mg/100 ml; initial concentration = 50.6 mg/l; initial pH = 6.5; temperature = 25 ±1°C).

3.4. Effect of concentration

Experiments were conducted with untreated and treated carbons at different propiconazole concentrations (25.3-101.2 mg/l) whilst maintaining the temperature (25±1°C) and

equilibrium time constant (120 min). Fig. II.5 showed that the order of adsorption capacity was always the same and was independent of the starting concentration. Sample AC1 always exhibited lower sorption capacity. The quantity of the retained pollutant depended on the concentration of the aqueous solution. For sample AC2, the results showed that the adsorbed quantity was identical ($R = 100\%$) in the concentration range. At 67.4 mg/l propiconazole concentration, AC2 had 2 and 3 times more adsorption capacity than AC3 and AC1, respectively. The maximum adsorption onto sample AC2 was 101 mg/g. For samples AC1 and AC3, the capacity decreased with concentration.

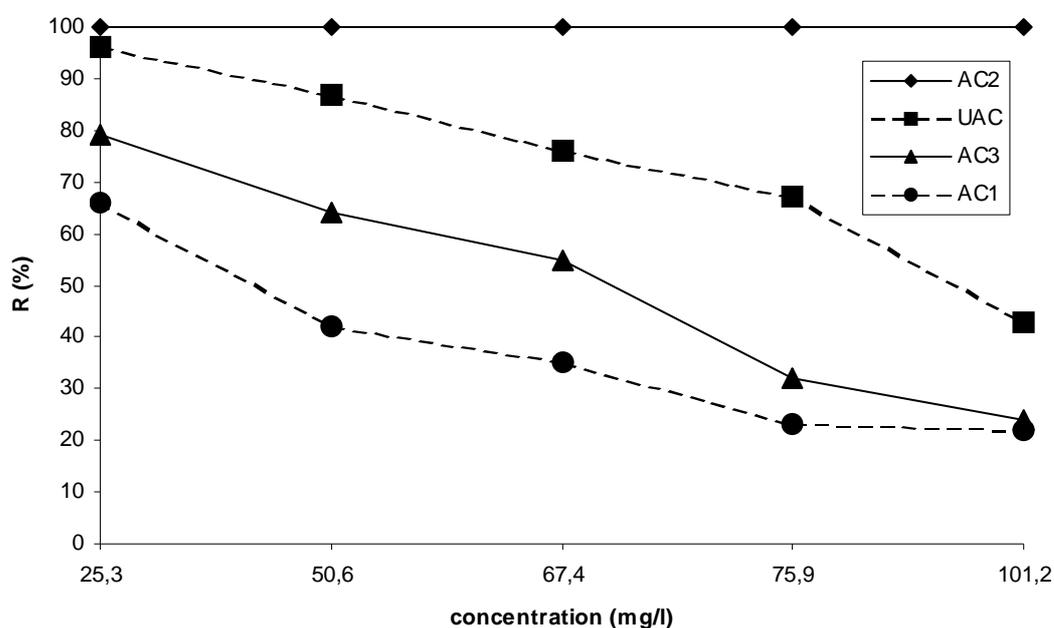


Fig. II.5. Effect of carbon surface change on propiconazole adsorption (carbon dose = 100 mg/100 ml; initial pH = 6.5; contact time = 120 min; temperature = $25 \pm 1^\circ\text{C}$).

3.5. Effect of temperature

As expected, temperature has great effect on the adsorption process. The plot of adsorption capacity as a function of temperature (Fig. II.6) showed an increasing amount of adsorbed propiconazole in temperature from 20 to 35 °C for samples UAC, AC1 and AC3. The adsorption by sample AC2 was unaffected temperature changes in the range 20-35 °C. The adsorption increased with temperature may be due to the increase of the intraparticle diffusion rate of pollutant into the pores at higher temperature as diffusion is an endothermic process.

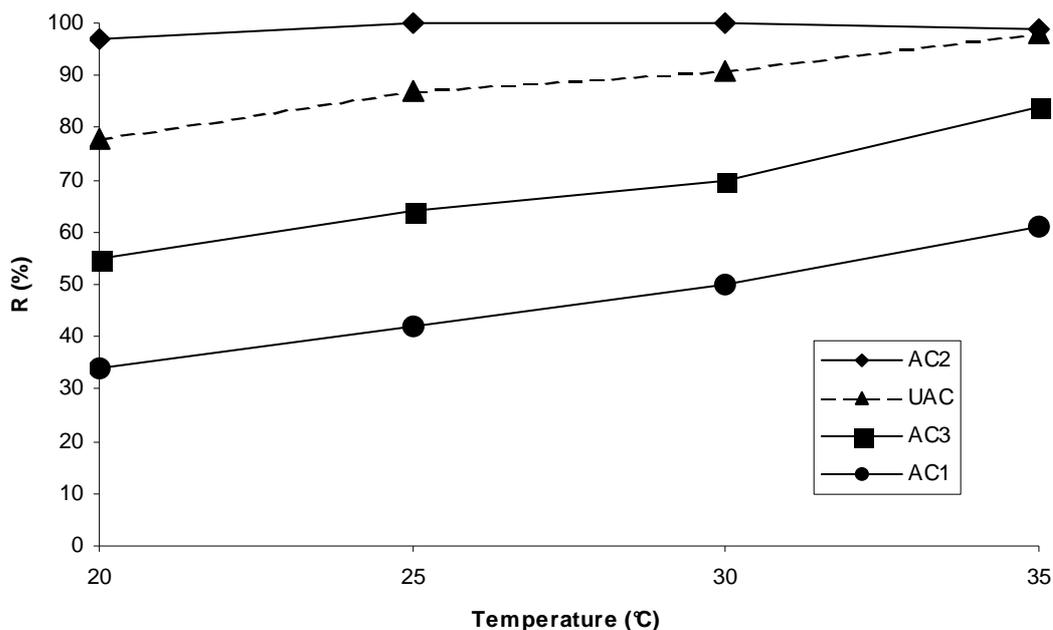


Fig. II.6. Adsorption of propiconazole on untreated and treated carbons as a function of temperature (carbon dose = 100 mg/100 ml; initial concentration = 50.6 mg/l; initial pH = 6.5; contact time = 120 min).

3.6. Adsorption mechanism

Carbons adsorbents are very versatile due to their high surface area, well-developed pore structure, and surface properties (Nouri et al., 2002; Dubinin, 1966). Although extensive experimental and modelling studies on activated carbons have been reported, the subject remains highly controversial as described in a review by Radovic et al. (2000). The sorption mechanism is yet not fully understood and much confusion exists in the literature (Radovic et al., 2000; Franz et al., 2000).

Fig. II.2 clearly indicated a decrease in adsorption capacity for samples AC1 and AC3 as the amount of surface oxygenation is increased. Based on these results, the donor-acceptor adsorption mechanism for the effect of oxygen groups proposed by Mattson et al. (1969) is not the dominant mechanism for propiconazole adsorption. Our results suggested that the surface chemistry of the activated carbon plays a key role in pollutant adsorption performance. In particular, the acid-base interactions played a major role in the adsorption mechanism. Radovic et al. (1997) reported two adsorption mechanisms to explain the adsorption of organics in activated carbons: one involving electrostatic interactions and a second one involving dispersive interactions. We also supposed that propiconazole adsorption on basic samples is produced by dispersive interactions between the π electrons in the

aromatic ring of the pollutant and the π electrons in the carbons. Basic functional groups on the carbon surface increase π electron density on the graphene layers of the sample, and thus dispersive interactions between π - π electrons are stronger (Ania et al., 2002; Radovic et al., 1997). As the adsorption of propiconazole requires the presence of basic surface oxygen groups, complexation decreases in the oxidized samples.

4. Conclusion

Adsorption results showed that untreated carbon and basic carbon exhibited good sorption properties towards propiconazole. The results suggested that the surface chemistry of the activated carbon plays a key role in pollutant adsorption performance. We observed that the presence of oxygen-containing functional groups, which are electron-withdrawing groups, had a negative effect on the adsorption of propiconazole, thus decreasing the adsorption potential for the pollutants. The proposed adsorption mechanism involved several kinds of interactions: physical adsorption in the carbon network, acid-base interactions and hydrogen bonding. As expected, the adsorption increased with increasing temperature.

References

- Ania, C.O., Parra, J.B., Pis, J.J., 2002. Influence of oxygen-containing functional groups on active carbon adsorption of selected organic compounds. *Fuel Proc. Technol.* 79, 265-271.
- Bailey, S.E., Olin, T.J., Bricka, M., Adrian, D.D., 1999b. A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. *Wat. Res.* 33, 2469-2479.
- Biniak, S., Kazmierczak, J., Swiatkowski, A., 1990. Adsorption of phenol from aqueous solutions on activated carbons with different oxygen contents. *Adsorp. Sci. Technol.* 6, 182-191.
- Chern, J.M., Chien, Y.W., 2002. Adsorption of nitrophenol onto activated carbon: isotherms and breakthrough curves. *Wat. Res.* 36, 647-655.
- Crini, G., 2003. Studies on adsorption of dyes on beta-cyclodextrin polymer. *Bioresour. Technol.* 90, 193-198.
- Crini, G., Morcellet, M., 2002. Synthesis and applications of adsorbents containing cyclodextrins. *J. Sep. Sci.* 25, 789-813.
- Delval, F., Crini, G., Morin, N., Vebrel, J., Bertini, S., Torri, G., 2002. Sorption of textile dyes on crosslinked polysaccharides derivatives. *Dyes and Pigments* 53, 79-92.
- Dubin, M.M. Porous structure and adsorption properties of activated carbons. In: Walker Jr. P.L., editor, *Chemistry and physics of carbon*, vol. 2, New-York: Marcel Dekker, 1996, pp. 51-120.
- Ekelund, F., Westergaard, K., Soe, D., 2000. The toxicity of the fungicide propiconazole to soil flagellates. *Biol. Fertil. Soils* 31, 70-77.

- Figueiredo, J.L., Pereira, M.F.R., Freitas, M.M.A., Orfao, J.J.M., 1999. Modification of the surface chemistry of activated carbons. *Carbon* 37, 1379-1389.
- Franz, M., Arafat, H.A., Pinto, N.G., 2000. Effect of chemical surface heterogeneity on the adsorption mechanism of dissolved aromatics on activated carbon. *Carbon* 38, 1807-1819.
- Haydar, S., Ferro-Garcia, M.A., Rivera-Utrilla, J., Joly, J.P., 2003. Adsorption of p-nitrophenol on an activated carbon with different oxidations. *Carbon* 41, 387-395.
- Juntunen, M.L., Kitunen, V., 2003. Leaching of propiconazole and chlorothalonil during production of *Pinus sylvestris* seedlings in containers. *Scand. J. For. Res.* 18, 45-53.
- Lode, O., Eklo, O.M., Holen, B., Svensen, A., Johnsen, A.M., 1995. Pesticides in precipitation in Norway. *The Science of the Total Environment* 160/161, 421-431.
- Mattson, J.S., Mark, H.B., Malbin, M.D., Weber, W.J., Critten, J.C., 1969. Surface chemistry of active carbon: specific adsorption of phenol. *J. Colloid Int. Sci.* 3, 116-130.
- Moreno-Castilla, C., Ferro-Garcia, M.A., Joly, J.P., Bautista-Toledo, I., Carrasco-Marin, F., Rivera-Utrilla, J., 1995. Activated carbon surface modifications by nitric acid, hydrogen peroxide, and ammonium peroxydisulfate treatments. *Langmuir* 11, 4386-4392.
- Noh, J.S., Schwarz, J.A., 1989. Estimation of the point of zero charge of simple oxides by mass titration. *J. Colloid Int. Sci.* 130, 157-164 .
- Nouri, S., Haghseresht, F., Max Lu, G.Q., 2002. Comparison of adsorption capacity of p-cresol & p-nitrophenol by activated carbon in single and double solute. *Adsorption* 8, 215-223.
- Pereira, M.F.R., Soares, S.F., Orfao, J.J.M., Figueiredo, J.L., 2002. Adsorption of dyes on activated carbons: influence of surface chemical groups. *Carbon* 41, 811-821.
- Pollard, S.J.T., Fowler, G.D., Sollars, C.J., Perry, R., 1992. Low-cost adsorbents for waste and waste water treatment: a review. *Sci. Total Environ.* 116, 31-52.
- Radovic, L.R., Moreno-Castilla, C., Rivera-Utrilla, J., 2000. Carbon materials as adsorbents in aqueous solutions. In: Radovic, L.R., ed. *Chemistry and physics of carbon*, vol. 27, New-York: Marcel Dekker, p. 227-405.
- Radovic, L.R., Silva, I.F., Ume, J.I., Menendez J.A., Leon y Leon, C.A., Scaroni, A.W., 1997. An experimental and theoretical study of the adsorption of aromatics possessing electron-withdrawing and electron-donating functional groups by chemically modified activated carbons. *Carbon* 35, 1339-1348.
- Shim, J.W., Park, S.J., Ryu, S.K., 2001. Effect of modification with HNO₃ and NaOH on metal adsorption by pitch(based activated carbon fibers. *Carbon* 39, 1635-1642.
- Vialaton, D., Pilichowski, J.F., Baglio, D., Paya-Perez, A., Larsen, B., Richard, C., 2001. Phototransformation of propiconazole in aqueous media. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5377-5382.

Les **principaux résultats** de cette étude que nous pouvons mettre en évidence sont :

1. le charbon (en particulier le matériau AC2) est un excellent adsorbant pour complexer le propiconazole du fait de sa grande capacité d'adsorption et de sa cinétique rapide (l'équilibre est atteint au bout de 45 min à 25°C ; le temps d'équilibre est indépendant du type de charbon utilisé).
2. la chimie de surface du CA joue un rôle important : seuls le charbon brut non traité (UAC) et le charbon basique (AC2) possèdent d'excellentes propriétés d'adsorption vis-à-vis du propiconazole ; ce qui laisse supposer la présence de fortes interactions de type acide/base entre le contaminant acide et le charbon ; pour rappel, ces deux charbons ont une surface spécifique voisine, ce qui démontre que les caractéristiques à prendre en compte sont donc principalement la chimie de surface et dans une moindre mesure les caractéristiques texturales.
3. le charbon AC2 a une adsorption indépendante de la concentration : quelque soit la concentration utilisée, tout le contaminant présent en solution est adsorbé ; de plus, les données sur la capacité maximale et sur les cinétiques démontrent que le charbon AC2 est un adsorbant efficace à forte concentration (il est à la fois performant tout en ayant une cinétique rapide) ; pour les autres charbons, la quantité de propiconazole adsorbé dépend de sa concentration : plus la concentration augmente, moins le charbon adsorbe, et donc l'efficacité diminue ;
4. la température a également un rôle important. L'adsorption du propiconazole est favorisée lorsque la température augmente : cette augmentation favorise les échanges entre le charbon et le contaminant (augmentation de la mobilité moléculaire du système, et meilleure activation des sites de complexation du charbon) ;
5. la modélisation des données expérimentales cinétiques a permis de montrer que les mécanismes d'adsorption sont complexes ; en effet, différentes interactions ont été mises en évidence : d'une part de l'adsorption physique et de la diffusion dues essentiellement au charbon poreux, et d'autre part des interactions chimiques (interactions acide-base, liaisons hydrogène) dues à la chimie de surface des charbons.

En résumé, le propiconazole est rapidement et fortement adsorbé par le charbon basique, laissant notamment entrevoir diverses perspectives de développement telles que des

dispositifs prévenant du transfert de produits de préservation du bois entre le bac de traitement et le milieu aquatique environnant (voir Chapitre V).

Le tébuconazole, et dans une moindre mesure l'IPBC, ont des caractéristiques physico-chimiques assez proches du propiconazole (Chapitre I.4), laissant supposer des mécanismes d'adsorption similaires. Par ailleurs, Oudou et Hansen (2002) ont observé que les pyréthriinoïdes de synthèse (autres substances utilisées dans le traitement du bois) étaient très rapidement et fortement adsorbées par des particules solides (quartz, kaolinite...). Ainsi, de nombreux auteurs ont montré que les insecticides pyréthriinoïdes, et dans une moindre mesure les fongicides triazolés, sont fortement et durablement adsorbés aux particules sédimentaires (Rawn *et al.* 1982, Sundaram 1991, Haldfield *et al.* 1993, Wu *et al.* 2003, Kronvang *et al.* 2004, Bondarenko *et al.* 2006, Riise *et al.* 2006).

Cependant, l'extrapolation des résultats au milieu naturel est difficile à faire en raison de l'approche réductionniste utilisée et de la complexité des paramètres d'adsorption en milieu naturel (très faible concentration, dynamique variable, compartiment sédimentaire différent...). En effet, les données expérimentales de l'étude précédente ont été mesurées à pH 6,5 et à 25°C afin d'obtenir une solubilité du propiconazole qui soit compatible avec la méthode analytique spectrophotométrique utilisée dans le *batch*. De même, afin de mieux appréhender des mécanismes de physi- et de chimisorption, des matériaux carbonés standardisés ont été utilisés, ces derniers étant très différents de la diversité et de la complexité du matériau « sédiment » en milieu naturel.

Le chapitre suivant vise à estimer la contamination du compartiment sédimentaire par les produits de traitement du bois directement dans le milieu naturel, c'est-à-dire en prenant en compte l'ensemble des caractéristiques environnementales (approche holistique). Du fait de la limite de détection de la méthode spectrophotométrique précédemment utilisée (les valeurs de densité optique mesurées devenant trop faibles pour utiliser la loi de Beer-Lambert), une nouvelle méthode de dosage (décrite dans le chapitre suivant) a été développée.

II.2. Vers une évaluation de l'état de contamination du compartiment sédimentaire d'un cours d'eau par les produits de traitement du bois

L'objectif de cette partie est de déterminer le niveau de contamination du sédiment par les produits de traitement du bois (propiconazole, tébuconazole, IPBC ou 3-Iodo-2-propynyl-butyl carbamate, cyperméthrine, deltaméthrine) dans un milieu naturel. La méthode de dosage par spectrophotométrie précédemment utilisée n'étant pas compatible avec des concentrations en pesticides réalistes d'un point de vue environnemental, et ne permettant que le dosage de solutions aqueuses, une autre méthode a dû être utilisée. De plus, les pyréthriinoïdes de synthèse pouvant avoir un effet létal sur des amphipodes à seulement quelques ng.g^{-1} (Maund *et al.* 2002), la méthode analytique utilisée doit permettre de mesurer une contamination du sédiment à de très basses concentrations. A notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature scientifique de telle méthode validée pour l'ensemble des produits de traitement étudiés, la difficulté résidant notamment dans le fait que ces derniers sont caractérisés par une large gamme de polarité (Tab. I.3 à I.7). Par exemple, Yasin *et al.* (1995) font état d'une méthode de dosage de cinq pyréthriinoïdes de synthèse dans des matrices organiques (sol, mousse et poisson) avec des limites de détection comprises entre 0,5 et 5 ng.g^{-1} , mais le protocole proposé (non validé pour du sédiment) ne permet pas le dosage simultané des fongicides triazolés. Il a donc été nécessaire de développer une nouvelle méthode de dosage qui soit suffisamment précise pour doser quelques ppb de ces molécules organiques dans le sédiment.

Une première application de cette méthode a été réalisée sur des sédiments prélevés dans deux systèmes aquatiques, chacun d'entre eux étant situé à proximité d'une aire de traitement du bois. Ces aires de traitement emploient dans un cas de la perméthrine et du propiconazole, et dans l'autre cas de la cyperméthrine, du propiconazole, du tébuconazole et de l'IPBC. Les grumes stockées dans ces deux scieries sont susceptibles d'être occasionnellement traitées par de la deltaméthrine.

II.2.1. Développement d'une nouvelle méthode analytique en vue de la détermination de l'état de la contamination du compartiment sédimentaire par les produits de traitement du bois à de faibles concentrations

La méthode analytique développée vise à rechercher et à quantifier simultanément six matières actives dans un même échantillon de sédiment : les fongicides triazolés propiconazole et tébuconazole, le carbamate fongicide/bactéricide IPBC, et les insecticides pyréthrinoïdes de synthèse cyperméthrine, deltaméthrine et perméthrine. Cette méthode doit permettre la détection et la quantification de ces pesticides, de polarité très différentes, à de faibles concentrations. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le *Central Environmental Analytical Laboratory (CEAL)* de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL, Suisse).

Cette méthode analytique de quantification comporte les trois principales phases suivantes, chacune étant composée de plusieurs étapes :

a) une phase d'extraction

- extraction solide/liquide
- partition liquide-liquide

b) une phase de purification

- chromatographie par perméation de gel
- purification/chromatographie polaire
- purification/chromatographie polaire

c) une phase de détection

Le chapitre d) traite de l'évaluation des limites de détection, des rendements et de la validation de la méthode.

a) La phase d'extraction

L'objectif de cette phase d'extraction est d'extraire un maximum des six pesticides recherchés dans l'échantillon de sédiment. Cette phase est constituée de deux étapes :

- la première étape (Fig. II.7) est une extraction solide-liquide qui consiste à prendre un aliquote d'environ 20 g de masse fraîche de sédiment dans 30 mL de solvant et de mettre

l'ensemble dans un bain à ultrasons pendant 10 min ; l'ensemble est alors centrifugé à 3000 rpm pendant 5 min (l'objectif étant de récupérer les pesticides dans la solution).

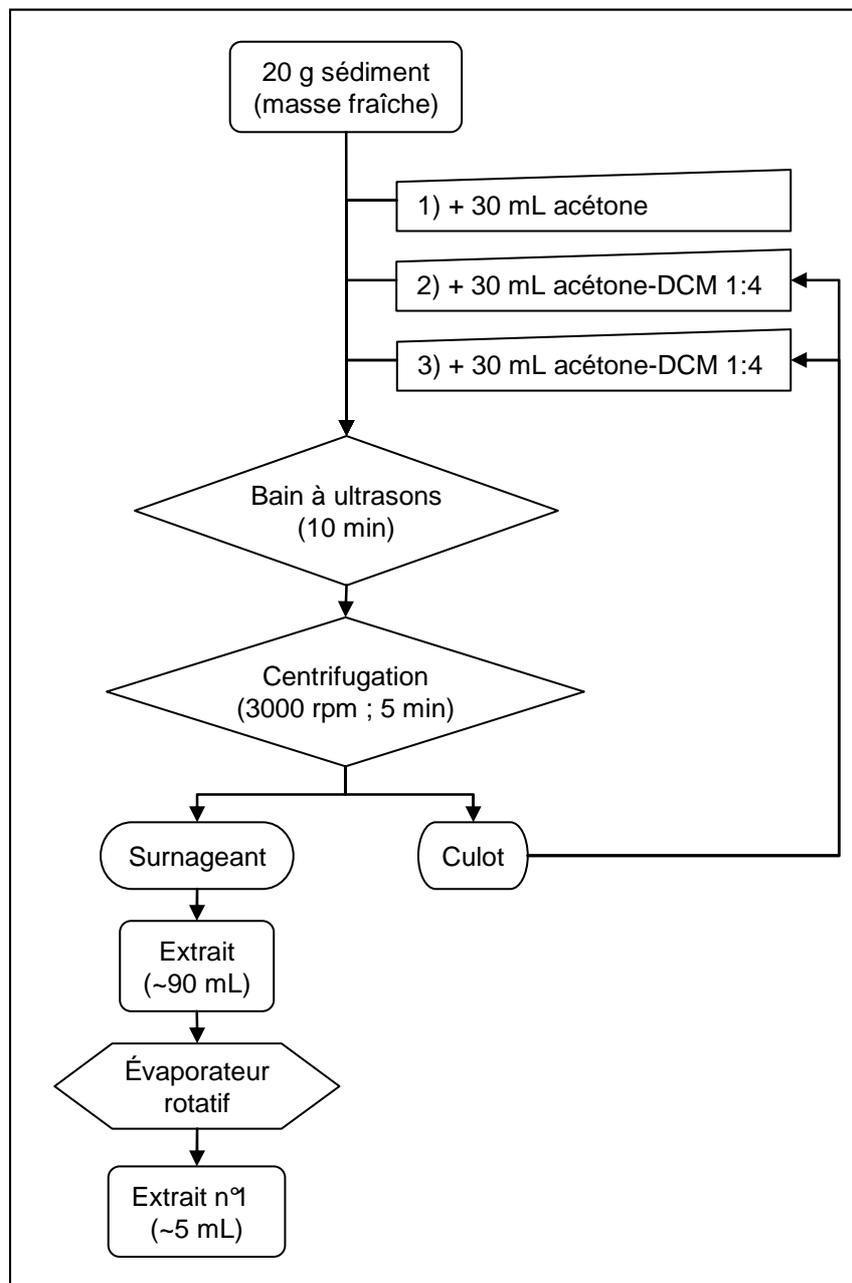


Figure II.7. Présentation schématique de la première étape d'extraction du sédiment.

L'opération est d'abord réalisée une fois avec de l'acétone, ce solvant étant miscible avec l'eau et les solvants organiques, il permettra d'extraire entre autres des substances présentes dans la phase aqueuse de l'échantillon tout en ne formant qu'une seule phase avec les solvants organiques utilisés par la suite. L'opération est ensuite répétée deux fois avec un mélange acétone-dichlorométhane (DCM) (mélange 1:4 v/v) afin d'extraire du sédiment d'autres substances (autre polarité, autre solubilité avec le solvant) ; les phases

liquides sont à chaque fois récupérée, et l'ensemble des extraits est alors partiellement évaporé afin de réduire la proportion d'acétone présente dans la solution comme indiquée dans la Figure 11.7 (l'idée étant de réduire la teneur en acétone afin de rendre la solution très peu miscible à l'eau).

- la seconde étape est une partition liquide-liquide qui vise à obtenir une solution organique exempte de traces d'eau (Fig. II.8).

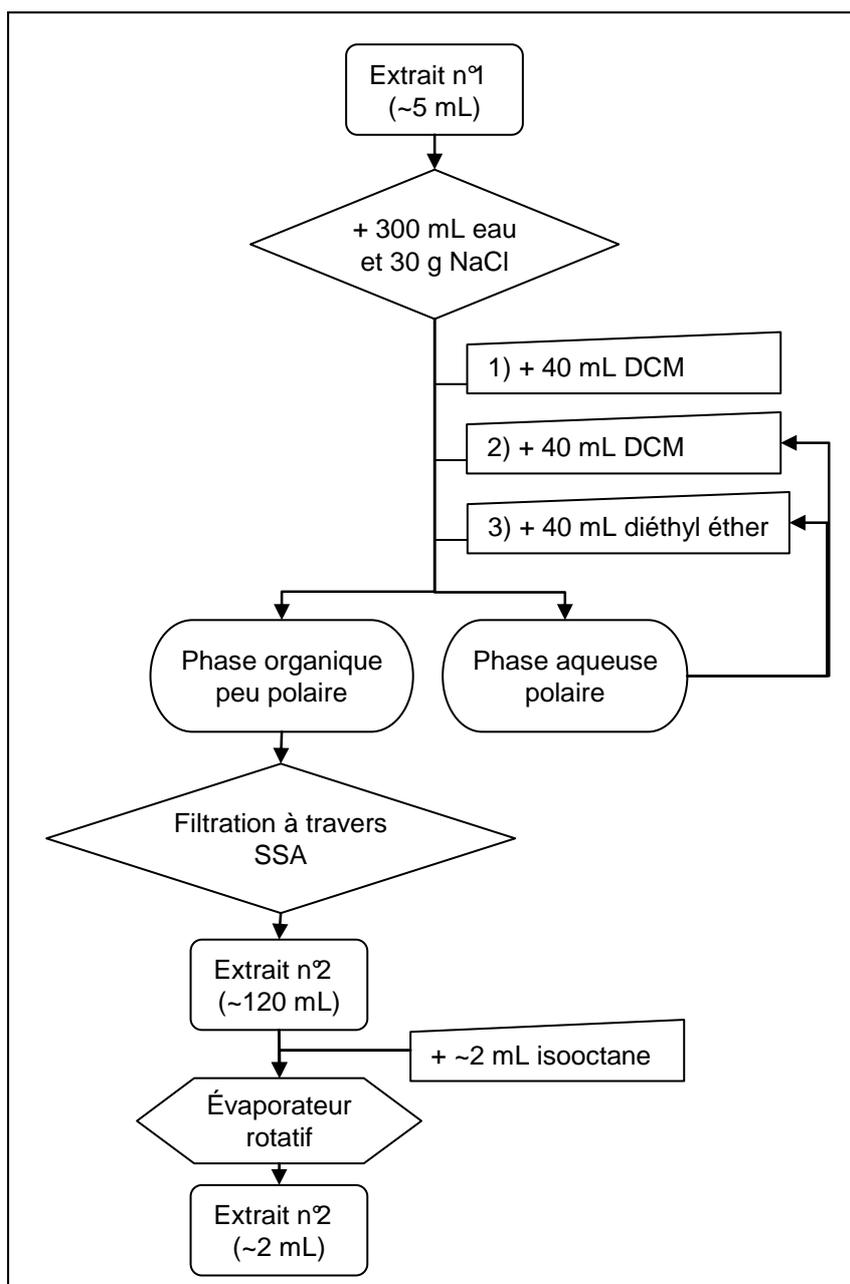


Figure II.8. Représentation schématique de la seconde étape d'extraction du sédiment (DCM : dichlorométhane ; SSA : sulfate de sodium anhydre).

La méthode consiste à dissoudre 30 g de chlorure de sodium dans 300 mL d'eau (le sel permet d'augmenter la force ionique et la densité de la phase aqueuse) ; à cette solution est ajoutée l'extrait issu de l'extraction par ultrasons ; on introduit ensuite 40 mL de DCM ; l'ensemble est d'abord agité manuellement pendant 3 min, puis est mis à décanter. Les substances qui étaient présentes dans l'extrait sont ainsi mises en contact à la fois avec une phase très polaire (eau salée et traces d'acétone) et une phase peu polaire (DCM et traces d'acétone) ; les pesticides recherchés étant de faible polarité (ou non polaires), elles sont ainsi transférés de la phase polaire vers la phase organique peu polaire. La phase organique est ensuite reprise après séchage sur un filtre de sulfate de sodium anhydre (SSA) afin d'en éliminer d'éventuelles traces d'humidité. Cette étape d'extraction est répétée une nouvelle fois avec 40 mL de DCM, puis une troisième fois avec 40 mL de diéthyléther. Après ajout de quelques millilitres de isooctane l'ensemble de ces trois extraits est concentré par évaporation (évaporateur rotatif) puis par une technique utilisant un flux d'azote pour obtenir un volume d'environ 2-3 mL (l'isooctane est un solvant moins volatil que l'acétone et le DCM, il va donc permettre d'éviter une évaporation à sec de la solution).

b) Phase de purification

La phase de purification vise à réduire le bruit de fond et l'effet de matrice que procurent les impuretés (substances autres que celles recherchées) lors de la phase de détection. Cette purification est réalisée en trois étapes (Fig. II.9) :

- l'extrait de l'échantillon est d'abord purifié d'une partie de ses impuretés (surtout celles présentes sous forme solide) par passage à travers un filtre Spartan 13 (diamètre 0,2 μm) ; une séparation stérique est ensuite réalisée grâce à une chromatographie par perméation de gel (*Gel Permeation Chromatography*, GPC) qui sépare les substances en fonction de leur taille ; pour ce faire, un mélange hexane-acétone (1:1 v/v) passe en permanence à raison de 5 mL.min⁻¹ à travers une colonne en verre (longueur 80 cm, diamètre 4,9 cm, Supelco Z21 775-1[®]) contenant 100 g de copolymère de styrène divinylbenzène (Bio-Beads S-X3[®]) ; l'extrait dans l'isooctane (parfaitement miscible à la phase mobile) est injecté : la fraction sortant entre 25 min et 65 min est récupérée (des investigations préliminaires ayant permis de déterminer que les pesticides recherchés sortaient de la colonne durant ce laps de temps) ; cette fraction de 200 mL (qui correspond au passage de solution pendant les 40 min) est évaporée à sec par un évaporateur rotatif puis par un flux d'azote ; elle est

ensuite diluée dans 500 μL d'hexane. Le protocole expérimental de cette étape de purification est schématisé par la Figure II.9.

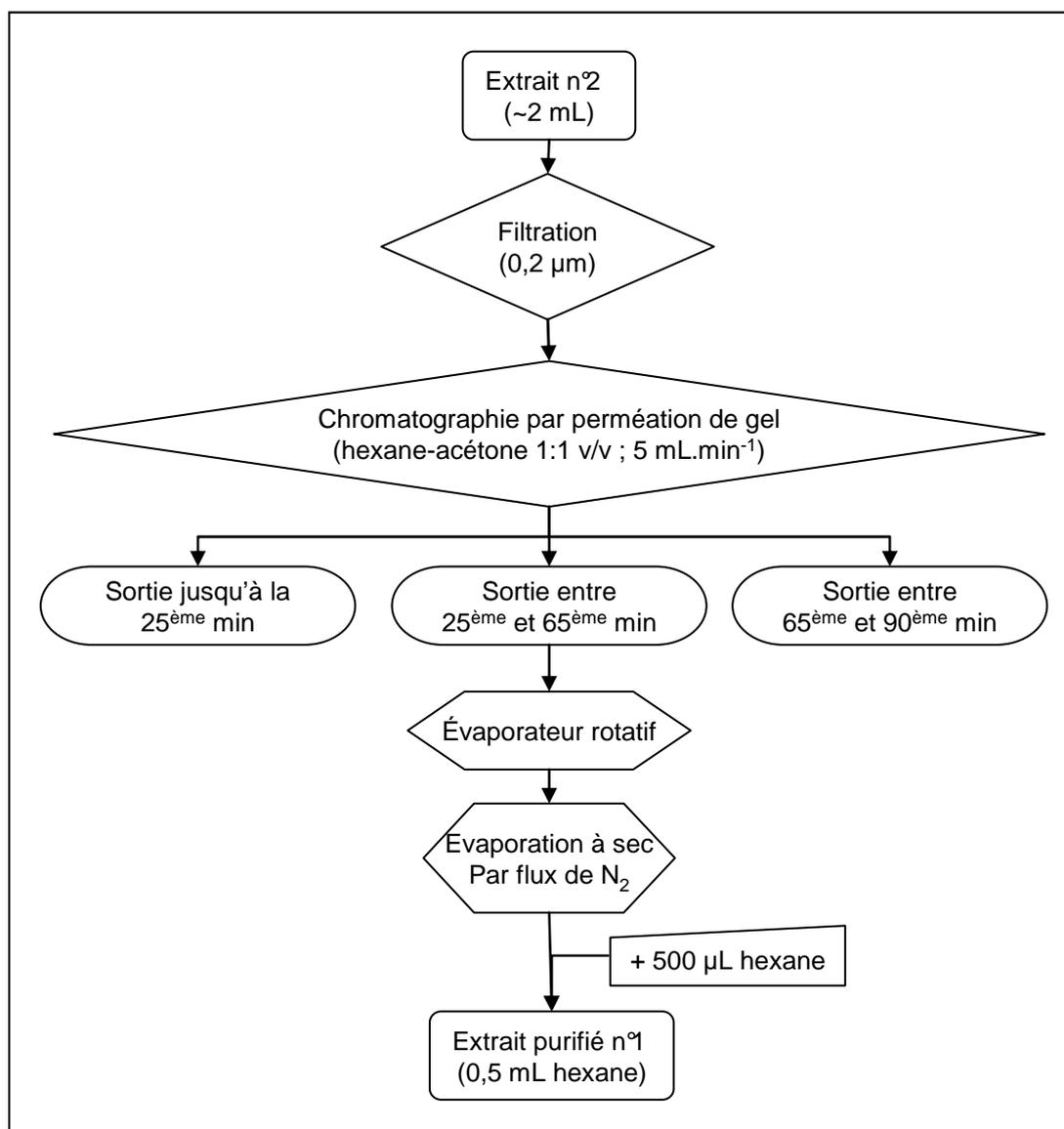


Figure II.9. Représentation schématique de la première étape de purification.

- la seconde étape de la purification (Fig. II.10) est obtenue par une chromatographie séparant les molécules en fonction de leur polarité via le passage d'une succession de solvants (du moins polaire au plus polaire) à travers une colonne de 10 g de Florisil (silicate de magnésium, 100-200 *mesh*, colonne activée à 650°C pendant 3h puis désactivée à 2% par de l'eau). Avant injection de l'échantillon, la colonne est mise à baigner dans de l'hexane et est recouverte par une couche de SSA (environ 1 cm) ; le premier solvant injecté est l'hexane (20 mL) : cette première fraction éluee ne contenant que des impuretés n'est pas récupérée ; la seconde fraction obtenue par le passage de 40

mL de hexane-éther (3:1 v/v) contient les pyréthriinoïdes perméthrine, cyperméthrine et deltaméthrine ; le troisième passage (40 mL d'hexane-éther 1:1 v/v) permet la récupération de l'IPBC ; on injecte ensuite 100 mL de DCM (quatrième fraction) pour éliminer d'autres impuretés ; finalement la cinquième fraction obtenue par passage de 100 mL d'acétate d'éthyle permet de récupérer le propiconazole et le tébuconazole.

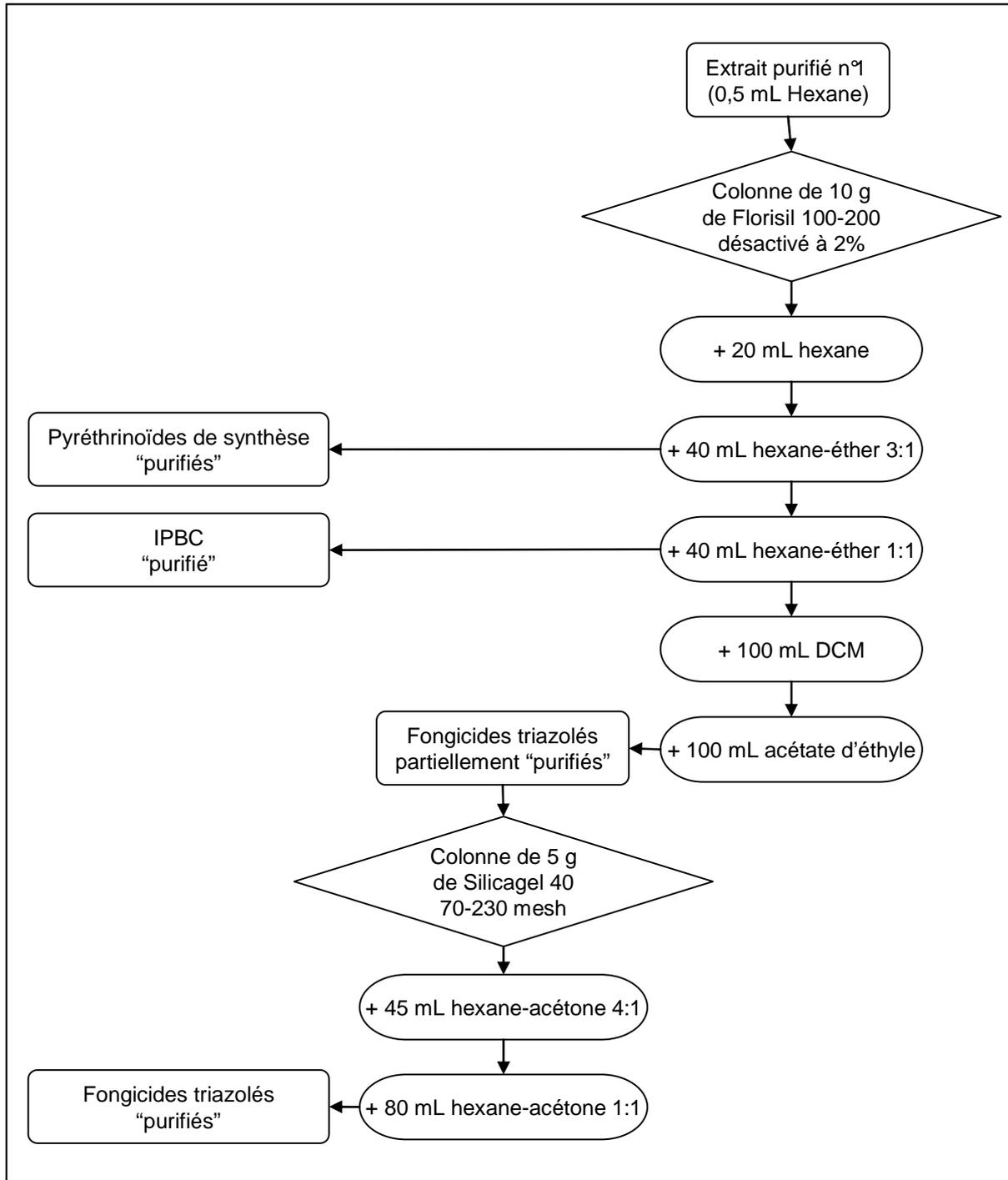


Figure II.10. Représentation schématique de la deuxième et troisième étape de purification (DCM : dichlorométhane).

- la dernière fraction contenant encore de nombreux résidus d'extraction, elle nécessite une étape de purification supplémentaire (Fig. II.10) ; cette troisième étape ne concerne donc que les fongicides triazolés. Cette fraction est éluée à travers une colonne contenant 5 g de silicagel (SG40[®] 70-230 mesh) ; la première fraction obtenue par injection de 45 mL d'hexane-acétone (4:1 v/v) permet d'éliminer une partie des impuretés ; et les fongicides sont ensuite récupérés par passage de 80 ml d'hexane-acétone (1:1 v/v).

c) Phase de détection

La dernière étape du protocole analytique consiste d'une part à détecter les substances recherchées, et d'autre part à les quantifier. Les solutions obtenues après purification sont évaporées à sec par un flux d'azote, puis diluées dans le solvant utilisé lors de l'injection dans les appareils de détection. Différents types de détection sont appliqués selon les molécules recherchées (Fig. II.11) : chromatographie en phase gazeuse équipée d'un détecteur par capture d'électron (CG-DCE), chromatographie en phase gazeuse équipée d'un détecteur par spectrométrie de masse (CG-DSM), et chromatographie liquide à haute performance équipée d'un détecteur à barrette de diodes (CLHP-DBD).

Les fongicides triazolés sont dilués dans du méthanol (0,2 mL) pour être injectés dans une chaîne de CLHP (Hewlett Packard 1050[®], Agilent technology, Urdorf, Suisse) équipée avec une colonne analytique (Vydac 201TP54 C18[®], 250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm, 90 Å) et d'une pré-colonne de protection (Cartouche PelliguardTM LC-18 Supelco[®]). L'IPBC est dilué dans l'isooctane (0,3 mL), auquel est ajouté une concentration connue de standard interne (0,2 mL de PCB77 marqué au C13). Une CG est réalisée sur ce mélange (CG Hewlett Packard HP 5890[®], équipée d'un détecteur à SM (Hewlett Packard 5971A[®]), cette CG étant équipée d'une colonne DB-5MS[®] (50 m x 0,2 mm x 0.33 µm). Les insecticides pyréthrinoïdes de synthèse sont dilués dans de l'isooctane et les solutions sont injectées en CG (CG Hewlett Packard 6890 Series[®]) équipée par une colonne analytique DB-5[®] (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm). La Figure II.11 décrit les solvants, les types d'appareils chromatographiques, les types de détecteurs et les colonnes utilisés pour chacun des trois types de substances recherchées.

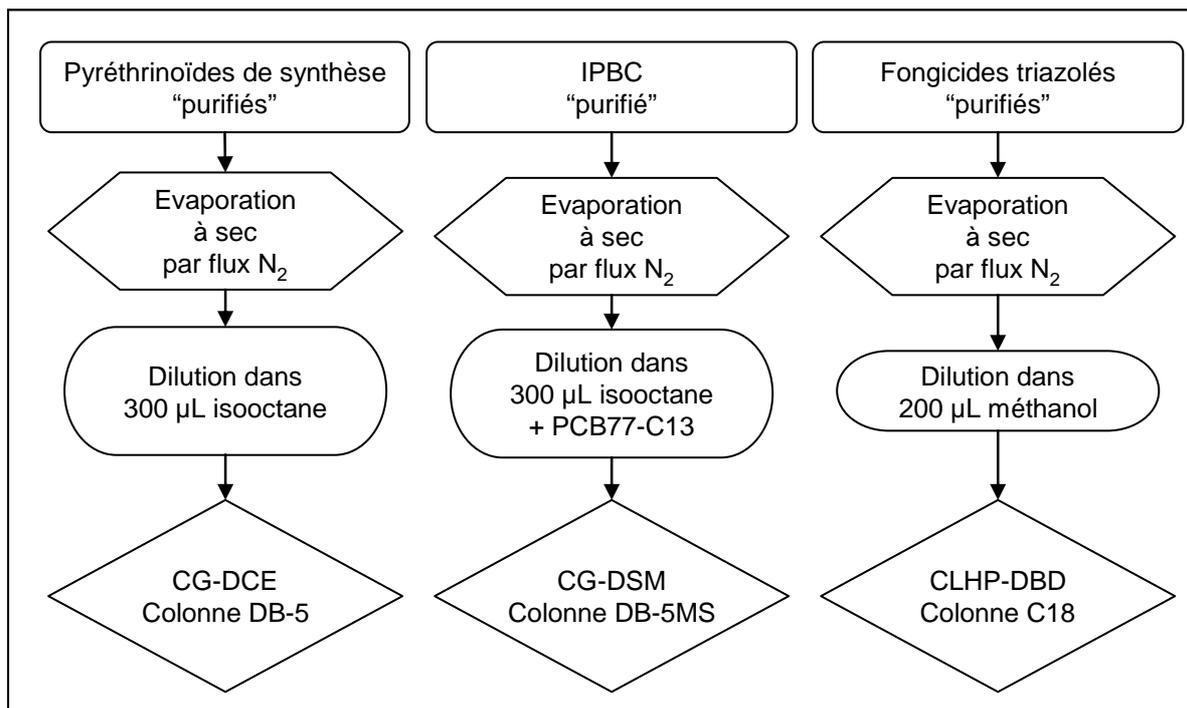


Figure II.11. Représentation schématique des trois types de détection (CG-DCE : chromatographe en phase gazeuse équipé d'un détecteur par capture d'électron ; CG-SM : chromatographe en phase gazeuse équipé d'un détecteur par spectrométrie de masse ; CLHP-DBD : chromatographe liquide à haute performance équipé d'un détecteur à barrette de diodes).

d) Limites de détection, rendements et validation de la méthode analytique

Une fois le protocole mis en place, les rendements puis les limites de détection de la méthode ont été évalués. Les rendements ont été évalués pour chacune des substances recherchées. Pour cela, un échantillon de sédiment homogénéisé est sub-divisé en cinq sous-échantillons de masse égale ; les concentrations en pesticides ont été mesurées dans un de ces échantillons ; une concentration connue des six pesticides a été ensuite ajoutée aux quatre autres (concentration massique équivalente à environ 100% de celle mesurée dans le premier sous-échantillon). Les mesures d'IPBC sur CG-DSM ont été vérifiées grâce au dopage par le standard interne (PCB77-C13). Le rendement de la méthode pour une substance donnée correspond à sa concentration moyenne dans les quatre sous-échantillons dopés rapportée à sa concentration théorique. La variabilité de la mesure d'une substance est évaluée par le coefficient de variation standard (*Relative Standard Deviation* ou RSD) : il s'agit de l'écart-type entre les quatre concentrations déterminées rapporté à la valeur moyenne de la contamination.

Ces rendements sont de $70,8 \pm 7,4 \%$; $92,8 \pm 12,4 \%$; et $84,0 \pm 24,0 \%$ pour respectivement la cyperméthrine, la perméthrine et le tébuconazole. Lors des premiers essais réalisés, les

niveaux de contamination de l'échantillon de départ étant trop faibles pour la deltaméthrine, le propiconazole et l'IPBC, les concentrations étaient en deçà des limites de détection de la méthode mise au point, et leurs quantifications n'ont pu être réalisées avec précision. Les dosages ultérieurs devront donc faire intervenir des concentrations de standard deux à trois fois plus élevées afin de quantifier précisément le rendement de la méthode pour ces molécules. La méthode ainsi développée permet de détecter des concentrations relativement faibles de pesticides dans le sédiment, c'est-à-dire de quelques dixièmes de ppb à quelques ppb (Tableau II.2). Les limites de détection ont été calculées en multipliant par trois le bruit de fond obtenu lors de la détection de chacun des pesticides recherchés. Sous ce seuil de détection, la substance ne peut être identifiée avec certitude et sera alors considérée comme « non détecté » (ND). Les limites de quantification ont été calculées en multipliant par dix le bruit de fond. Si un des pesticides est détecté, c'est-à-dire au-dessus de la limite de détection, mais en dessous de la limite permettant sa quantification, alors il sera considéré à l'état de « traces ».

Type d'appareil (colonne)	CG-DCE (DB5)	CG-DSM (DB5MS)	CLHP-DBD (C18)
Cyperméthrine	0,33 ng.g ⁻¹		
Deltaméthrine	0,72 ng.g ⁻¹		
Perméthrine	0,27 ng.g ⁻¹		
IPBC		0,64 ng.g ⁻¹	
Propiconazole			3,25 ng.g ⁻¹
Tébuconazole			2,70 ng.g ⁻¹

Tableau II.2. Limites de détection (ng.g⁻¹) obtenues pour chacune des 6 substances étudiées. Les colonnes indiquent le type d'appareil et de détecteur utilisés pour la quantification : la colonne utilisée est indiquée entre parenthèses.

Grâce à la méthode qui a été développée au cours du présent travail, il est possible de rechercher et de quantifier simultanément, à partir d'un seul échantillon de sédiment, et à de faibles concentrations, les pesticides cyperméthrine, deltaméthrine, perméthrine, IPBC, propiconazole et tébuconazole. Par conséquent, en utilisant cette méthode, une évaluation de l'état de contamination du compartiment sédimentaire par ces substances peut être effectuée à des concentrations pertinentes du point de vue de l'impact environnemental de ces contaminants.

II.2.2. Premières applications concrètes à l'étude de la contamination à proximité d'une aire de traitement du bois

L'application de la méthode de dosage précédemment décrite à des sédiments prélevés à proximité d'une aire de traitement du bois vise à :

- vérifier qu'au moins une partie des produits de préservation du bois sont transférés vers le milieu aquatique environnant au moment des prélèvements,
- estimer le niveau de contamination du compartiment sédimentaire,
- évaluer l'évolution spatiale de cette contamination entre deux sites situés à l'aval des installations de traitement,
- observer l'évolution temporelle de cette contamination entre plusieurs dates d'échantillonnage,
- évaluer la variabilité de la contamination du sédiment à une échelle locale, en particulier selon le pesticide considéré.

a) Méthode

Des échantillons de sédiment ont été prélevés dans le ruisseau de la Drésine à proximité d'une aire de traitement du bois où est utilisée une solution commerciale composée de matières actives cyperméthrine, IPBC, propiconazole et tébuconazole. Les prélèvements de sédiment ont été réalisés dans trois sites et lors de trois campagnes :

- à l'amont immédiat de la scierie (site 1, N46°45'11,0'' – E006°12'54,5),
- à l'aval proche de cette aire (environ 400 m, site 2, N46°45'20,6'' – E006°13'16,1),
- et à l'aval lointain (environ 2 km, site 3, N46°45'40,4'' – E006°13'45,0'').

Lors des deux premières campagnes d'échantillonnage (29 juin et 25 juillet 2006), 4, 8 et 8 prélèvements de sédiment ont été réalisés dans les sites 1, 2 et 3 respectivement ; et 3 répliqués ont été réalisés dans chacun de ces sites lors de la troisième campagne (11 octobre 2006).

Les dates de prélèvements ont été choisies après des épisodes pendant lesquels les régimes pluviométriques et hydrauliques étaient contrastés. Les premiers prélèvements (29 juin 2006) ont eu lieu 4 jours après un épisode orageux isolé ; les seconds prélèvements (25 juillet 2006) en période d'étiage ; et la troisième série de prélèvements (11 octobre 2006) lors des pluies automnales (Fig. II.12). Les échantillons de sédiment ont été analysés en suivant la méthode décrite dans le chapitre précédent.

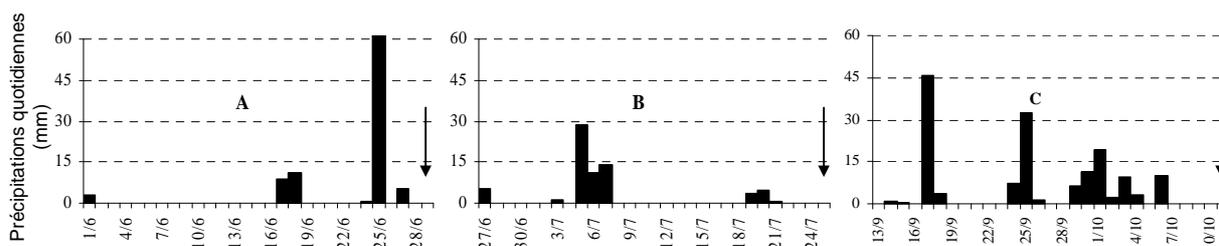


Figure II.12. Précipitations quotidiennes (mm) durant les quatre semaines précédant les trois campagnes d'échantillonnage : le 29 juin (A), le 25 juillet (B) et le 11 octobre 2006 (C). Les flèches indiquent les jours de prélèvement.

b) Niveaux de contamination

La Figure II.13 représente l'état de contamination sédimentaire de la Drésine par les produits de préservation du bois. Les analyses et les résultats obtenus n'ont pas permis de détecter de traces ni d'IPBC (présent dans le bac de traitement) ni de deltaméthrine (susceptible d'être occasionnellement utilisé au niveau de l'aire de stockage des grumes de la scierie) dans les sédiments. Les échantillons prélevés en amont de la scierie étaient exempts de produits de traitement du bois (à des concentrations supérieures à leurs seuils de détection respectifs), excepté un échantillon contenant du propiconazole lors de la première campagne d'échantillonnage (Fig. II.13A). Ce fongicide étant très utilisé hors traitement du bois (voir chapitre I.4.3), il peut provenir des activités anthropiques localisées à l'amont de la scierie. Les sédiments prélevés en aval de l'aire de traitement sont, en revanche, contaminés par de la cyperméthrine, du propiconazole et du tébuconazole à des concentrations atteignant un maximum de $22,5 \text{ ng.g}^{-1}$, $38,3 \text{ ng.g}^{-1}$ et $10,5 \text{ ng.g}^{-1}$ respectivement, dans certains échantillons prélevés au niveau du site 2 lors de la troisième campagne d'échantillonnage. Néanmoins, environ 82 % des analyses où la présence de pesticides est avérée ont révélé des concentrations inférieures à 10 ppb, confirmant que le développement de la méthode analytique avec des seuils de détection de l'ordre du ppb était nécessaire à la pertinence d'une telle étude (Fig. II.13).

De plus, les concentrations moyennes indiquent une forte contamination du site 2 (aval immédiat de l'aire de traitement). Le site 3 (qui se trouve à environ 2 km à l'aval de la scierie) est aussi contaminé, mais à des concentrations moins élevées qu'au niveau du site 2, à l'exception notable du propiconazole lors de la seconde campagne d'échantillonnage. L'aire de traitement du bois contamine donc le cours d'eau voisin jusqu'à au moins 2 km vers l'aval. Enfin, on observe que le ratio en fongicides triazolés parmi les trois matières actives détectées

augmente entre le site 2 et le site 3 dans chacune des trois campagnes d'échantillonnage (Figures II.13 A, B et C).

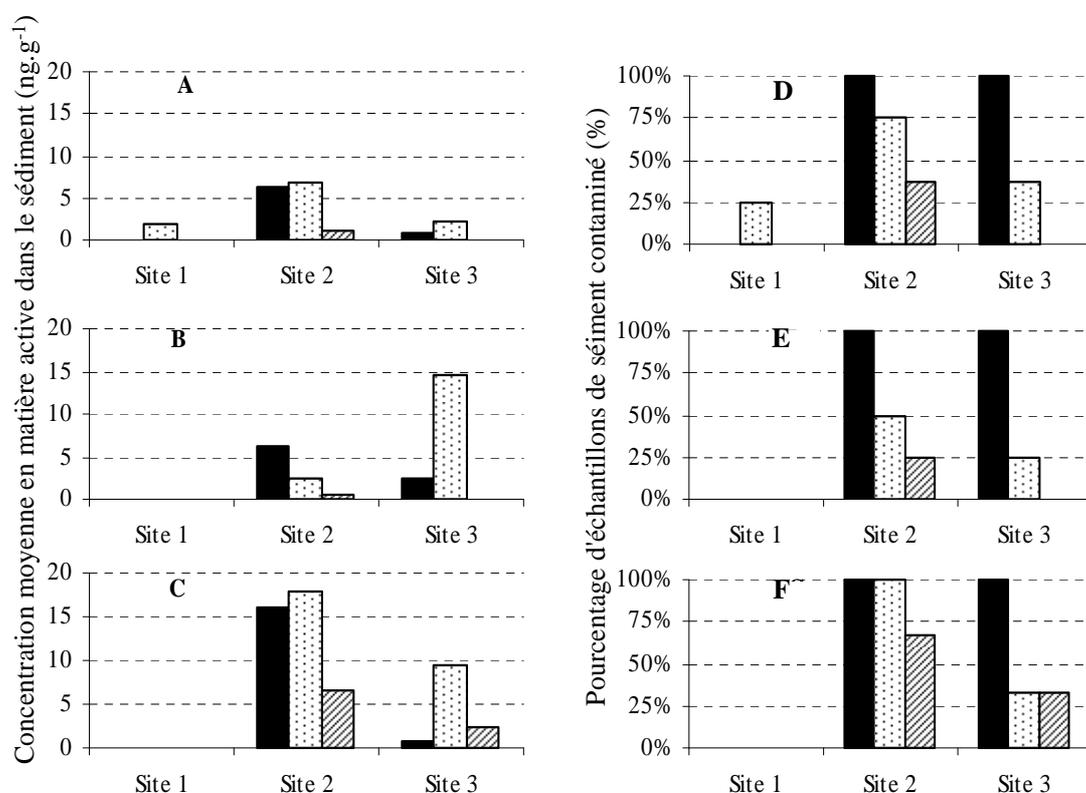


Figure II.13. Etat de contamination sédimentaire de la Drésine par les produits de préservation du bois cyperméthrine (noir), propiconazole (pointillé) et tébuconazole (hachuré) à l'amont immédiat de l'aire de traitement du bois (site 1), à l'aval proche (400 m, site 2) et l'aval lointain (2000 m, site 3) lors des trois campagnes d'échantillonnage réalisées le 29 juin 2006 (A, D), le 25 juillet 2006 (B, E) et le 11 octobre 2006 (C,F). Les niveaux de contamination moyens (ng.g⁻¹) sont indiqués sur les graphiques A, B et C. Les pourcentages d'échantillons de sédiment dans lesquels au moins une contamination par l'un des pesticides recherchés a été détectée (%) sont indiqués sur les graphiques D, E et F.

c) Variabilité de la contamination au sein d'une station de prélèvement

La variation du pourcentage d'échantillons contaminés, c'est-à-dire ceux ayant révélé la présence de pesticides, montre une hétérogénéité de contamination très différente selon le pesticide considéré. En effet, alors que la cyperméthrine est présente dans tous les échantillons prélevés à l'aval de la scierie, les fongicides triazolés ne sont détectés que dans une partie des échantillons prélevés (Figures II.13 D, E et F). En particulier, au sein du site 3 lors des deuxième et troisième campagnes de prélèvements, 3 échantillons se sont révélés fortement contaminés par le propiconazole (21,4 ng.g⁻¹, 28,4 ng.g⁻¹ et 96,2 ng.g⁻¹) alors que les 8 autres échantillons n'ont pas permis de détecter de traces de ce fongicide. Ainsi, alors que la contamination par la cyperméthrine apparaît relativement uniforme au sein des

sédiments du cours d'eau, les fongicides triazolés semblent contaminer les sédiments de manière plus hétérogène.

Ces pesticides étant recherchés simultanément à partir des mêmes échantillons (c'est-à-dire sur les mêmes matériaux adsorbants), les différences de distribution spatiale observées entre ces deux familles de molécules sont vraisemblablement liées à leurs caractéristiques physico-chimiques respectives. En effet, les substances peu hydrosolubles et ayant un coefficient d'adsorption élevé comme les pyréthriinoïdes de synthèse sont transportées essentiellement par le biais des flux de particules en suspension (Liu *et al.* 2005, Gan *et al.* 2005). Ces particules une fois sédimentées constituant les zones prélevées, la contamination du compartiment sédimentaire par les pyréthriinoïdes de synthèse paraît ainsi uniforme.

En revanche, les fongicides triazolés, moins fortement adsorbés sur les particules solides et montrant une plus grande affinité pour l'eau que les pyréthriinoïdes, sont susceptibles d'être en partie transportés par la phase aqueuse avant d'être adsorbés par les particules en suspension ou le sédiment (Neumann *et al.* 2002, Wu *et al.* 2003, Kronvang *et al.* 2004). En outre, l'étude précédente sur l'adsorption du propiconazole a démontré qu'un temps de contact de 45 min était suffisant sous certaines conditions pour atteindre l'équilibre d'adsorption avec du charbon actif. L'accumulation des fongicides triazolés serait ainsi favorisée dans des zones où ils sont plus longtemps mis en contact avec les particules potentiellement adsorbantes, par exemple dans les zones de turbulence ou de contre-courant. La variabilité des contaminations mesurées pour ces fongicides pourrait être liée à ces deux phénomènes.

d) Variations de la contamination en fonction du temps

La présence de pesticides au niveau des deux sites aval lors des trois campagnes d'échantillonnage indique que la contamination du cours d'eau par les produits de traitement du bois est récurrente (Fig. II.13). Ce phénomène est vraisemblablement lié à la lente dégradation de ces pesticides une fois adsorbés dans le milieu, particulièrement pour les fongicides triazolés qui ont des demi-vies de dégradation supérieures à un an (voir chapitre I.4.1). La Figure II.13 montre également que le niveau moyen de contamination du sédiment ainsi que la fréquence de détection des pesticides dans les échantillons augmentent entre la deuxième et la troisième campagne d'échantillonnage. La récurrence de la contamination s'explique donc aussi par des apports en pesticides, ces derniers ayant vraisemblablement lieu

plutôt lors d'épisodes pluvieux successifs (Fig. II.12A et II.13A) que lors d'un évènement orageux isolé (Fig. II.12C et II.13C).

L'étiage n'est pas particulièrement propice à une augmentation de la concentration en pesticide dans le sédiment (Fig. II.12B et II.13B). Ce phénomène tend à confirmer que les produits de traitement du bois contaminant le système aquatique sont essentiellement présents sous forme adsorbée dans le compartiment sédimentaire : les fluctuations du niveau d'eau n'ayant pas d'influence significative sur les concentrations sédimentaires, les quantités dissoutes apparaissent comme négligeables en comparaison des quantités adsorbées.

e) Conclusions

Une contamination du milieu aquatique par des produits de préservation du bois (cyperméthrine, propiconazole, tébuconazole) a été mise en évidence depuis l'aire de traitement et sur au moins deux kilomètres à l'aval de ces installations. Les concentrations moyennes de ces substances dans le sédiment sont relativement faibles (généralement inférieures à 10 ppb), une hétérogénéité de ce niveau de contamination ayant été observée à une échelle locale, en particulier pour les deux fongicides triazolés. Cette contamination apparaît récurrente malgré les légères variations de concentrations mesurées entre les campagnes d'échantillonnage. Ce phénomène est vraisemblablement lié à des apports en pesticides depuis l'aire de traitement, en particulier lors d'épisodes pluvieux répétés, et à une relative rémanence de ces substances une fois adsorbées par le sédiment.

Conclusions de l'approche chimique

Dans le cadre de l'étude *batch* de l'adsorption du propiconazole sur des charbons actifs, nous avons montré que cette substance organique utilisée dans le traitement du bois présente à la fois une forte capacité d'adsorption et une cinétique rapide. Quelque soit la concentration utilisée, l'adsorbant est efficace. De futurs développements pourraient permettre de s'orienter vers l'élaboration de dispositifs adsorbants destinés à limiter les transferts de produits de préservation du bois depuis les installations de traitement vers le milieu aquatique environnant.

Le sédiment constituant la principale matrice adsorbante en milieu naturel, une nouvelle méthode analytique a été développée afin de doser les produits de traitement du bois adsorbés sur cette matrice. Les limites de détections de cette méthode varient entre 0,3 et 3,3 ng.g⁻¹, permettant la quantification de ces substances à de faibles concentrations. Une première application a été réalisée sur le compartiment sédimentaire d'un système aquatique situé à proximité d'installations de traitement. La pertinence des seuils de détections à basses concentrations a été confirmée par le fait que la plupart des échantillons de sédiment prélevés en aval de l'aire de traitement étaient contaminés par des teneurs inférieures à 10 ng.g⁻¹. De plus, nous avons montré que la contamination du ruisseau par l'aire de traitement, qui satisfait aux normes réglementaires, est récurrente et avérée sur plusieurs kilomètres. Les communautés aquatiques sont donc susceptibles d'être exposées de façon chronique aux produits de préservation du bois, y compris les organismes vivant plusieurs kilomètres en aval de l'aire de traitement.

Un effet létal (CL50_{10j}) ayant été rapporté chez l'amphipode *H. azteca* après exposition à du sédiment contaminé par 3,6 ng.g⁻¹ de cyperméthrine (Maund *et al.* 2002), il est fort probable que la contamination mesurée dans ce ruisseau altère de façon significative la physiologie, voire les chances de survie, des amphipodes *G. pulex* et de *G. fossarum*. Néanmoins, la biodisponibilité des contaminants est généralement beaucoup plus forte lorsque ces derniers sont présents sous forme dissoute que sous forme adsorbée (Burgess *et al.* 2005, Yang *et al.* 2006a et 2006b). Le volet hydro-écologique de la présente thèse s'attache à qualifier et à quantifier l'impact de ces contaminations des milieux aquatiques par les produits de préservation du bois sur des populations de *G. pulex* et de *G. fossarum*.

Troisième Partie

Approche hydro-écologique

III.1. Variations saisonnières et influence de la distance sur l'impact d'une aire de traitement du bois sur *Gammarus pulex*

- *Disturbance of a Gammarus pulex (L.) population by a pesticide contamination: spatial and temporal variation of alterations*, article en préparation.

III.2. Vers le développement d'une méthode de bioindication

- *Field effect of a pesticide mixture on a Gammarus fossarum (Crustacea, Amphipoda) population*, article en préparation.
- Etude complémentaire : altération par une aire de traitement du bois de l'ensemble de la communauté macrobenthique et de *Elmis aenea* (Insecta, Coleoptera) en particulier.

Approche hydro-écologique

L'approche chimique a montré qu'une aire de traitement du bois répondant aux normes réglementaires est tout de même susceptible de contaminer le milieu aquatique environnant, notamment le compartiment sédimentaire, par les pesticides utilisés pour la préservation du bois, et cela de façon récurrente. Or, la contamination de ce compartiment constitue très vraisemblablement une voie d'exposition de *Gammarus pulex* et *Gammarus fossarum* à ces substances, comme montré pour *Hyalella azteca*, une autre espèce d'amphipode épibenthique (Maund *et al.* 2002). *G. pulex* et *G. fossarum* ayant un fort rôle structurel et fonctionnel dans de nombreux écosystèmes aquatiques (chapitre I.6), une altération de leurs populations par des produits de préservation du bois est donc susceptible de modifier la structure et le fonctionnement de l'écosystème aquatique. L'observation des réponses *in natura* de ces crustacés (approche écotoxicologique holistique selon Ramade 2007), et de l'amplitude de celles-ci, contribuera ainsi à documenter leur vulnérabilité ainsi que les processus conduisant à l'altération de leurs populations, et, par conséquent, à contribuer au développement d'une méthode bioindicatrice utilisant ces taxons.

La présente approche hydro-écologique vise, dans un premier temps, à établir et à quantifier l'impact dans le temps et dans l'espace d'une aire de traitement du bois sur une population de *G. pulex*. Dans un second temps, des informations complémentaires ont été recueillies par des approches actives et passives quant à l'impact d'une autre aire de traitement sur une population de *G. fossarum*. Enfin, les altérations engendrées sur la communauté macrobenthique en général, et sur le coléoptère *Elmis aenea* en particulier, ont été documentées, afin d'évaluer la pertinence d'utilisation de ces amphipodes comme bioindicateurs, ainsi que les possibilités de co-indication avec d'autres organismes.

III.1. Variations saisonnières et influence de la distance sur l'impact d'une aire de traitement du bois sur *Gammarus pulex*

a) Introduction

Plusieurs études ont rapporté une altération de populations de *G. pulex* suite à une contamination de leur milieu par des substances toxiques (Muirhead-Thomson 1978, Maund *et al.* 1992, Veerasingham et Crane 1992, Schulz et Liess 1999b et 2001a, Heckmann et Friberg 2005, Lauridsen et Friberg 2005, De Lange *et al.* 2006). Néanmoins, les mécanismes de ces altérations demeurent peu documentés, et en dépit de l'importance écologique de *G. pulex* (chapitre I.6), les conséquences d'une contamination par des pesticides sur les populations de cet organisme demeurent relativement mal connues. Ainsi, alors que *G. pulex* est parfois considéré comme étant susceptible d'être fortement et durablement vulnérable (Kreutzweiser et Kingsbury 1987 ; Wallace *et al.* 1989 ; Defoe et Ankley 2003 ; Friberg *et al.* 2003), ce crustacé est d'autres fois considéré comme n'étant que faiblement et temporairement perturbé et donc comme ne figurant pas parmi les espèces à risque (Crossland *et al.* 1982 ; Heckmann et Friberg 2005 ; Neumann *et al.* 2003b ; Berenzen *et al.* 2005b ; Liess et Ohe 2005). Ainsi, la sensibilité de réponse de cette espèce aux contaminations de leur environnement est encore un sujet qui ne fait pas consensus.

L'étude entreprise s'est attachée à l'analyse des variations spatiales et temporelles des structures d'une population de *G. pulex* soumise, dans son environnement naturel, à l'influence d'une aire de traitement du bois. Pour atteindre cet objectif, l'évolution des densités, du *sex ratio*, du taux de femelles gravides, et de la composition en classe de taille de la population ont été suivis mensuellement durant une année entière en amont et sur plusieurs sites en aval de l'aire de traitement. Ainsi, les conséquences sur le cycle de vie de *G. pulex* et l'évolution spatiale et temporelle de l'impact de l'aire de traitement du bois ont été observées.

b) Etude

Les auteurs de l'article suivant (en préparation) sont Olivier Adam, Stéphanie Denis, François Degiorgi, Grégorio Crini, Pierre-Marie Badot

Disturbance of a *Gammarus pulex* (L.) population by a pesticide contamination: spatial and temporal variation of alterations

Abstract

Alteration of biota by pesticide contaminations remains poorly documented in the field. The present study investigated the recurrence and the distance of impact in the freshwater crustacean *Gammarus pulex* (L.) caused by a wood treatment area using pyrethroid insecticides and triazole fungicides. Abundance and population traits were monthly assessed throughout a year in an upstream and in three downstream sites. The most obvious impact was a severe and constant decrease of abundances of all developmental stages in the treatment area downstream. Adult densities were particularly reduced in the most impacted sites, and juvenile recovery remained very slight even two kilometres downstream the pesticide source. These disturbances of population structure were likely to alter the life cycle of the population. Thus, the pesticide contamination caused long-lasting direct and indirect impairment of *Gammarus pulex* population despite its high recovery potency. Density reductions were positively correlated with water temperature and population alteration was observed all over the year except in February. Therefore, ecological consequences of a pesticide contamination being widely unpredictable, the present study has shown that a relevant risk assessment must take into account field investigation integrating spatial and temporal variations of disturbances.

Keywords: *Gammarus pulex*, pesticide, impact, field, population, wood preservatives

1. Introduction

Gammarus pulex L. (Crustacea, Amphipoda) is among the most widespread invertebrates in European streams (Welton 1979). It can be found in high densities in many streams, lakes, ponds, ditches, channels, and underground waters (Hynes 1955, Janetzki 1994). Therefore it constitutes a major component of the biomass from numerous aquatic ecosystems (Welton 1979). As a detritus feeder, *G. pulex* plays a high functional role in nutrient cycling in freshwater systems (Welton 1979; Rawer-Jost 2000). As predator of other invertebrate species, it has a high structuring role in many aquatic communities composition (McNeil et al.

1997, Kelly et al. 2002). Furthermore, *G. pulex* is among the most eaten prey items for many fish species (Maitland 1966; Bollache et al. 2006). Therefore, *G. pulex* has a key ecological role in many aquatic ecosystems (Welton 1979; McNeil et al 1997).

Like other aquatic organisms, *G. pulex* are exposed to a large range of contaminants in their natural environment (Kreuger, 1998; Neumann et al., 2002, 2003a and 2003b; Berenzen et al., 2005a). Its life cycle being exclusively aquatic, it does not permit it to escape from intermittent pulses of contaminants. Furthermore, several ecotoxicological studies have revealed that this species was among the most sensitive aquatic invertebrates to numerous toxic substances (Helson and Surgeoner, 1986; Mian and Mulla, 1992; Schulz and Liess, 1999b; Wogram and Liess, 2001; Cold and Forbes, 2004; Van Wijngaarden et al., 2004; Bloor et al., 2005). Then, the choice of this species as test-organism was also relevant from an ecotoxicological point of view.

Previous studies have reported signs of field disturbance of *G. pulex* population by chemical pollutions such as a decrease of their abundance (Maund et al 1992; Veerasingham and Crane 1992; Schulz and Liess 1999b), a modification of their habitat selection in polluted sites (Schulz and Liess 2001b; De Lange et al 2006), and catastrophic drifts (Muirhead-Thomson 1978; Schulz and Liess 1999b; Heckmann and Friberg 2005; Lauridsen and Friberg 2005). Nevertheless, field disturbance mechanisms in *G. pulex* populations caused by contamination remain poorly documented.

Impairment of freshwater invertebrate populations is related to the details of fluctuating exposure regimes (Barnthouse 2004; Forbes and Cold 2005; Thiere and Schulz 2004; Zhao and Newman 2006; Ashauer et al 2006 and 2007). For instance, a pulse-exposure is likely to cause severe impact in *G. pulex* population with limited possibilities of recolonization (Heckmann et al 2005). Complexity of exposure ways occurring in the field is also likely to delay and increase impact on abundances, and therefore to extensively impair recovery behaviour (Kreutzweiser and Kingsbury 1987; Wallace et al 1989; Defoe and Ankley 2003). Then, Friberg et al. (2003) have observed that *G. pulex* abundances were significantly and negatively correlated with sediment pesticide contamination. Thus, field response of *G. pulex* to contaminants is likely severe and long-lasting.

Recovery processes should also be considered on the landscape level for a relevant ecological risk assessment (Liess and Ohe 2005). Previous studies have revealed a high recovery potency

of *G. pulex* population and concluded to only minor and temporary disturbances after a pesticide contamination (Crossland et al. 1982; Heckmann and Friberg 2005). Then, *G. pulex* was sometimes considered as not being among the “species at risk” after a pesticide contamination in reason of its high mobility (Neumann et al. 2003b; Berenzen et al 2005b; Liess and Ohe 2005). Thus, in spite of its ecological importance, the current knowledge about *G. pulex* alterations caused by pesticides remains poorly documented in the field, particularly about the spatial and temporal variations of these disturbances.

The present study investigated the recurrence and the distance of impact of a treatment area using wood preservative pesticides, i.e. a pyrethroid insecticide and a triazole fungicide, in a *G. pulex* population. Modifications in population densities and in population traits were assessed in three sites in the downstream of the pesticide source. These data were compared to a reference site located just in the upstream of the treatment area. This biomonitoring was performed monthly throughout a year. Water temperature, precipitation and river flow velocity were also assessed to observed possible correlations with measured biological alterations.

2. Material and methods

2.1. Study area and sampling sites

The Drugeon river is a medium range stream flowing into the Doubs river near the town of Pontarlier in Jura mountain (France). In the sampling area of this study, the annual average river flow was about 600 L.s⁻¹. The sampling site A was established about 950 m below the source and 40 m in the upstream of a wood treatment area. The three other experimental sites, i.e. site B, C and D, were established at respectively 60 m, 400 m and 2 000 m in the downstream of this treatment area (Fig. III.1). Except wood treatment, no anthropic activity was located in hillsides between sampling sites. Physical characteristics and morphological structure of the stream were similar between these four experimental sites (Tableau III.1). Visual estimation of the substrate composition at 5 m intervals indicated that gravel-cobble size particles interspersed with a few loose boulders constituted the majority of the stream bed: it composed about 80%, 90% and 95% of substrates in respectively May to November, March to April, and December to February. The other substrates, i.e. from 5% to 20% of the

streambed cover, were mainly composed by bryophyte, i.e. *Fontinalis sp.*, other substrates like organic matter deposits being very sparse (<1%). Substrate composition was similar between the four experimental sites, allowing relevant comparison between them.

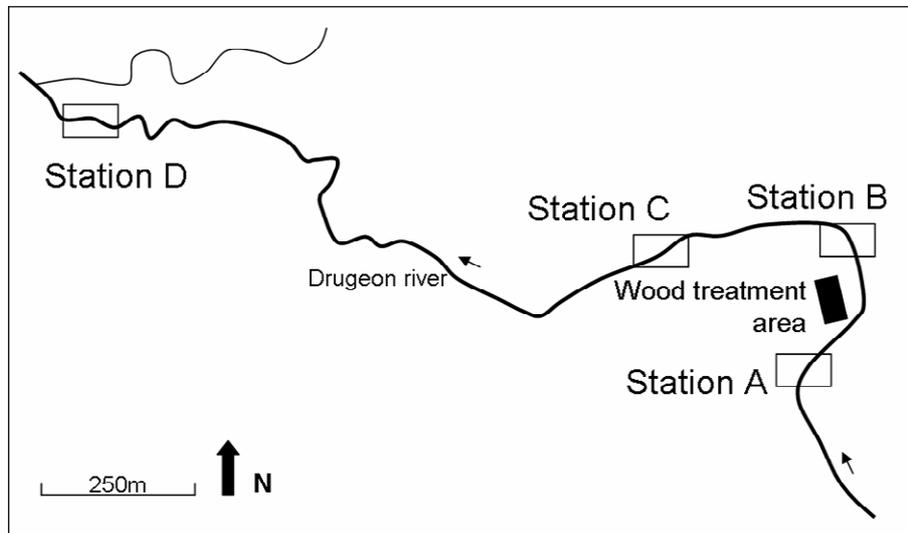


Figure III.1. Experimental area showing the wood treatment area (black rectangle) and sampling sites of *G. pulex* population (rectangles) along *Dugeon* river (black curve).

Parameters	station A		station B		station C		station D	
	min	max	min	max	min	max	min	max
Width (m)	6.2	8.1	6.3	7.0	5.8	7.5	5.4	8.2
Depth maximum (cm)		40		35		30		40
Water temperature (°C)	2.8	14.7	3.0	15.3	2.8	12.6	1.8	13.2
Conductivity ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	349	483	350	483	355	477	344	467
pH	7.0	7.4	7.1	7.4	7.1	7.5	7.0	7.3
Latitude (Lambert II)	N46°49'00.8"		N46°49'06.9"		N46°49'06.3"		N46°49'20.0"	
Longitude (Lambert II)	E006°14'39.3"		E006°14'43.6"		E006°14'25.8"		E006°13'35.6"	
Distance from the wood treatment area	40 m (upstream)		60 m (downstream)		400 m (downstream)		2000 m (downstream)	
Altitude	864m		863m		858m		853m	

Table III.1. Location and physical characteristics of the four experimental sites.

2.2. Environmental measurements

Precipitation, temperature and river flow velocity were daily recorded from 13th February 2004 to 25th February 2005. Daily precipitation data were provided from Météo France[®] for the nearest meteorological station (Labergement Sainte-Marie, 4 km), and daily measurement of Dugeon discharge was supplied from a hydrotimetric station located 400 m in the sawmill upstream. Water temperature was recorded every hour throughout the year by a permanent

measure station. Specific conductance and pH were measured at each sampling period by respectively Tetracon 325[®] and WTM Sentix 41-3[®].

Wood treatment occurred all over the year using the pyrethroid insecticide permethrin (CAS number 52645-53-1) and the triazole fungicide propiconazole (CAS number 60207-90-1). Contamination of underground water by wood preservatives was assessed by sampling underground water 2 meters down in piezometers implanted just above and below the treatment area. Freshwater sediment was sampled in the four experimental sites in March 2004, June 2004, October 2004 and February 2005. Then sediment samples were frozen at -25°C before laboratory treatment. Pesticide concentration was measured at the Central Environmental Analytical Laboratory, Institute of Environmental Science and Technology, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland. Measurements of triazole fungicides were made with HPLC/DAD (Hewlett Packard 1050[®], Agilent technology, Urdorf, Switzerland) equipped with a Vydac 201TP54[®] C18 analytical column (250mm x 4.6mm i.d., 5µm, 300Å) and protected by a pre-column Cartouche PelliguardTM LC-18 Supelco[®] (2cm x 4.6mm i.d., 40µm). Pyrethroids measurements were performed by GC Varian CP-3800[®] gaz chromatograph coupled with an ECD detector and equipped with a DB-5 analytical column (60m x 0.25mm x 0.25µm). The detection limit was 0.27 µg.kg⁻¹ dw of sediment for permethrin, and 3.25 µg.kg⁻¹ dw of sediment for propiconazole.

2.3. Sampling method

G. pulex population was sampled monthly from March 2004 to February 2005. In each of the four experimental sites, sampling has taken place using a Surber sampler (500 µm mesh bag, quadrat area of 1/20th m²). Three replicates of the three main river substrate types were sampled in each site: bryophyte (*Fontinalis sp.*), gravels (particles size between 2mm to 2cm), and organic matter (OM). These substrates were also the preferential living zones of *G. pulex* (Maitland 1966, Janetzki 1994, Dahl et Greenberg 1996, Elliott 2002). Current speed and depth were noted for each sample place. Similar sampling conditions were respected between each site. Samples were preserved in 10% formaldehyde. Animals were separated from samples by hand, then identified, counted and finally preserved in 50% ethanol.

2.4. Population characteristics

Individuals were examined using a Wild M3B microscope (Leica) with a magnification up to 40x. The *Gammarus sp.* was identified as being *G. pulex* (L.). It was distinguished from *G.*

fossarum (K.) by the setation of the second antenna, as well as by the length of the inner ramus of the third uropod, which was approximately 2/3 of the outer ramus (Roux 1970; Eggers et Martens 2001; Karaman and Pinkster 1977).

Population structure was determined for each sample. Individuals were separated into four developmental stages: juveniles (<3mm), young immature (3-5mm), old immature (5-7mm), and adults (>7mm) (Roux 1970; Welton and Clarke 1980). Sex identification was carried out by using the setation of the second antenna of adults and by the presence of four pairs of oostegites, i.e. brood plates, in the thoracic region of the adult female body. Gravid females were determined by the presence of eggs or neonates in the breeding pouch.

Abundances were recorded in each sample. Assessment of densities at the station-level was obtained by using the average densities in each substrate and the ratio of these substrates occurring in the field at the sampling date.

2.5. Statistical analysis

Statistical data analysis was performed by using Wilcoxon-Mann-Whitney and Kruskal-Wallis non parametric tests. Correlations were performed and tested using Spearman's rank correlation between the abiotic parameters such as river flow velocity, precipitation level and water temperature, and the biologic parameters such as population densities and the decrease rates of these densities comparing to the upstream site. Statistical analysis was performed by using R2.2.0[©] software.

3. Results

3.1. Water quality and contamination by wood preservatives

Underground water sampled in piezometers located in the wood treatment area revealed a contamination by wood preservative pesticides below the treatment area, i.e. 1.3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of permethrin and 4.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of propiconazole, whereas no pesticide was detected in the underground water just in the upstream of this area. Only one sample of sediment from site A was contaminated by traces of permethrin, the three other sediment samples analyzed being free of pesticides. Site B was the most contaminated site, sediment samples containing propiconazole (from traces to 3.4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), permethrin (from 0.5 to 1.8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Permethrin was also detected in sediment from site C and D (between traces to 4.2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Therefore, analysis of sediment and underground water revealed that whereas the upstream site was relatively free of pesticide contamination, all of the three downstream sites were contaminated

by wood preservatives. Except pesticide contamination, environmental conditions measured in this study (Tab. III.1) were never restrictive for *G. pulex* living (Minshall and Minshall 1978, Glazier 1992, Schrimpf and Foekler 1985, Meijering 1991). Therefore, differences in *G. pulex* population occurring between the site A and the site B, C and D were mainly related to the recurrent pesticide contamination.

3.2. Population densities

Densities in the upstream site ranged from 40.0 ind.m⁻² in March to 146.4 ind.m⁻² in June. In the four experimental sites, densities were higher in the late spring, i.e. May and June, and in early winter, i.e. December (Fig III.2).

The average decrease rates of densities comparing to the upstream site were 63.2%, 60.2% and 37.4% for respectively site B, C and D. Then, densities observed in sites A and D were significantly higher than those observed in sites B and C ($p < 0.0001$). No significant difference of densities was observed between sites A and D, except in June where site D was impacted ($p = 0.0498$). In a same way, no significant difference of densities was observed between sites B and C, except in September and October where population in site B was more impacted than in site C ($p < 0.0336$, Fig III.2).

This impact in *G. pulex* densities was higher in summer, i.e. from June to September, than in winter, i.e. November to February ($p = 0.0011$, Fig. III.2). Then, the decrease rates of densities comparing to the upstream site ranged from a severe reduction of abundances in July to a complete recovery in February. No significant difference in population densities was observed between the upstream and the downstream of the treatment area in March and February.

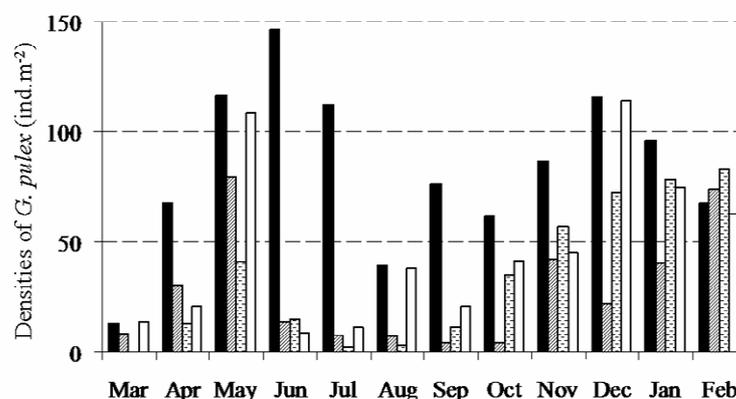


Figure III.2. Evolution of *G. pulex* densities (ind.m⁻²) measured in station A (black), station B (oblic lines), station C (horizontal lines), and station D (white) along the year.

3.3. Influence of substrate on the impact

82.8%, 9.5% and 7.7% of individuals occurred respectively in bryophyte, gravel and OM samples. These densities reached in the upstream site to $2\,753 \pm 1\,533$, 340 ± 35 , and 560 ± 216 ind.m⁻² respectively in bryophyte, gravel, and OM samples. Then, *G. pulex* densities recorded in bryophytes samples were significantly higher ($p < 0.0001$) than those measured in both other substrates. Population densities observed in gravel and OM samples were not significantly different. The impact in population densities significantly differed ($p = 0.0368$) between substrate types: the density decrease in the downstream sites of the treatment area comparing to the upstream site was significant in bryophyte samples ($p < 0.0001$) but not in gravel and OM samples (Fig. III.3).

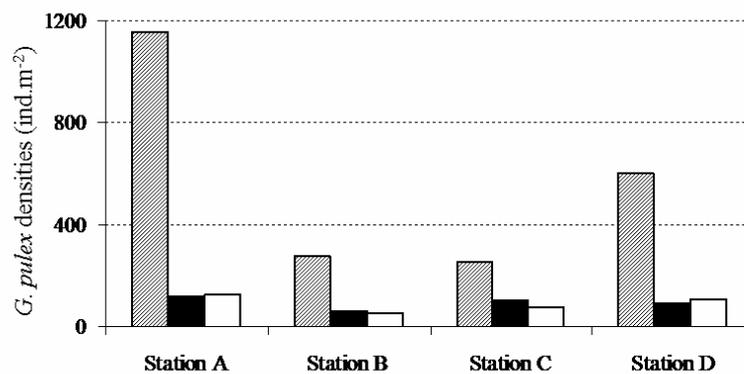


Figure III.3. Average annual densities (ind.m⁻²) of *G. pulex* in bryophyte (grey), gravel (black), and OM (white) sampled in stations A, B, C and D.

Adult specimens sampled in the upstream site were proportionally more abundant in bryophyte than in other both sampled substrates ($p = 0.0215$). However, this spatial micro-distribution of adults between substrates was not significant in site B and C.

3.4. Population composition

Smallest individuals, i.e. juveniles, were always the most abundant category in the upstream site. This developmental stage composed 55.6% of the population. This value ranged from a minimum of 36.2% in June to more than 67.7% from October to January.

Highest densities of juveniles were observed when highest population densities were recorded, i.e. from May to June and from November to January. Highest densities of adult specimens were observed in the late spring, i.e. May and June, and in a slighter part in winter, i.e. January and February (Fig. III.4).

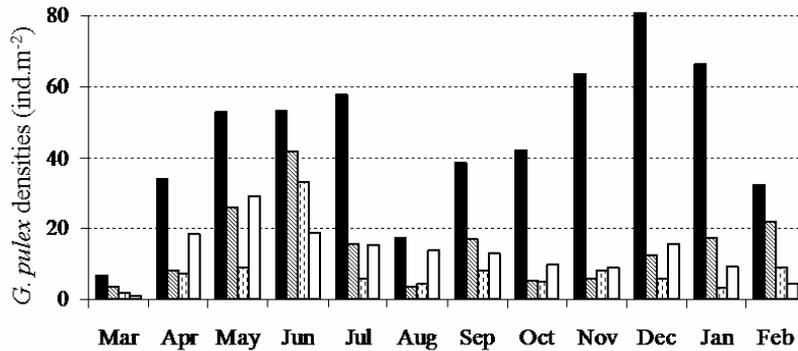


Figure III.4. Densities of each developmental stage (ind.m⁻²) in the upstream site for each of the twelve sampling periods: juveniles (< 3 mm) are indicated in black, young immature (3-5 mm) are in grey, old immature (5-7 mm) are represented with dotted lines, and adults (> 7 mm) are in white.

Densities of all developmental stages were reduced in the downstream of the treatment area. Nevertheless, difference of response was observed between these stages by increasing distance from the treatment area. Juvenile densities remained highly reduced in the three downstream sites: only from 41% to 47% of the juvenile densities observed in the upstream site occurred in these areas. Densities of adult specimens were highly reduced in site B, i.e. 16% of the upstream adult densities, and only slightly reduced in site D, i.e. 88% of the upstream adult densities. Then, adults were the developmental stage the highest impacted in site B ($p=0.0459$) whereas the population densities recovery observed in site D was mainly related to recolonization by these individuals. At the opposite, smallest specimens were the less impacted in site B, and the most impacted in site D (Fig. III.5).

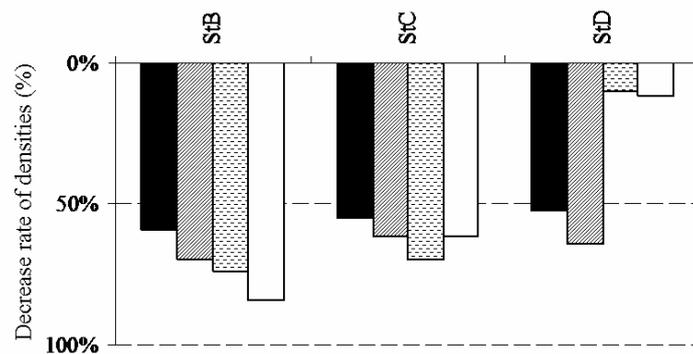


Figure III.5. Decrease rates of densities observed between station A (upstream site) and respectively site B, C and D (downstream sites) for each *G. pulex* developmental stage : juveniles (< 3 mm) in black, young immature (3-5 mm) in grey, old immature (5-7 mm) in dotted lines, and adults (> 7 mm) in white.

As a consequence, the population structure was altered in the downstream of the treatment area. For instance, proportion of adults among the population was significantly reduced in site

B (8.2% of *G. pulex* specimens) comparing to site A where they composed 16.5% of the population ($p=0.0368$, Fig. III.6).

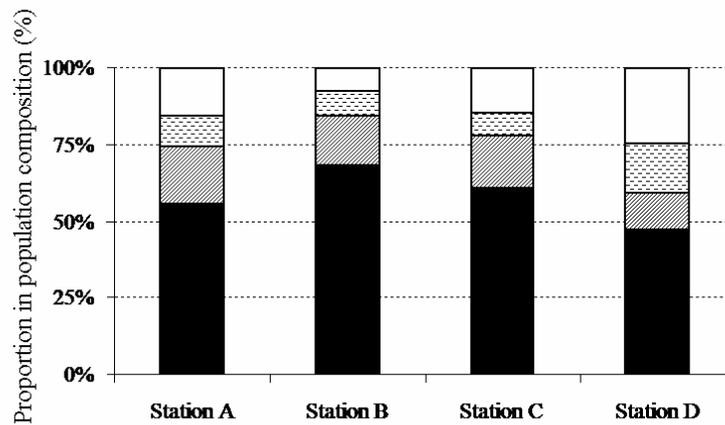


Figure III.6. Average population composition (%) in each sampling site: juveniles (< 3 mm) in black, young immature (3-5 mm) in grey, old immature (5-7 mm) in dotted lines, and adults (> 7 mm) in white.

3.5. Rate of gravid females

No diapause period has been observed, gravid females having been observed all over the year, except in June where only a few adults were sampled. The proportion of gravid females among all adult females was minimum in June and December, and maximum in the late winter (February and March), and in early autumn (from August to October, Fig. III.7). No significant difference of gravid female rate was observed between the four experimental sites.

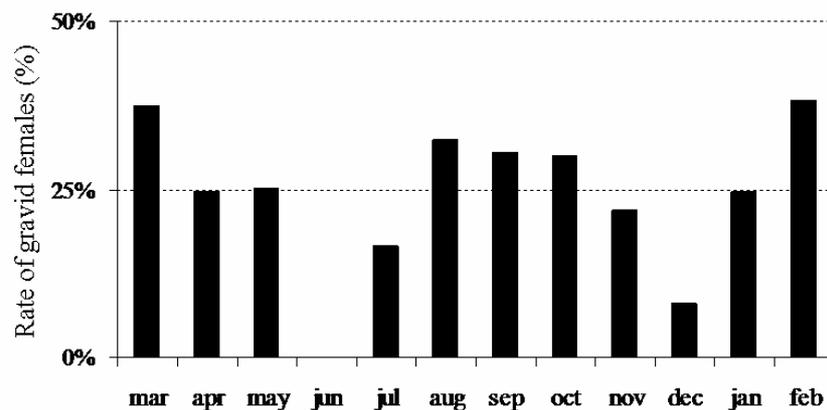


Figure III.7. Evolution of the average proportion (%) of gravid female among all adult females sampled in the four studied sites.

3.6. Sex ratio

The average percentage of female among the overall adults was 61.0%. This value ranged from 41.7% in July to 72.1% in November (Fig. III.8). No significant impact of the wood treatment area was observed in the *sex ratio* of adult *G. pulex*.

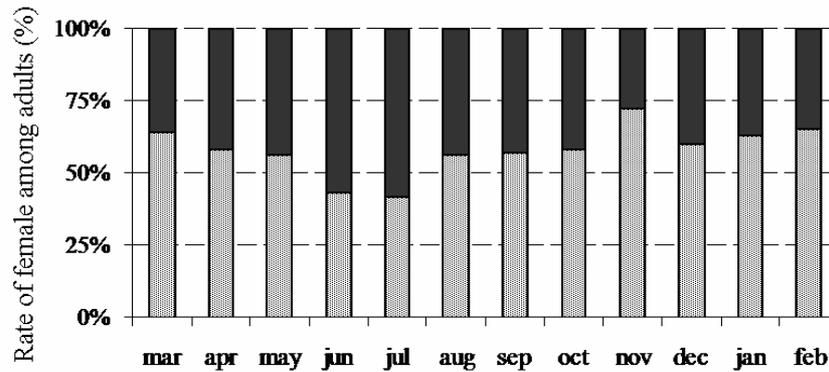


Figure III.8. Percentage of female (grey) and male (black) among *G. pulex* adults sampled in the four experimental sites.

3.7. Relationship between biological impacts and abiotic parameters

The flow velocity varied from 0.05 to 7.97 m³.s⁻¹. Precipitation reached to 54.9 mm the 26th October (Fig. III.9). No significant correlation was observed between densities of each developmental stage and the cumulative precipitation or flow velocity rate from the first, both, three, four and seven last days previous sampling. In a same way, no relationship was observed between these abiotic parameters and the density decrease rates of the developmental stages.

Water temperature ranged from -0.54°C in the early morning of 9th and 10th February to 20.66°C in the late afternoon of 2nd August. Temporal evolution of *G. pulex* abundances was not directly related to the water temperature. However, the impact in *G. pulex* densities was significantly correlated with water temperature in site B ($r=0.6294$, $p=0.0312$) and C ($r=0.7692$, $p=0.0050$). This relationship was not significant in site D.

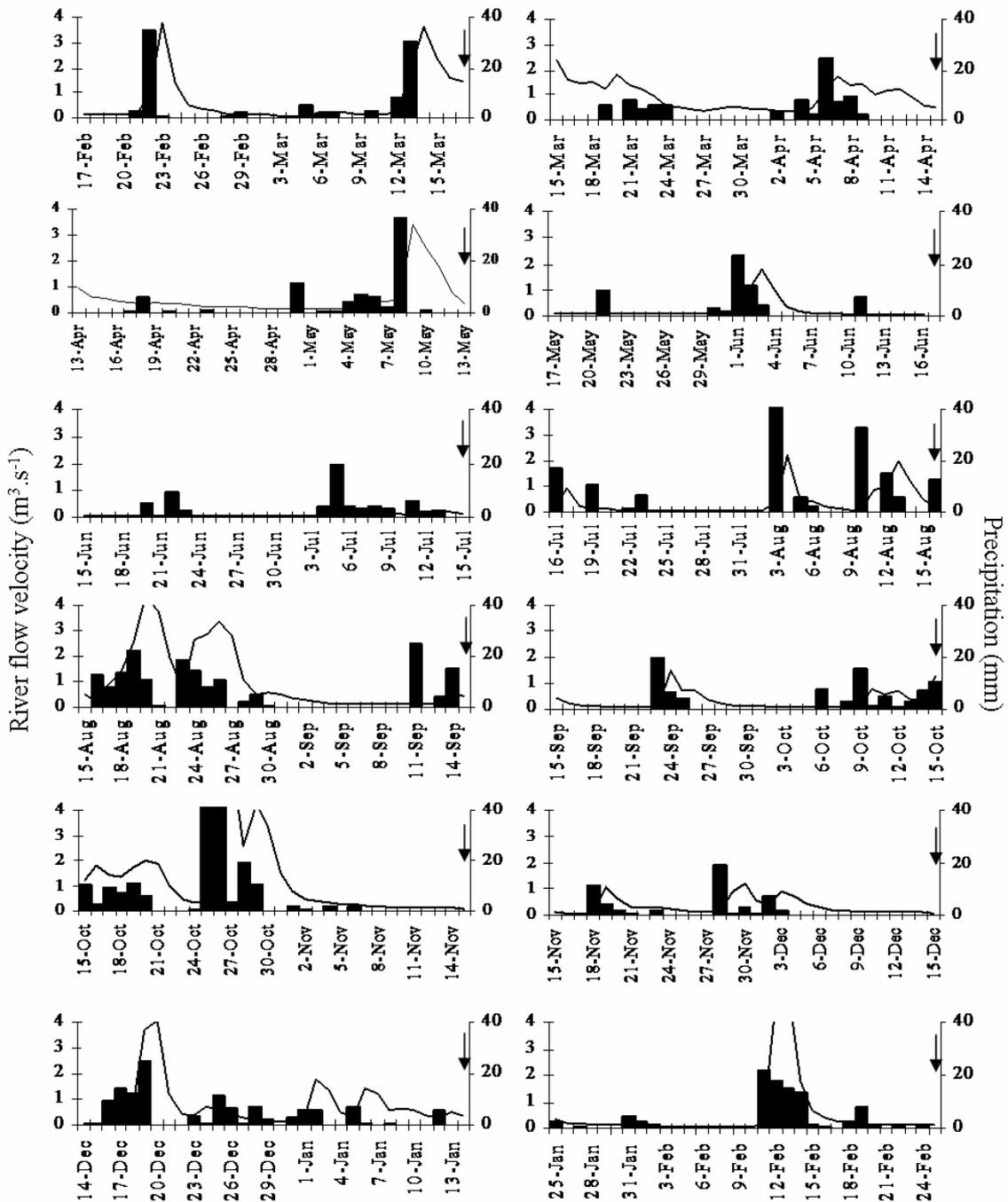


Figure III.9. Precipitation (mm, histograms) and river discharge ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, curves) the 30 days previous each of the twelve sampling periods (indicated by arrows).

4. Discussion

4.1 Population characteristics in the upstream site

Densities of *G. pulex* recorded in bryophyte samples from the upstream experimental site reached to $2\,753 \text{ ind} \cdot \text{m}^{-2}$. Similar densities were recorded in previous field studies where

population densities reached from 2 900 to up than 7 000 ind.m⁻² (Iversen and Jessen 1977; Graça et al. 1994a, Crane 1994, Janetzky 1994). Nevertheless, most of these reference densities were obtained in small cold springs whereas Crane (1994) has shown that *G. pulex* abundance significantly differed between streams notably by the influence of the physical structure of the streambed. Then, other uncontaminated streams, particularly in medium range stream, sheltered population with densities reaching to only a few hundreds of individuals per square metre (Crane 1994, Ladewig 2006). These density values were in accordance with those obtained at the station level in the upstream site of this study.

G. pulex being nocturnal, its spatial distribution observed in the present study corresponded to its diurnal behaviour. Then, specimens were likely aggregated in refuge habitats (Elliott 2005). Highest densities were recorded specifically in bryophyte samples. Thus, this substrate was primarily regarded by *G. pulex* as a physical structure to avoid high flows as observed in previous studies (Dahl and Greenberg 1996; Elliott 2002).

This spatial distribution was also related to interstices created by coarse substrates rather at substrate *per se* (Gee 1988; Graça et al 1994a; Dahl and Greenberg 1996; Elliot 2002 and 2005). For instance, immature and adult specimens were proportionally more abundant in bryophyte, which provided coarse interstices, than in other substrates. In a same way, proportion of juveniles among the population was higher in gravel, where smaller interstices occurred, than in other substrates. This spatial distribution of smallest individuals was also likely to correspond to an avoidance of cannibalism from adults that were particularly abundant in bryophytes (Schulz and Liess 2001b). Therefore, comparing to undisturbed populations described in previous studies, no alteration of the microdistribution of specimens between substrates was observed in the upstream site of the present study.

Juveniles were the developmental stage the most abundant of the population throughout the year as reported by Welton (1979). The *sex ratio* fluctuated around 1:1 despite high variations as observed by Hynes (1955) and Welton (1979), female number being slightly higher than male number among adults. Thus, the population structure observed in the upstream site of the present study was also in accordance with undisturbed population previously described.

The evolution of this population structure indicated a life history with two main reproduction periods as reported by several authors (Hynes 1955; Hultin 1971; Iversen and Jessen 1977; Gee 1988). The first recruitment occurred in early spring as shown by the high rates of gravid

females and the increasing abundance of juveniles from March to May. Changes in *sex ratio* observed from May to July indicated that overwinter females died until reproduction achieved as assumed by Hynes (1955) and Hultin (1971). This first main reproduction period led to the high population density observed in June.

Neonates grew intensively with increasing temperature (Welton and Clarke 1980; Sutcliffe 1992) as shown by the increasing proportion of highest size categories among population from March to June. Then, the new generation reached to maturity in a few months, i.e. from the late summer to the late autumn of the same year, as corroborated by the high gravid female rates observed from August to November.

A second recruitment occurred from August to December as shown by the increasing juvenile abundance and their higher proportion among the population in this period. This second main reproduction period led to the high population density observed in December. Similar observations were made in autumn by Hynes (1955) and Gee (1988).

The slow evolution of densities and population structure in winter indicated that this second generation grew slowly and that high mortality rates occurred in this period. The importance of temperature-dependence of *G. pulex* for its life cycle was demonstrated notably by Hynes (1955), Welton and Clarke (1980) and Sutcliffe (1992). Most of females became sexually mature from February and survival overwinter adults began their reproduction in this period as indicated by the increasing gravid female rates observed in winter.

Number and periods of recruitment was likely to change between streams (Iversen and Jessen 1977; Graça et al 1994a). The presence of two main reproduction periods in the present study rather than only one was probably related to favourable ecological conditions occurring in Drugeon river throughout the year, e.g. favourable temperature, abundance of food, or/and favourable biological interactions (Iversen and Jessen 1977, Kolding and Fenchel 1979 and 1981; Gee 1988; Graça et al 1994a). The absence of diapause, like observed by Welton (1979), and contrary to several other previous studies (Hynes 1955; Maitland 1966; Hultin 1971; Iversen and Jessen 1977; Sutcliffe 1992), would also indicate the presence of favourable environmental conditions for *G. pulex* throughout the year.

Thus, the population densities, the spatial distribution, the population structure, and the life history recorded in the upstream site of the present study were in accordance with other undisturbed *G. pulex* populations previously described. Therefore, the site A could be

considered as a relevant and suitable reference site for the observation of *G. pulex* population disturbances occurring in the downstream of the wood treatment area.

4.2. Disturbances in *G. pulex* population

Underground water and sediment samples have revealed a contamination of the aquatic environment by wood preservative pesticides in the downstream of the treatment area. Numerous studies have demonstrated that pyrethroid insecticides, like permethrin, were likely to display acute toxicity at very low doses in aquatic invertebrates. For instance, Muirhead-Thomson (1978) has observed that the LC90_{24h} of permethrin in *G. pulex* was about 1.0 µg.L⁻¹ after only 1 h of exposure. Furthermore, ecotoxicological studies have shown that mixture of pyrethroid insecticides and triazole fungicides were likely to display synergistic lethality in *G. pulex* (Adam *et al.*, 2006).

The most obvious impact of the wood treatment area in the studied *G. pulex* population was the density decrease observed in the downstream. Therefore, as mentioned in previous studies, density was a relevant variable for measuring effects of toxic contamination, most of aquatic invertebrate populations being only reduced in abundances rather than completely eliminated by contaminants (Sibley *et al.* 1991, Maund *et al.* 1992, Crane *et al.* 1995a). This decrease of population densities could have direct consequences in *G. pulex* behaviour like changes in their upstream and downstream migration rates (Dahl and Greenberg 1996; Elliott 2002). Habitat selection was also density-dependant and then likely modify by the decrease of population abundance (Elliott 2005).

Differences of response observed between developmental stages altered the population structure in the impacted sites. Then, the intra-specific interactions were modified in these areas, leading also to a modification of the *G. pulex* behaviour. For instance, the decrease of the adult ratio in the population tended to reduce their cannibalism pressure on smallest specimens (McNeil 1997). Therefore, the avoidance of adults by juveniles would be less intensive in the impacted sites, i.e. where lowest ratio of adults occurred. This could partly explain changes in habitat selection observed between the upstream and the most impacted sites. Similar change of *G. pulex* spatial distribution was also observed by Schulz and Liess (2001b) below a pesticide discharge.

The adult ratio among the overall population being lower in the most impacted sites, the presence of genitors among population was mechanically proportionally reduced in these sites. Thus, for a same population density, the recruitment potency of the population was higher in safer sites. Therefore, *G. pulex* reproduction was primarily impacted by the decrease of genitor abundances.

Reproduction of *G. kischineffensis* has been reported to be affected by propiconazole by causing premature separation of pairs, and probably by disrupting the release of sexual pheromones by females and their chemoreception by males (Meliyan, 1991). However, no significant impact on the rate of gravid females of *G. pulex* was recorded in the present study. Nevertheless, low adult densities observed in the most impacted sites tended to hide possible insidious effects.

Propiconazole also interfered with crustacean embryonic development via maternal exposure and increased developmental effects in the offspring, reducing life expectancy of neonates (Kast-Hutcheson et al., 2001; Soetaert et al., 2006). Furthermore, high sensitivity of juvenile *G. pulex* to pollutants has been previously observed (Maund et al., 1992; McCahon and Pascoe, 1998a). Therefore, the shorter first recruitment phase observed in the most impacted sites could be related to high mortality rates of neonates occurring in these areas. This phenomenon was less obvious in the second main recruitment period. It was likely related to more favourable environmental conditions occurring in winter, e.g. lower temperatures, and therefore to a reduction of additional stress in this period.

However, comparative data on sensitivity of adult and juvenile *G. pulex* to contaminants remain poorly documented. Mc Cahon and Pascoe (1998) have shown that juveniles were almost 250 times more sensitive to cadmium than adults in laboratory conditions. Similarly, Maund et al. (1992) have shown in a mesocosm experiment that juvenile *G. pulex* were more sensitive to copper than adults. These results appeared to be in contradiction with the field observations of the present study: juveniles were the less impacted category in the close downstream of the treatment area whereas adults were the most impacted category in this area. Thus, this difference of response between these both developmental stages in field conditions was not *a priori* explained by a difference of physiological sensitivity to chemicals: all of the scarce available data similarly indicated a higher sensitivity of juveniles to contaminants than adults. Therefore, the higher impact measured in adults than in juveniles in the present study was likely related to a particular behaviour occurring *in natura*.

De Lange et al. (2006) have shown that a contamination of the aquatic environment was likely to display a modification of *G. pulex* behaviour like their avoidance of contaminated areas. This avoidance behaviour was corroborated by several authors that have reported high and fast drift rates of *G. pulex* after a pesticide contamination, even at very low sublethal concentration (Kreutzweiser et al 1989, Schulz and Liess 2001a; Heckman and Friberg 2005). Chemical detection of contaminants was likely performed by chemosensory sensilla on second pair of *G. pulex* antennula (Sutcliffe 1992; De Lange et al 2005). This organ being more developed in aged individuals (Roux 1970), adults were expected to better detect and avoid contamination than younger specimens. This was corroborated by the high density decrease of adults in the first downstream sites despite their *a priori* lower physiological sensitivity to chemicals than juveniles. The absence of difference between male and female behaviour in the impacted sites indicated that females were as well as males able to detect and avoid chemical exposure.

By this avoidance phenomenon, adults were likely to reduce physiological damage when succeeding in finding safer site. For instance, higher mobility and living rates were observed in drift samples for *G. pulex* individuals than for other invertebrate species (Schulz and Liess 1999b; Lauridsen and Friberg 2005). Thus, the recovery of adults observed in the last downstream site was likely related to safer conditions occurring for them in this area.

In a same way, youngest individuals being highly sensitive to toxic substances, and unlikely to detect and avoid exposure to these contaminants, they were likely impaired in the contaminated sites. This was corroborated by the high decrease of juvenile abundances recorded in all of the three experimental sites located below the pesticide source.

4.3 Distance and recurrence of the impact

Distance, intensity and recurrence of biological impact measured in the present study varied throughout the year. The population was altered in the three downstream experimental sites studied, however a partial densities recovery was observed 2 000 meters in the downstream of the treatment area despite intermittent severe collapses. A similar decrease of impact by increasing distance from the pesticide source was observed by Schulz and Liess (1999b) in another *G. pulex* population.

Population recovery of freshwater invertebrates are partly governed by life-history characters of organism (Sherrat et al 1999; Barnthouse 2004), individuals' mobility (Neumann et al 2003b; Berenzen et al 2005b; Liess and Ohe 2005), and isolation of the aquatic environment (Caquet et al. 2007). All of these characteristics were unchanged between sampling periods:

one species, one population and one study area. Furthermore, the absence of relationship observed between *G. pulex* densities and precipitation or flow velocity confirmed that, as observed by Schulz and Liess (1999b), measured effects were mainly related to pesticide stress rather to hydraulic components stress. Therefore, recolonization and survival modifications observed in the present study were in all likelihood mainly related to the exposure regime to contaminants like demonstrated by many authors (Forbes and Cold 2005; Reynaldi and Liess 2005; Zhao and Newman 2006; Ashauer et al 2007).

Contaminated runoff associated with precipitation produced pulsed exposures to pesticides (Reinert et al 2002). Furthermore, low hydro-soluble pesticides, like wood preservatives, are incorporated and stocked in streambed sediment, where they are likely to desorb, notably after sediment agitation (Zhu and Selim 2002a). The absence of correlation between the intensity of impact in densities and precipitation regime or flow velocity indicated that measured impairments of the *G. pulex* population were not only related to inputs of contaminated runoff from the treatment area after rainfall events or to desorption from contaminated particles following sediment agitation. The pesticide exposure regime were rather likely related to the combined effect of these both components and of multiple other environmental parameters such as the transfer dynamic between surface water and contaminated underground water.

Nevertheless, a positive correlation was observed between water temperature and the density decrease rates below the treatment area: pesticide impact in *G. pulex* densities was higher in summer than in winter. Similar correlations between pesticide toxicity and physical parameters such as temperature were also observed in macroinvertebrate communities by Overmyer et al. (2005). Significant correlations were obtained only in the most recurrently impacted sites. Thus, when the pesticide stress was expect to be the most recurrent like in the close downstream of the treatment area, the biological impact were mainly modulated by the water temperature. At the opposite, when the pesticide pressure became likely inconstant by increasing distance with the treatment area, the biological impact would be modulated by the variations of this pesticide exposure and by the variation of water temperature. Therefore, field impacts measured in *G. pulex* population were the combination of pesticide exposure effect modulated by the presence of additional environmental stress like high water temperatures.

Thus, despite its high mobility and recovery potency (Dedecker et al. 2006), *G. pulex* was highly and constancy altered by the wood preservative contamination. A correlation between pesticide exposure and *G. pulex* abundance has been previously observed by Friberg et al. (2003). However, other studies have observed a recovery of *G. pulex* in a few weeks after a pesticide contamination (Crossland et al. 1982; Heckmann and Friberg 2005). This difference of recovery behaviour was in all likelihood related to numerous parameters such as chemicals' nature, rate and dose of applications, isolation and typology of the aquatic environment. Therefore, notably because of these field complexity and unpredictability of disturbances, a relevant assessment of an ecological risk caused by a pesticide contamination must take into account field studies integrating real exposure and recovery expectancy of organisms.

5. Conclusion

This study has shown that a pesticide contamination was likely to have long-term direct and indirect impairment on *G. pulex* population despite its high recovery potency. Results illustrated requirement of integrative field studies for a relevant assessment of ecological risk caused by pesticide contaminations.

Acknowledgements - The authors are indebted to Agence de l'Eau Rhône, Méditerranée et Corse for financial support. Olivier Adam is indebted to Conseil Régional de Franche-Comté for PhD fellowship. Stéphanie Denis is grateful acknowledged for valuable technical assistance.

References

- Adam, O., Degiorgi, F., Crini, G., Badot, P-M., November 2006. Pesticide mixture toxicity on *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea, Amphipoda). 27th annual meeting of SETAC North America, Montréal, Canada.
- Ashauer, R., Boxall, A.B.A., Brown, C.D., 2006. Predicting effects on aquatic organisms from fluctuating or pulsed exposure to pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1899-1912.
- Ashauer, R., Boxall, A.B.A., Brown, C.D., 2007. New ecotoxicological model to simulate survival of aquatic invertebrates after exposure to fluctuating and sequential pulses of pesticides. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1480-1486.
- Barnthouse, L.W., 2004. Quantifying population recovery rates for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 500-508.
- Berenzen, N., Lentzen-Gogging, A, Probst, M., Schulz, H., Schulz, R., Liess, M., 2005a. A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticides concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere.* 58, 683-691.

- Berenzen, N., Kumke, T., Schulz, H.K., Schulz, R., 2005b. Macroinvertebrate community structure in agricultural streams : impact of runoff-related pesticide contamination. *Ecotox. Environ. Saf.* 60, 37-46.
- Bloor, M.C., Banks, C.J., Krivtsov, V., 2005. Acute and sublethal toxicity tests to monitor the impact of leachate on an aquatic environment. *Environ. Int.* 31, 269-273.
- Bollache, L., Kaldonski, N., Troussard, J.P., Lagrue, C., Rigaud, T., 2006. Spines and behaviour as defences against fish predators in an invasive freshwater amphipod. *Anim. Behav.* 72, 627-633.
- Caquet, T., Hanson, M.L., Roucaute, M., Graham, D.W., Lagadic, L., 2007. Influence of isolation on the recovery of pond mesocosms from the application of an insecticide. II. Benthic macroinvertebrate responses. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1280-1290.
- Cold, A., Forbes, V.E., 2004. Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. *Aquat. Toxicol.* 67, 287-299.
- Crane, M., 1994. Population characteristics of *Gammarus pulex* (L.) from five English streams. *Hydrobiologia* 281, 91-100.
- Crane, M., Delaney, P., Watson, S., Parker, P., Walker, C., 1995a. The effect of Malathion 60 on *Gammarus pulex* (L.) below watercress beds. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1181-1188.
- Crossland, N.O., Shires, S.W., Bennett, D., 1982. Aquatic toxicology of cypermethrin. III. Fate and Biological effects of spray drift deposits in Fresh Water adjacent to agricultural land. *Aquat. Toxicol.* 2, 253-270.
- Dahl, J., Greenberg, L., 1996. Effects of habitat structure on habitat use by *Gammarus pulex* in artificial streams. *Freshwater Biol.* 36, 487-495.
- De Lange, H.J., Lurling, M., Van Den Borne, B., Peeters, E.T.H.M., 2005. Attraction of the amphipod *Gammarus pulex* to water-borne cues of food. *Hydrobiologia* 544, 19-25.
- De Lange, H.J., Sperber, V., Peeters, E.T.H.M., 2006. Avoidance of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediments by the freshwater invertebrates *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 452-457.
- Dedecker, A.P., Goethals, P.L.M., D'Heygere, T., De Pauw, N., 2006. Development of an in-stream migration model for *Gammarus pulex* L. (Crustacea, Amphipoda) as a tool in river restoration management. *Aquat. Toxicol.* 40, 249-261.
- Defoe, D.L., Ankley, G.T., 2003. Evaluation of time-to-effects as a basis for quantifying the toxicity of contaminated sediments. *Chemosphere* 51, 1-5.
- Eggers, T.O., Martens, S A., 2001. Bestimmungsschlüssel der Süßwasser-Amphipoda (Crustacea) Deutschland – A key to the freshwater Amphipoda (Crustacea) of Germany. *Lauterbornia* 42, 1-70.
- Elliott, J.M., 2002. The drift distances and time spent in the drift by freshwater shrimps, *Gammarus pulex*, in a small stony stream, and their implications for the interpretation of downstream dispersal. *Freshwater Biol.* 47, 1403-1417.
- Elliott, J.M., 2005. Day-night changes in the spatial distribution and habitat preferences of freshwater shrimps, *Gammarus pulex*, in a stony stream. *Freshwater Biol.* 50, 552-566.
- Forbes, V.E., Cold, A., 2005. Effects on the pyrethroid esfenvalerate on life-cycle traits and population dynamics of *Chironomus riparius* – importance of exposure scenario. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 78-86.
- Friberg, N., Lindstrom, M., Kronvang, B., Larsen, S.E., 2003. Macroinvertebrates/sediment relationships along a pesticide gradient in Danish streams. *Hydrobiologia* 494, 103-110.

- Gee, J.H.R., 1988. Population dynamics and morphometrics of *Gammarus pulex* L. : evidence of seasonal food limitation in a freshwater detritivore. *Freshwater Biol.* 19, 333-343.
- Glazier, D.S., Horne, M.T., Lehman, M.E., 1992. Abundance, body composition and reproductive output of *Gammarus minus* (Crustacea: Amphipoda) in ten cold springs differing in pH and ionic content. *Freshwater Biol.* 28, 149-163.
- Graça, M.A.S., Maltby, L., Calow, P., 1994a. Comparative ecology of *Gammarus pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.): population dynamics and microdistribution. *Hydrobiologia* 281, 151-162.
- Heckmann, L.-H., Friberg, N., 2005. Macroinvertebrate community response to pulse exposure with the insecticide lambda-cyhalothrin using in-stream mesocosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 582-590.
- Heckmann, L.-H., Friberg, N., Ravn, H., 2005. Relationship between biochemical biomarkers and pre-copulatory behaviour and mortality in *Gammarus pulex* following pulse-exposure to lambda-cyhalothrin. *Pest. Manag. Sci.* 61, 627-635.
- Helson, B.V., Surgeoner, G.A., 1986. Efficacy of cypermethrin for the control of mosquito larvae and pupae, and impact on non-target organisms, including fish. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2, 269-275.
- Hultin, L., 1971. Upstream movements of *Gammarus pulex pulex* (Amphipoda) in a south Swedish stream. *Oikos* 22, 329-347.
- Hynes, H.B.N., 1955. The reproductive cycle of some British freshwater Gammaridae. *J Anim Ecol* 24, 352-387.
- Iversen, T.M., Jessen, J., 1977. Life-cycle, drift and producing of *Gammarus pulex* L. (Amphipoda) in a Danish spring. *Freshwater Biol.* 7, 287-296.
- Janetzky, W., 1994. Distribution of the genus *Gammarus* (Amphipoda: Gammaridae) in the River Hunte and its tributaries (Lower Saxony, northern Germany). *Hydrobiologia* 294, 23-34.
- Karaman, G.S., Pinkster, S., 1977. Freshwater *Gammarus* species from Europe, north Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda). *Bijdragen Tot De Dierkunde* 47, 1-97.
- Kast-Hutcheson, K., Rider, C.V., Leblanc, G.A., 2001. The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 502-509.
- Kelly, D.W., Dick, J.T.A., Montgomery, W.I., 2002. The functional role of *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): shredders, predators, or both? *Hydrobiologia* 485, 199-203.
- Kolding, S., Fenchel, T., 1979. Coexistence and life cycle characteristics of five species of the amphipod genus *Gammarus*. *Oikos* 33, 323-327.
- Kolding, S., Fenchel, T., 1981. Patterns of reproduction in different populations of five species of the amphipod genus *Gammarus*. *Oikos* 37, 167-172.
- Kreuger, J., 1998. Pesticides in stream water within an agricultural catchments in southern Sweden, 1990-1996. *Sci. Total Environ.* 216, 227-251.
- Kreutzweiser, D.P., Kingsbury, P.D., 1987. Permethrin treatments in Canadian forests. Part 2: impact on stream invertebrates. *Pestic. Sci.* 19, 49-60.
- Kreutzweiser, D.P., Kingsbury, P.D., Feng, J.C., 1989. Drift response of stream invertebrates to aerial applications of glyphosphate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 331-338.
- Ladewig, V., Jungmann, D., Kohler, H.-R., Schirling, M., Triebkorn, R., Nagel, R., 2006. Population structure and dynamics of *Gammarus fossarum* (Amphipoda) upstream and downstream from effluents of sewage treatment plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 370-383.

- Lauridsen, R.B., Friberg, N., 2005. Stream macroinvertebrate drift response to pulsed exposure of the synthetic pyrethroid lambda-cyhalothrin. *Environ. Toxicol.* 20, 513-521.
- Liess, M., Von Der Ohe, P.C., 2005. Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 954-965.
- McCahon, C.P., Pascoe, D., 1988a. Use of *Gammarus pulex* (L.) in safety evaluation tests: culture and selection of a sensitive life stage. *Ecotox. Environ. Saf.* 15, 245-252.
- McNeil, C., Dick, J.T.A., Elwood, R.W., 1997. The trophic ecology of freshwater *Gammarus* (Crustacea : Amphipoda) ; problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biol. Rev* 72, 349-364.
- Maitland, P.S., 1966. Notes on the biology of *Gammarus pulex* in the river Endrick. *Hydrobiologia* 28, 142-152.
- Maund, S.J., Taylor, E.J., Pascoe, D., 1992. Population responses of the freshwater amphipod crustacean *Gammarus pulex* (L.) to copper. *Freshwater Biol.* 28, 29-36.
- Meijering, M.P.D., 1991. Lack of oxygen and low pH as limiting factors for *Gammarus* in Hessian brooks and rivers. *Hydrobiologia* 223, 159-169.
- Meliyan, R.I., 1991. Effect of pesticides on reproductive function of the freshwater amphipod *Gammarus kischineffensis*. *Hydrobiol. J.* 27, 33-36.
- Mian, L.S., Mulla, M.S., 1992. Effects of pyrethroid insecticides on nontarget invertebrates in aquatic ecosystems. *J. Agric. Entomol.* 9, 73-98.
- Minshall, G.W., Minshall, J.N., 1978. Further evidence on the role of chemical factors in determining the distribution of benthic invertebrates in the River Duddon. *Arch. Hydrobiol.* 83, 324-355.
- Muirhead-Thomson, R.C., 1978. Lethal and behavioural impact of permethrin (NRDC 143) on selected stream macroinvertebrates. *Mosq. News* 38, 185-190.
- Neumann, M., Schulz, R., Scafer, K., Muller, W., Mannheler, W., Liess, M., 2002. The significance of entry routes as point and non-point sources of pesticides in small streams. *Water Res.* 36, 835-842.
- Neumann, M., Liess, M., Schulz, R., 2003a. A qualitative sampling method for monitoring water quality in temporary channels or point sources and its application to pesticide contamination. *Chemosphere* 51, 509-513.
- Neumann, M.; Baumeister, J., Liess, M., Schulz, R., 2003b. An expert system to estimate the pesticide contamination of small streams using benthic macroinvertebrates as bioindicators I. The database of LIMPACT. *Ecol. Indic.* 2, 379-389.
- Overmyer, J.P., Noblet, R., Armbrust, K.L., 2005. Impacts of lawn-care pesticides on aquatic ecosystems in relation to property value. *Environ. Pollut.* 137, 263-272.
- Rawer-Jost, C., Blank, J., Rahmann, H., 2000. Macroinvertebrate functional feeding group methods in ecological assessment. *Hydrobiologia* 422/423, 225-232.
- Reinert, K.H., Giddings, J.M., Judd, L., 2002. Effects analysis of time-varying or repeated exposures in aquatic ecological risk assessment of agrochemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1977-1992.
- Reynaldi, S., Liess, M., 2005. Influence of duration of exposure to the pyrethroid fenvalerate on sublethal responses and recovery of *Daphnia magna* Straus. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1160-1164.
- Roux, A.L., 1970. Les gammares du groupe pulex. Essai de systématique biologique – 1. Etude morphologique et morphodynamique. PhD Thesis. Université de Lyon, 1–172.

- Schrimppff, E., Foeckler, F., 1985. Gammarids in streams of northeastern Bavaria, F.R.G. I. Prediction of their general occurrence by selected hydrochemical variables. *Arch. Hydrobiol.* 103, 479-495.
- Schulz, R., Liess, M., 1999b. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. *Aquat. Toxicol.* 46, 155-176.
- Schulz, R., Liess, M., 2001a. Acute and chronic effects of particle-associated fenvalerate on stream macroinvertebrates : a runoff simulation study using outdoor microcosms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 481-488.
- Schulz, R., Liess, M., 2001b. Runoff simulation with particle-bound fenvalerate in multispecies stream microcosms : importance of biological interactions. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 757-762.
- Sherratt, T.N., Roberts, G., Williams, P., Whitfield, M., Biggs, J., Shillabeer, N., Maund, S.J., 1999. A life-history approach to predicting the recovery of aquatic invertebrate populations after exposure to xenobiotic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 2512-2518.
- Sibley, P.K., Kaushik, N.K., Kreuzweiser, D.P., 1991. Impact of a pulse application of permethrin on the macroinvertebrate community of a headwater stream. *Environ. Pollut.* 70, 35-55.
- Soetaert, A., Moens, L.N., Van der Ven, K., Van Leemput, K., Blust, R., De Coen, W.M., 2005. Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.*, 142, 66-76.
- Sutcliffe, D.W., 1992. Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): basic processes. *Freshwater Forum* 2, 102-128.
- Thiere, G., Schulz, R., 2004. Runoff-related agricultural impact in relation to macroinvertebrate communities of the Lourens River, South Africa. *Wat. Res.* 38, 3092-3102.
- Veerasingham, M., Crane, M., 1992. Impact of farm waste on freshwater invertebrate abundance and the feeding rate of *Gammarus pulex* L. *Chemosphere* 25, 869-874.
- Wallace, J.B., Lughart, G.J., Cuffney, T.T., Schurr, G.A., 1989. The impact of repeated insecticidal treatments on drift and benthos of a headwater stream. *Hydrobiologia* 179, 135-147.
- Welton, J.S., 1979. Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream. *Freshwater Biol.* 9, 263-275.
- Welton, J.S., Clarke, R.T., 1980. Laboratory studies on the reproduction and growth of the amphipod *Gammarus pulex* L.. *J. Anim. Ecol.* 49, 581-592.
- Van Wijngaarden, R.P.A., Cuppen, J.G.M., Arts, G.H.P., Crum, S.J.H., Van den Hoorn, M.W., Van den Brink, P.J., Brock, T.C.M., 2004. Aquatic risk assessment of a realistic exposure to pesticides used in bulb crops: a microcosm study. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1479-1498.
- Wogram, J., Liess, M., 2001. Rank ordering of macroinvertebrate species sensitivity to toxic compounds by comparison with that of *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 360-367.
- Zhao, Y., Newman, M.C., 2006. Effects of exposure duration and recovery time during pulsed exposures. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1298-1304.
- Zhu, H., Selim, H.M., 2002a. Retention and mobility of deltamethrin in soils: 1. Adsorption-desorption. *Soil Science* 167, pp. 513-523.

c) Synthèse et conclusions de l'étude

La population de *G. pulex* a été fortement altérée par l'aire de traitement, en particulier vis-à-vis de sa densité et de la structure de la population. L'hypothèse d'un comportement d'évitement des zones les plus contaminées particulier aux adultes a été notamment avancée. En outre, la micro-distribution entre les types de substrats prélevés ainsi que le cycle de développement de la population, avec notamment un raccourcissement de la durée de la première période d'éclosion, ont été modifiés entre l'amont et l'aval des installations de traitement. L'aire de traitement du bois engendre donc une réduction des effectifs, une altération de la structure et du cycle de développement de la population, et très vraisemblablement une modification du comportement de certains individus. Des fluctuations saisonnières de ces perturbations ont été observées, avec en particulier une augmentation de l'amplitude de l'impact corrélée à la hausse des températures de l'eau en été. La distance depuis l'aire de traitement influe aussi sur les modalités de cet impact. Ainsi, la population subit une réduction importante de ses effectifs jusqu'à au moins 2 km à l'aval de l'aire de traitement, cette réduction étant particulièrement drastique les premières centaines de mètres.

Par conséquent, malgré sa forte mobilité et son grand potentiel de recolonisation (Dedecker *et al.* 2006), une population de *G. pulex* est susceptible d'être fortement et durablement altérée suite à une contamination par des pesticides. Ces observations semblent contradictoires avec celles indiquant une altération seulement transitoire de ces organismes (Crossland *et al.* 1982 ; Heckmann et Friberg 2005). Les différents types d'exposition aux pesticides entre ces études sont probablement à l'origine de ces différences de réponse. Ainsi, une contamination brève, unique et transitoire, comme dans certains mésocosmes ou dans le cadre d'un traitement agricole ponctuel (Crossland *et al.* 1982 ; Heckmann et Friberg 2005), sera plus favorable à une recolonisation à moyen terme par *G. pulex* (Ashauer *et al.* 2007). En revanche, la relative constance d'impact observé dans la présente étude est vraisemblablement liée à la récurrence de la contamination du milieu aquatique par les produits de traitement du bois, ce qui est corroboré avec les résultats obtenus précédemment (chapitre II.2.2).

Cette étude a donc montré que les populations de *G. pulex* soumises à une contamination récurrente par des produits de préservation du bois sont susceptibles d'être fortement et durablement altérées, et, par conséquent qu'une évaluation pertinente du risque doit impérativement tenir compte des variations de cet impact en lien avec l'exposition réelle des organismes aux contaminants.

III.2 Vers le développement d'une méthode de bioindication des perturbations engendrées par les aires de traitement du bois sur les invertébrés aquatiques

L'étude précédente a permis l'évaluation des perturbations engendrées par une aire de traitement du bois sur une population de *G. pulex*, en particulier en faisant état des variations spatiales et temporelles de cet impact. Une des perspectives que doit permettre la présente approche hydro-écologique est de contribuer au développement d'une méthode bioindicatrice utilisant *G. pulex* et *G. fossarum* (espèces autochtones des eaux douces françaises). Par conséquent, les réponses de *G. fossarum* doivent également être évaluées lorsque cette espèce est soumise aux pressions environnementales exercées par une aire de traitement du bois.

En outre, deux méthodes bioindicatrices complémentaires par le type d'informations qu'elles apportent, l'une dite « passive » et l'autre « active », seront testées. Ainsi, par son approche holistique *a posteriori* (Ramade 2007), cette démarche vise aussi à contribuer à une meilleure compréhension des processus conduisant à l'altération des populations de ces crustacés.

La pertinence du choix de ces deux espèces de crustacés à des fins bioindicatrices doit être confirmée, notamment par l'évaluation des perturbations concomitantes engendrées sur les autres taxons macrobenthiques. En outre, les possibilités de co-indications doivent être évaluées. Ainsi, les altérations engendrées par une aire de traitement du bois à l'échelle de la communauté macrobenthique, et sur une population d'*Elmis aenea* (Insecta, Coleoptera) en particulier, ont été observées parallèlement aux mesures réalisées chez les deux espèces de gammares étudiées.

III.2.1. Altération d'une population de *G. fossarum* par une aire de traitement

a) Introduction

Les informations relatives à la sensibilité *in natura* de populations de *G. fossarum* aux pesticides sont encore moins documentées que pour *G. pulex*. Les réponses de cette autre espèce de *Gammarus sp.* autochtone des eaux douces françaises doivent donc être évaluées afin de vérifier si ces deux espèces sont ou non équivalentes pour évaluer l'impact d'aires de traitement du bois.

Les observations relatives à l'impact des produits de traitement du bois précédemment exposées ont été obtenues à l'échelle de la population et en conditions naturelles. La mise en place en parallèle d'une approche réalisée à l'échelle de l'individu et en conditions semi-contrôlées est ainsi susceptible de participer à une meilleure compréhension des processus conduisant à l'altération des populations (Schulz et Liess 1999a).

L'étude entreprise vise à comparer les réponses *in natura* d'une population de *G. fossarum* soumise à une contamination par des produits de traitement du bois à des taux de mortalité simultanément observés dans des bioessais (cages) implantés *in situ*. L'influence du régime pluviométrique sur l'amplitude de l'impact a aussi été évaluée dans cette étude. Ce dispositif vise, d'une part, à évaluer si la réponse *in natura* des adultes est liée essentiellement à des effets létaux ou sub-létaux, et, d'autre part, à comparer la pertinence des deux approches bioindicatrices utilisées (passive et active).

b). Etude

Les auteurs de l'article suivant (en préparation) sont Olivier Adam, Benjamin Bulle, François Degiorgi, Gregorio Crini, Pierre-Marie Badot.

Field effect of a pesticide mixture on a *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) population

Abstract

The disturbance of a *Gammarus fossarum* (K.) population exposed to a wood preservative contamination was assessed in two downstream sites of a wood treatment area and compared to an upstream site. Two complementary approaches were used: an active biomonitoring with caged organisms exposed *in situ* and a passive biomonitoring by sampling the population *in natura*. Highest mortality rates of caged organisms were recorded in the most contaminated site, this effect being observed rather after repeated rainfall events than after a single heavy rainfall event. However, the impact on population densities occurred even at very low pesticide concentrations and, as a consequence, it was more severe than predicted by these *in situ* bioassays. Thus, *in natura* response of adult *G. fossarum* to the wood preservative contamination was mainly related to sub-lethal responses occurring in the field. The present study has shown that this sublethal impact process was highly sensitive in the field, leading to a severe and long-lasting alteration of the population.

Keywords: wood preservatives, biomonitoring, impact, *in situ* bioassay, cage, field population

1. Introduction

Gammarus fossarum (K.) is widely distributed in Europe and it can be found in high densities in several types of habitats (Obrdlik, 1972; Karaman and Pinkster, 1977; Janetzky, 1994; Zivic et Markovic, 2007). As detritus feeder, gammarids play an important role in nutrient cycling in freshwater systems (Welton, 1979; Rawer-Jost et al., 2000). For instance, *G. pulex* is likely to process up to 13% of total litter input in low order systems (McNeil et al., 1997). As predator of other invertebrate species, it could have a strong structuring role in many aquatic communities composition (McNeil et al., 1997; Kelly et al., 2002). Furthermore, *Gammarus sp.* is among the most prey items eaten by many fish species (Maitland, 1966; Bollache et al., 2006). Then, as observed for *G. pulex* (Welton, 1979; McNeil et al., 1997; Savage, 2000), *G. fossarum* could have a structural and functional key role in numerous aquatic ecosystems. Numerous headwater streams, i.e. typical habitat of *G. fossarum*, being contaminated by pesticides (Kreuger, 1998; Neumann et al., 2002 and 2003a; Berenzen et al., 2005a; Liess and Van der Ohe, 2005) and the life cycle of this amphipod being entirely

aquatic, numerous *G. fossarum* populations are likely exposed to pesticides. Therefore, impact of such exposures on these populations must be documented and assessed.

Several ecotoxicological studies have demonstrated in controlled conditions that *Gammarus spp.* are among the most sensitive freshwater invertebrates to a wide range of contaminants (Mian and Mulla, 1992; Cold and Forbes, 2004; Van Wijngaarden et al., 2004). Nevertheless, the ecological relevance of these studies remains widely unknown (Wogram and Liess, 2001). ‘Planted’ systems, e.g. caged invertebrates, and use of a relevant reference site, enhance chance of causally associating a particular change in a system with particular environmental variables (Calow, 1989; Chappie and Burton, 2000). Then, numerous studies have assessed response of caged freshwater *Gammarus sp.* to toxic substances (Chappie and Burton, 2000). Nevertheless, only a few of them have characterized field relevance of their observations, and, to our knowledge, only one study has also causally associated measured effect with characterized contaminants (Schulz and Liess, 1999a; Tab. III.2).

Despite an *in situ* exposure, these caging experiments were not expected to provide complete and natural interactions with their environment (Chappie and Burton, 2000). For instance, long term effects and some natural behaviour, like active and passive drifts, are not integrated by an active biomonitoring. Therefore, the major problem of this type of experimental design is the relevance of responses within planted systems to the ‘natural’ ecosystems surrounding them (Calow, 1989). Then, Schulz and Liess (1999a) concluded that if *in situ* bioassays permit a better detection of contaminated runoff inputs, field studies were necessary for a better ecological understanding of the results.

This study investigates for the first time a field response of *G. fossarum* to a pesticide contamination. It aimed to document the impact by comparing response at the population level, i.e. field densities, and response at the individual level, i.e. mortality in *in situ* bioassays. Upstream/downstream comparisons were made around a wood treatment area using pyrethroid insecticides, triazole fungicides and a carbamate fungicide. Experiments were performed in two contrasted precipitation regimes to observe modification of this impact.

Contaminant	Quantification	Caged species	Endpoint	Field validation	Reference
Sewer discharge	Yes (metals)	<i>G. pulex</i>	Mortality Bioaccumulation	Not studied	Bascombe et al., 1990
Industrial and domestic wastes	Yes (metals)	<i>G. pulex</i>	Mortality Feeding rate	Not studied	Crane and Maltby, 1991
Farm waste	No	<i>G. pulex</i>	Feeding rate	Yes	Veerasingham and Crane, 1992
Carbofuran	Yes	<i>G. pulex</i>	Feeding rate	Not studied	Matthiessen et al., 1995
Malathion 60	No	<i>G. pulex</i>	Mortality Feeding rate Achase activity	Not studied	Crane et al., 1995a
Agricultural catchment discharge	Yes (ND)	<i>G. pulex</i>	Mortality Feeding rate	Yes	Crane et al., 1995b
Urban discharges	Yes (metals)	<i>G. pulex</i>	Mortality Bioaccumulation	Not studied	Mulliss et al., 1996a and b
Fenvalerate	Yes	<i>G. pulex</i>	Mortality	Yes	Schulz and Liess, 1999a
Parathion-ethyl					
Urban runoff	Yes (metals)	<i>G. minus</i>	Mortality Bioaccumulation	Not studied	Lieb and Carline, 2000
Motorway discharge	Yes (metals)	<i>G. pulex</i>	Feeding rate	Not studied	Forrow and Maltby, 2000
Several discharge types	No	<i>G. pulex</i>	Feeding rate	Yes	Maltby et al., 2002
Landfill discharge	No	<i>G. pulex</i>	Mortality Feeding rate	Not studied	Bloor and Banks, 2006

Table III.2. An overview of selected studies monitoring field impact of discharges using in situ bioassays with caged *Gammarus species*. The column 'Field validation' indicates if relationship between caged individuals and autochthonous population was assessed. ND: chemical not detected.

2. Materials and methods

2.1. Study area, sampling sites, and environmental measurements

The investigation was carried out in the *Drésine* in Jura Mountain, France. This is a medium range stream that take its source at 1 000 m of altitude and flows 7 100 meters later into the *Remoray* lake at 850 m of altitude. This is a small size stream (about 1.5 m wide and 0.02 m deep) with an average discharge of the medium stream being likely to decrease to 69 L.s⁻¹ in summer.

The reference site (site 1) was implanted in the upstream (100 meters) of a wood treatment area. The first downstream studied site (site 2) was located about 400 meters in the downstream of the treatment area, and the third studied site (site 3) was established about 2 000 meters in the treatment area downstream. Morphological structure of the streambed was similar between the three experimental sites. Hillsides being mainly covered by woods and pastures, and no tributary running in this area, the only source of pesticide contamination between the three studied sites was the wood treatment area (Fig. III.10).

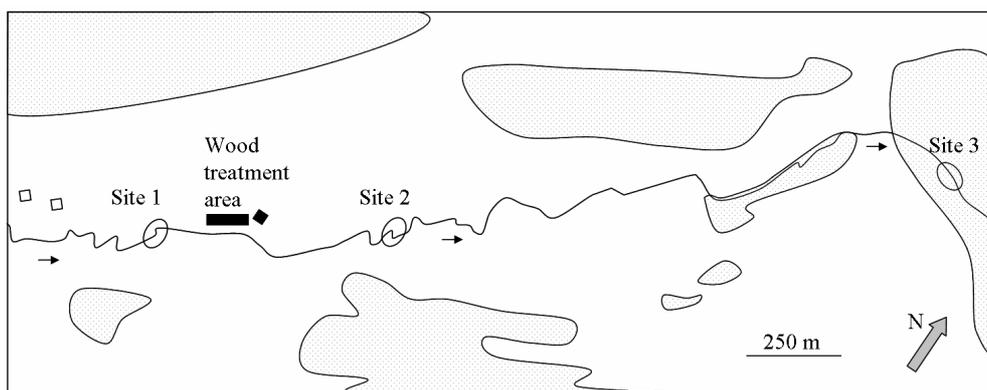


Figure III.10. Study area and localisation of the three sampling sites (ellipses) on *Drésine* (black curve), the wood treatment area (black rectangle), and dwellings (white rectangle). Wood cover is indicated by grey areas and pastures by the white area.

Water temperature, pH, conductivity, and dissolved oxygen concentration were measured by WTM Sentix 41-3[®] in each site at both sampling periods. Daily precipitation levels were provided by Météo France[®] for the four weeks before sampling and throughout both weeks of cage exposure.

2.2. Wood treatment and sediment contamination

Freshly sawed resinous wood is immersed in a bath containing a pesticide mixture and is left to dry in the vicinity. The active substances used in the wood treatment area were cypermethrin and deltamethrin (pyrethroid insecticides), propiconazole and tebuconazole (triazole fungicides), and IPBC (carbamate fungicide). The sawmill treated wood every day (except week-ends) and all over the year (except in August). The studied treatment area was established at about 30 meters of the *Drésine* (Fig. III.10).

Wood preservatives being hydrophobic pesticides, the aquatic contamination was assessed by measuring their concentration in the sediment compartment. Eight replicates of sediment were sampled in each experimental site within the first invertebrate sampling period, i.e. on June 29, and three replicates of sediment were sampled within the second invertebrate sampling period, i.e. on October 11. Then sediment samples were frozen at -25°C before laboratory analyzing.

Pesticide concentration in sediment was measured at the Central Environmental Analytical Laboratory, Institute of Environmental Science and Technology, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland. A 20 g dry weight (dw) aliquot of each sample was firstly extracted by ultrasonics and secondly by a liquid-liquid partition. The first

purification step was obtained by a gel permeation chromatography (Supelco Z21 775-1[®] column, Phase Bio-Beads S-X3[®]) and the second step used columns of 10 g of magnesium silicate (Florisol[®] 100-200 mesh deactivated at 2%). A last purification step on silicate gel column (5 g of SG40[®], 70-230 mesh, Merck 10180[®]) was necessary for triazole fungicides. Measurements of triazole fungicides were made with HPLC/DAD (Hewlett Packard 1050[®], Agilent technology, Urdof, Switzerland) equipped with a C18 analytical column (250mm x 4.6 mm i.d., 5 µm, 300 Å, Vydac 201TP54[®]) protected by a pre-column (2 cm x 4.6 mm i.d., 40µm, Cartouche PelliguardTM LC-18 Supelco[®]). Pyrethroids measurements were performed by a gaz chromatograph (GC Varian CP-3800[®]) coupled with an electron capture detector and equipped with a DB-5 analytical column (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm). Measurements of IPBC were performed by a gaz chromatograph (CG Hewlett Packard HP 5890[®]) coupled with a mass spectrometry detector (Hewlett Packard 5971A[®]) and equipped with a DB-5MS analytical column (50 m x 0.2 mm x 0.33 µm). The detection limit was 0.33, 0.72, 0.64, 3.25 and 2.70 µg.kg⁻¹ dw of sediment for cypermethrin, deltamethrin, IPBC, propiconazole and tébuconazole respectively. A GC-MS scan (CG Hewlett Packard HP 5890[®], DB-5MS analytical column 50 m x 0.2 mm x 0.33 µm) was performed on sediment removed from each experimental site to detect possible presence of other organic contaminants.

2.3. *In situ* bioassays

In situ experiments were performed using the epibenthic amphipod species *Gammarus fossarum* (Koch, 1836) as test organism. Individuals used in the exposure were previously collected from the indigenous population in an uncontaminated site from the upper section of the *Drésine*, at about 100 meters from the source.

Adult animals (>7 mm) were allocated in individual cages made from short sections (10 cm) of 100-mm diameter PVC tubing with ends covered by 1mm-mesh. A substratum was installed inside each cage to shelter individuals from high flows. Two rows of 4 exposure cages, i.e. 8 cages, containing each 10 individuals were placed throughout the streambed width in each experimental site. The first exposure period occurred from June 29 to July 13, and the second exposure period occurred from October 11 to October 25. Mortality rates were recorded in each cage at the end of these 15 days of *in situ* exposure.

2.4. Population sampling, identification and French standard biotic index (IBGN)

A Surber sampler with 0.5 mm mesh bag and quadrat area of 1/20th m² was used to take three replicates of the three main stream substrates: bryophyte (*Fontinalis sp.*), litter, and gravel (2

mm – 20 mm). Similar current speeds and depths were sampled in each site. Samples were preserved in 10% formaldehyde. Animals were handly separated from samples, then identified, counted and finally preserved in 50% ethanol. Like for sediment, macro-invertebrates were sampled on June 29 and October 11, when starting exposure of caged organisms.

Gammarids were examined using a Wild M3B microscope (Leica) with a magnification up to 40x. The *Gammarus* species was identified as *G. fossarum* (K.). Population composition was determined for each sample. Individuals were ranged into three size categories: juveniles (< 3 mm), immature (3-7 mm), and adults (> 7 mm) as assumed by Roux (1970).

The French standard biotic index (IBGN, Norm NFT 90-350) is based onto the macro-invertebrate community composition and it gives a value (0-20) informing onto the global biologic quality of the aquatic environment. It was calculated in sites 1 and 2 from samples of October 11. Like for *G. fossarum*, samples were preserved in 10% formaldehyde, and macro-invertebrates were separated by hand, then identified, counted and finally preserved in 50% ethanol.

2.5. Statistical analysis

Normality of data distribution being not observed (Hilliefors' tests), Wilcoxon-Mann-Whitney and Kruskal-Wallis non parametric tests were used. Data tested were the concentration of detected pesticides in sediment samples (n=8 in June 29, n=3 in October 11), mortality rate obtained in each cage replicate (n=8), and population abundance in the field samples (n=9). Statistical analysis was performed on R 2.2.0 (R development Core Team 2005).

3. Results

3.1 Environmental conditions

Physical conditions measured were close between the three experimental sites and between sampling dates despite slight colder water temperatures recorded in the second sampling campaign (Tab. III.3).

None of the five active substances used in the treatment area was detected in site 1, except in one sample from the first campaign that was contaminated with a slight concentration of propiconazole (Tab. III.4). Both downstream experimental sites were contaminated by

cypermethrin, tebuconazole and propiconazole whereas deltamethrin and IPBC have not been detected. Highest pesticide concentrations were recorded in site 2 while contamination was only slightly beyond detection limits in site 3 (Tab. III.4).

Parameters	June 29			October 11		
	Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3
Width (m)	1.5	1.1	1.9	1.6	1.2	2
Depth max (cm)	24	18	20	32	24	22
Conductivity ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	483	485	467	468	470	459
Dissolved oxygen ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	9.17	9.13	9.64	9.21	9.18	9.54
Saturation in oxygen (%)	94.1	98.2	103.5	95.3	95.0	99.4
Water temperature ($^{\circ}\text{C}$)	11.7	12.3	13.7	9.5	10.1	11.2
pH	7.30	7.55	7.84	7.45	7.45	7.61

Table III.3. Ecological characteristics of *Drésine* in the three experimental sites at both sampling dates.

This difference of sediment contamination by pesticides between sites was significant for the both sampling dates ($p=0.005$ in June 29; $p=0.001$ in October 11). However, no significant difference of sediment contamination was observed between these both campaigns. Scans from GC-MS have not detected the presence of another organic contaminant in any site.

Chemicals	N° CAS	June 29			October 11		
		Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3
Cypermethrin	52315-07-8	ND	6.3 ± 5.0	0.9 ± 0.5	ND	10.6 ± 8.1	0.8 ± 0.2
Deltamethrin	52918-63-5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IPBC	55406-53-6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tebuconazole	107534-96-3	ND	0.4 ± 2.1	ND	ND	6.5 ± 5.7	1.7 ± 3.0
Propiconazole	60207-90-1	2.0 ± 3.9	6.8 ± 4.9	2.2 ± 3.1	ND	16.6 ± 19.6	7.2 ± 12.5

Table III.4. Sediment contamination ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dw) of active substances used in the wood treatment area (not detected, ND). Values are indicated by the mean of the replicates \pm standard error.

The first sediment sampling was performed 4 days after an isolated storm event (64.2 mm). Cumulated precipitations of 93.1 mm were recorded in the 28 days previous this sampling. Only low precipitations were recorded along the 15 days of cage exposure (3.0 mm, Fig. III.11a). The second sediment sampling was performed after recurrent autumnal precipitations: 154.9 mm of cumulated precipitations were recorded in the 28 days previous

this second sampling date. Slight precipitations were recorded along 6 days in the second week of cage exposure (44.8 mm, Fig. III.11b).

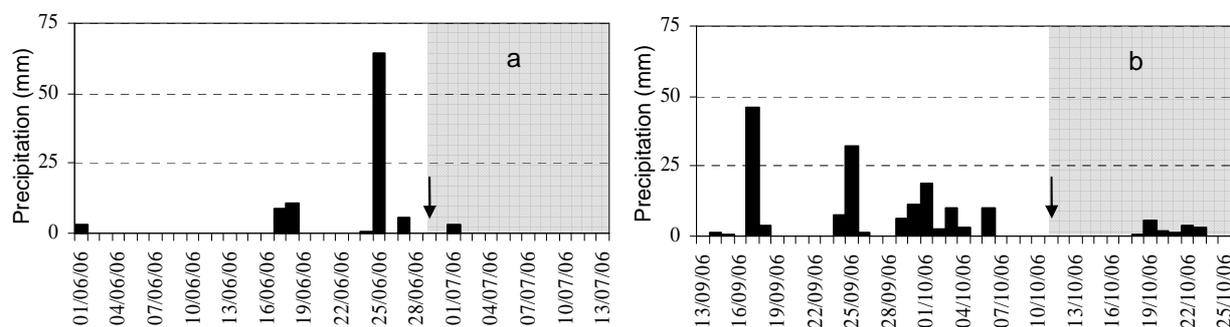


Figure III.11. Precipitation (mm) in the four weeks before samplings (arrows) and in the two weeks of cage exposure (grey areas). First sampling was performed the 29th June 2006 (a), and the second one was performed the 11th October 2006 (b).

3.2. Population densities and French standard biotic index (IBGN)

IBGN calculated from the second sampling date was 14/20 and 11/20 in respectively site 1 and 2 (Tab. III.5).

G. fossarum population sampled in the upstream site (site 1) was mainly composed by juveniles (individuals <3 mm) in the first sampling period (29th June 2006). Individuals in maturation (between 3 mm and 7 mm) composed the main developmental stage in the population sampled in the second campaign (11th October 2006). The adult (individuals > 7 mm) ratio among the overall population was 2.1% and 3.8% in respectively the first and the second sampling date (Tab. III.5).

Sampling date	Size category	Site1	Site2	Site3
29 th June 2006	<3mm	2551.8 ± 882.1	2.2 ± 3.9	0.0 ± 0.0
	3-7mm	692.0 ± 224.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	>7mm	69.6 ± 54.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
11 th October 2006	<3mm	755.6 ± 261.8	0.0 ± 0.0	22.2 ± 39.1
	3-7mm	1266.7 ± 643.7	2.2 ± 3.9	15.6 ± 16.8
	>7mm	80.0 ± 64.3	0.0 ± 0.0	2.2 ± 3.9
	IBGN	14/20	11/20	

Table III.5. Average densities (ind.m⁻²) ± standard deviation of three size categories of *Gammarus fossarum* sampled in bryophyte settlement from site 1, site 2, and site 3 in the both studied periods (n=3). Notes of French standard biotic index (IBGN) obtained in site 1 and 2 from samples of October 11 are indicated in the bottom of the table.

Population densities were severely reduced in the downstream of the treatment area. Samples from the first campaign contained only one juvenile inside site 2 and no individual was found in samples from site 3. Only one immature individual was recorded in samples from site 2 in

the second campaign. A slight but significant densities recovery was observed in site 3 at this second date: it represented only 1.9% of the upstream population abundance ($p = 0.004$). No difference of response was observed between the three developmental stages in both impacted sites, all of them being severely impacted (Tab. III.5).

3.3 Caged organisms

Slight mortality was observed in caged adults exposed in site 1: 17% and 27% of individuals died in the 15 days of exposure in respectively the first and the second exposure periods. In the first exposure period, survival rates measured in cages were not significantly different between the three experimental sites (Fig. III.12a). In the second exposure period, survival rates occurring in site 2 were significantly lower than those registered in site 1 ($p = 0.015$). In site 3, despite a lower survival rate than in site 1 and a higher survival rate than in site 2, no significant difference was observed between the experimental sites (Fig. III.12b).

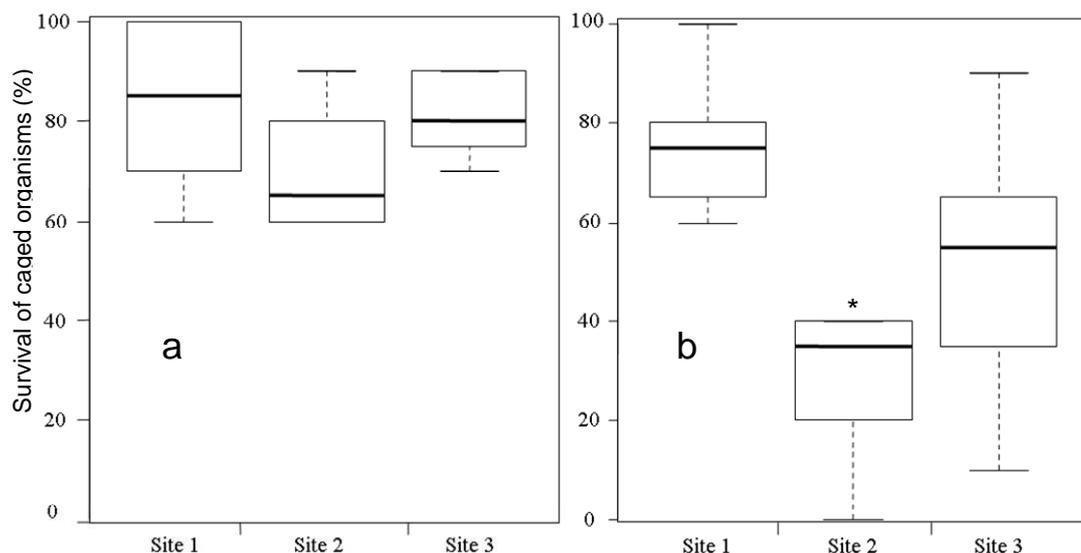


Figure III.12. Mortality of caged *G. fossarum* adults (%) after 15 days of exposure in site 1, 2 and 3 in the first (a, 29th June – 13th July) and the second studied periods (b, 11th October – 25th October). The medians are indicated by horizontal lines, 25% and 75% quartiles are indicated by boxes, and error bars presenting standard deviation, $n=8$. *: p value < 0.05 ; Wilcoxon test between site 1 and site 2.

4. Discussion

In natura and *in situ* studies required use of a relevant reference site for upstream/downstream comparisons (Callow, 1989). Therefore, the relevance of site 1 as reference site should be first of all verified.

No chemical was detected in the upstream sediment except a low propiconazole concentration in one sample. This fungicide being very poorly acute toxic for *Gammarus* spp. (Baekken and Aanes, 1991; Meliyan, 1991), slight mortalities recorded in cages exposed in the upstream site were very probably not related to a wood preservative contamination. Furthermore, similar mortalities were observed in previous studies when exposing *G. pulex* in reference sites (Crane et al., 1995b; Schulz and Liess, 1999a). Thus, we cannot conclude to a disturbance related to a pesticide contamination of the *G. fossarum* caged in the upstream treatment area.

Densities of *G. fossarum* population measured *in natura* in the upstream site were similar to those observed in undisturbed sites from previous field studies (Rosillon, 1985; Ladewig et al., 2006). In a same way, the evolution of population structure between both sampling periods corresponded to the natural life cycle of *G. fossarum*: a recruitment of juveniles (< 3 mm) occurred in spring and their maturation (3-7 mm) took place in autumn (Obrdlik, 1972). Therefore, like for caged organisms, field population living in the upstream site appeared not altered in site 1 at both experimental periods.

The environmental parameters registered in this study were similar between experimental sites, except wood preservative contamination. Thus, the values of these parameters being in accordance with *G. fossarum* living (Schrimppf and Foeckler, 1985), and no alteration of caged and field organisms being observed in the upstream, site 1 could be considered as a suitable reference site for upstream/downstream comparisons.

Whatever the experimental period considered, a decrease of sediment contamination by wood preservatives was observed by increasing distance in the downstream of the treatment area. Pesticide concentrations found in the most contaminated experimental site, i.e. site 2, were in accordance with contamination data from several aquatic environments previously studied (Long et al., 1998). Thus, wood preservative concentration in sediment from site 3 being lower than these ordinary concentrations and being close to the analytical detection limit, this experimental site could be considered as being lightly contaminated. However, severe decreases of *G. fossarum* densities were recorded in both downstream sites, even when low pesticide concentrations occurred. No toxicological data relative on *G. fossarum* sensitivity to pesticides used in the treatment area was found in literature. Nevertheless, cypermethrin (pyrethroid insecticide) is very highly toxic for aquatic organisms like amphipods. For instance, its 96 h - LC50 for *G. pulex* is 0.06-0.13 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Stephenson, 1982; Shires, 1983). 96 h - LC50 of tebuconazole is 1.64 mg.L^{-1} for *G. pulex* (Adam et al., 2006), and 96 h - LC50 of propiconazole is 1.30 and 1.80 mg.L^{-1} for *G. lacustris* and *G. kischineffensis* (Baekken and

Aanes, 1991; Meliyan, 1991). Thus, propiconazole and tebuconazole (triazole fungicides) were less acutely lethal for *Gammarus sp.* than cypermethrin. Furthermore, synergism between these pesticides has been likely to occur between this insecticide and triazole fungicides (Adam et al., 2006).

Adverse effects being related to the details of exposure regimes, *Gammarus sp.* populations are expected to rapidly colonize impacted sites after a single pesticide input event and to remain highly impacted when recurrent pulses of pesticides occurred (Barntouse, 2004; Forbes and Cold, 2005; Heckmann and Friberg, 2005; Reynaldi and Liess, 2005; Zhao and Newman, 2006; Ashauer et al., 2007). Therefore, the absence of population recovery and the sediment contamination observed in both summer and autumnal measurements suggested that recurrent pulse exposures to pesticides occurred, causing severe and long-lasting impairment of the *G. fossarum* population.

As expected, mortality rates observed in exposed cages were higher in the most contaminated site. Nevertheless, the survival rate decrease of caged adults measured in the downstream of the treatment area was not proportional to the *in natura* densities decrease observed. Thus, the absence of adults in the population sampled in the downstream could not be only explained by an acute lethal effect. Therefore, the high impact of the treatment area on adults from the studied *G. fossarum* population resulted at least partly from sublethal responses. For instance, reproduction of *G. kischineffensis* and crustacean embryonic development have been reported to be affected by propiconazole (Meliyan, 1991; Kast-Hutcheson et al., 2001; Soetaert et al., 2006). Furthermore, the sediment contamination could have caused a modification of *Gammarus sp.* behaviour like an active avoidance of contaminated sites (De Lange et al., 2005 and 2006).

For a similar sediment contamination, mortality of caged organisms was higher in the second exposure period than in the first one. Thus, adverse effect measured in cages was not directly related to the level of sediment contamination. Caged organisms being mainly exposed to the aqueous media and being not directly in contact with the contaminated sediment, a modification of the pesticide bioavailability between these both periods could be suspected. For instance, phase distribution equilibrium of cypermethrin between freshwater and sediment pesticide being time-dependant (Bondarenko et al., 2006), repeated agitation of freshwater sediment after several rainfall events could have partly maintained this pesticide dissolved in

the aqueous phase, i.e. where this molecule is more available for amphipods (Maund et al., 2002).

Variability between cage replicates was too high for observing a significant slight effect. Furthermore, contrary to observations from exposed cages, field responses of *G. fossarum* were severe with drastic collapses of measured densities in both downstream sites and at both studied periods. Therefore, *in situ* bioassays alone were not sufficient for a relevant ecological interpretation of the results. Nevertheless, cage exposure observations could be informative on disturbance mechanism by comparing these results with field responses (Schulz and Liess, 1999a).

The French standard biotic index (IBGN) moderately decreased between the upstream (site 1) and the most contaminated site (site 2). Thus, the structure of the macro-invertebrate community was modified, but not as drastically as the *G. fossarum* population. This could be related to the high physiological sensitivity of *Gammarus* spp. to pesticides comparing to other macro-invertebrate species (Helson and Surgeoner, 1986; Mian and Mulla, 1992; Schulz and Liess, 1999b; Wogram and Liess, 2001; Cold and Forbes, 2004; Van Wijngaarden et al., 2004; Bloor et al., 2005). Therefore, *Gammarus fossarum* can be considered, at least in this study, as a sentinel organism to detect impairment of the aquatic macro-invertebrate community by the pesticide contamination.

In conclusion, both active and passive biomonitoring approaches were necessary and complementary for a relevant ecological interpretation of the pesticide impact on *G. fossarum*. Then, this study has shown that the wood preservative contamination caused a severe impact on adult *G. fossarum* and that the high population sensitivity was related at least partly to a sub-lethal response. As a consequence, and because of the sentinel role of *G. fossarum*, the population biomonitoring of this species could be a valuable tool for the impact assessment of a wood preservative contamination.

Acknowledgement – The authors are indebted to Agence de l’Eau Rhône, Méditerranée et Corse for financial support. Olivier Adam is indebted to Conseil Régional de Franche-Comté for PhD fellowship. Benjamin Bulle is grateful acknowledged for valuable technical assistance. The authors are greatly indebted to Dr Luiz Felipe de Alencastro, Dominique Granjean and Capucine Robert from EPFL, Lausanne, Switzerland, for their help in sediment samples analysis.

References

- Adam, O., Degiorgi, F., Crini, G., Badot, P-M., November 2006. Pesticide mixture toxicity on *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea, Amphipoda). 27th annual meeting of SETAC North America, Montréal, Canada.
- Ashauer, R., Boxall, A.B.A., Brown, C.D., 2007. New ecotoxicological model to simulate survival of aquatic invertebrates after exposure to fluctuating and sequential pulses of pesticides. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1480-1486.
- Baekken, T., Aanes, K.J., 1991. Pesticides in Norwegian agriculture. Their effects on benthic fauna in lotic environments. Preliminary results. *Int. Assoc. Theor. Appl. Limnol. Proc.* 24, 2277-2281.
- Barnthouse, L.W., 2004. Quantifying population recovery rates for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 500-508.
- Bascombe, A.D., Ellis, J.B., Revitt, D.M., Shutes, R.B.E., 1990. The development of ecotoxicological criteria on urban catchments. *Water Science and Technology* 22, 173-179.
- Berenzen, N., Lentzen-Gogging, A, Probst, M., Schulz, H., Schulz, R., Liess, M., 2005a. A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticides concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere.* 58, 683-691.
- Bloor, M.C., Banks, C.J., 2006. An evaluation of mixed species *in-situ* and *ex-situ* feeding assays: the altered response of *Asellus aquaticus* and *Gammarus pulex*. *Environ. Int.* 32, 22-27.
- Bollache, L., Kaldonski, N., Troussard, J.P., Lagrue, C., Rigaud, T., 2006. Spines and behaviour as defences against fish predators in an invasive freshwater amphipod. *Anim. Behav.* 72, 627-633.
- Bondarenko, S., Putt, A., Kavanaugh, S., Poletika, N., Gan, J., 2006. Time dependence of phase distribution of pyrethroid insecticides in sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 3148-3154.
- Calow, P., 1989. The choice and implementation of environmental bioassays. *Hydrobiologia* 188/189, 61-64.
- Chappie, D.J., Burton, G.A., 2000. Applications of aquatic and sediment toxicity testing in situ. *Soil Sed. Contam.* 9, 219-245.
- Cold, A., Forbes, V.E., 2004. Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. *Aquat. Toxicol.* 67, 287-299.
- Crane, M., Maltby, L., 1991. The lethal and sublethal responses of *Gammarus pulex* to stress: sensitivity and sources of variation in an *in situ* bioassay. *Environ Toxicol Chem* 10, 1331-1339.
- Crane, M., Delaney, P., Watson, S., Parker, P., Walker, C., 1995a. The effect of Malathion 60 on *Gammarus pulex* (L.) below watercress beds. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1181-1188.
- Crane, M., Delaney, P., Mainstone, C., Clarke, S., 1995b. Measurement by *in situ* bioassay of water quality in an agricultural catchment. *Wat. Res.* 29, 2441-2448.
- Crossland, N.O., Shires, S.W., Bennett, D., 1982. Aquatic toxicology of cypermethrin. III. Fate and biological effects of spray drift deposits in fresh water adjacent to agricultural land. *Aquat. Toxicol.* 2, 253-270.
- De Lange, H.J., Lurling, M., Van Den Borne, B., Peeters, E.T.H.M., 2005. Attraction of the amphipod *Gammarus pulex* to water-borne cues of food. *Hydrobiologia* 544, 19-25.

- De Lange, H.J., Sperber, V., Peeters, E.T.H.M., 2006. Avoidance of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediments by the freshwater invertebrates *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 452-457.
- Forbes, V.E., Cold, A., 2005. Effects on the pyrethroid esfenvalerate on life-cycle traits and population dynamics of *Chironomus riparius* – importance of exposure scenario. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 78-86.
- Forrow, D.M., Maltby, L., 2000. Toward an understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: direct and indirect effects on detritivore feeding. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2100-2106.
- Heckmann, L-H., Friberg, N., 2005. Macroinvertebrate community response to pulse exposure with the insecticide lambda-cyhalothrin using in-stream mesocosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 582-590.
- Helson, B.V., Surgeoner, G.A., 1986. Efficacy of cypermethrin for the control of mosquito larvae and pupae, and impact on non-target organisms, including fish. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2, 269-275.
- Janetzky, W., 1994. Distribution of the genus *Gammarus* (Amphipoda: Gammaridae) in the River Hunte and its tributaries (Lower Saxony, northern Germany). *Hydrobiologia* 294, 23-34.
- Karaman, G.S., Pinkster, S., 1977. Freshwater *Gammarus* species from Europe, north Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda). *Bijdr. Dierk.* 47, 1-97.
- Kast-Hutcheson, K., Rider, C.V., Leblanc, G.A., 2001. The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 502-509.
- Kelly, D.W., Dick, J.T.A., Montgomery, W.I., 2002. The functional role of *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): shredders, predators, or both? *Hydrobiologia* 485, 199-203.
- Kreuger, J., 1998. Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990-1996. *Sci. Total Environ.* 216, 227-251.
- Kreutzweiser, D.P., Kingsbury, P.D., Feng, J.C., 1989. Drift response of stream invertebrates to aerial applications of glyphosphate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 331-338.
- Ladewig, V., Jungmann, D., Köhler, H.-R., Schirling, M., Triebkorn, R., Nagel, R., 2006. Population structure and dynamics of *Gammarus fossarum* (Amphipoda) upstream and downstream from effluents of sewage treatment plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 370-383.
- Lieb, D.A., Carline, R.F., 2000. Effects of urban runoff from a detention pond on water quality, temperature and caged *Gammarus minus* (Say) (Amphipoda) in a headwater stream. *Hydrobiologia* 441, 107-116.
- Liess, M., Von Der Ohe, P.C., 2005. Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 954-965.
- Long, J.L.A., House, W.A., Parker, A., Rae, J.E., 1998. Micro-organic compounds associated with sediments in the Humber rivers. *Sci. Tot. Environ.* 200/211, 229-253.
- McNeil, C., Dick, J.T.A., Elwood, R.W., 1997. The trophic ecology of freshwater *Gammarus* (Crustacea : Amphipoda) ; problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biol. Rev* 72, 349-364.
- Maitland, P.S., 1966. Notes on the biology of *Gammarus pulex* in the river Endrick. *Hydrobiologia* 28, 142-152.
- Maltby, L., Clayton, S.A., Wood, R.M., McLoughlin, N., 2002. Evaluation of the *Gammarus pulex in situ* feeding assay as a biomonitor of water quality: robustness, responsiveness, and relevance. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 361-368.

- Matthiessen, P., Sheahan, D., Harrison, R., Kirby, M., Rycroft, R., Turnbull, A., Volkner, C., Williams, R., 1995. Use of a *Gammarus pulex* Bioassay to Measure the Effects of Transient Carbofuran Runoff from Farmland” *Ecotox. Environ. Saf.* 30, 111-119.
- Maund, S.J., Taylor, E.J., Pascoe, D., 1992. Population responses of the freshwater amphipod crustacean *Gammarus pulex* (L.) to copper. *Freshwater Biol.* 28, 29-36.
- Meliyan, R.I., 1991. Effects of pesticides on reproductive function of the freshwater amphipod *Gammarus kischineffensis*. *Hydrobiol. J.* 27, 33-36.
- Mian, L.S., Mulla, M.S., 1992. Effects of pyrethroid insecticides on nontarget invertebrates in aquatic ecosystems. *J. Agric. Entomol.* 9, 73-98.
- Mulliss, R.M., Revitt, D.M., Shutes, R.B.E., 1996a. A statistical approach for the assessment of the toxic influences on *Gammarus pulex* (Amphipoda) and *Asellus aquaticus* (Isopoda) exposed to urban aquatic discharges. *Wat. Res.* 30, 1237-1243.
- Mulliss, R.M., Revitt, D.M., Shutes, R.B.E., 1996b. The determination of the toxic influences to *Gammarus pulex* (amphipoda) caged in urban receiving waters. *Ecotoxicology* 5, 209-215.
- Neumann, M., Schulz, R., Scafer, K., Muller, W., Mannheler, W., Liess, M., 2002. The significance of entry routes as point and non-point sources of pesticides in small streams. *Water Res.* 36, 835-842.
- Neumann, M., Liess, M., Schulz, R., 2003a. A qualitative sampling method for monitoring water quality in temporary channels or point sources and its application to pesticide contamination. *Chemosphere* 51, 509-513.
- Obrdlik, P., 1972. A population of *Rivulogammarus fossarum* Koch (Amphipoda) in a small fishless stream. *Hydrobiologia* 40, 279-295.
- R development Core Team, 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rawer-Jost, C., Blank, J., Rahmann, H., 2000. Macroinvertebrate functional feeding group methods in ecological assessment. *Hydrobiologia* 422/423, 225-232.
- Reynaldi, S., Liess, M., 2005. Influence of duration of exposure to the pyrethroid fenvalerate on sublethal responses and recovery of *Daphnia magna* Straus. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1160-1164.
- Rosillon, D., 1985. Seasonal variations in the benthos of a chalk trout stream, the river Samson, Belgium. *Hydrobiologia* 126, 253-262.
- Roux, A.L., 1970. Les gammares du groupe pulex. Essai de systématique biologique – 1. Etude morphologique et morphodynamique. PhD Thesis. Université de Lyon, 1–172.
- Savage, A.A., 2000. Community structure during a 27-year study of the macroinvertebrate fauna of a chemically unstable lake. *Hydrobiologia* 421, 115-127.
- Schrimpf, E., Foeckler, F., 1985. Gammarids in streams of northeastern Bavaria, F.R.G. I. Prediction of their general occurrence by selected hydrochemical variables. *Arch. Hydrobiol.* 103, 479-495.
- Schulz, R., Liess, M., 1999a. Validity and ecological relevance of an active in situ bioassay using *Gammarus pulex* and *Limnephilus lunatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2243-2250.
- Schulz, R., Liess, M., 1999b. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. *Aquat. Toxicol.* 46, 155-176.

- Schulz, R., Liess, M., 2001a. Acute and chronic effects of particle-associated fenvalerate on stream macroinvertebrates : a runoff simulation study using outdoor microcosms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 481-488.
- Soetaert, A., Moens, L.N., Van der Ven, K., Van Leemput, K., Blust, R., De Coen, W.M., 2005. Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.*, 142, 66-76.
- Sutcliffe, D.W., 1992. Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): basic processes. *Freshwater Forum* 2, 102-128.
- Veerasingham, M., Crane, M., 1992. Impact of farm waste on freshwater invertebrate abundance and the feeding rate of *Gammarus pulex* L.. *Chemosphere* 25, 869-874.
- Welton, J.S., 1979. Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream. *Freshwater Biol.* 9, 263-275.
- Van Wijngaarden, R.P.A., Cuppen, J.G.M., Arts, G.H.P., Crum, S.J.H., Van den Hoorn, M.W., Van den Brink, P.J., Brock, T.C.M., 2004. Aquatic risk assessment of a realistic exposure to pesticides used in bulb crops: a microcosm study. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1479-1498.
- Wogram, J., Liess, M., 2001. Rank ordering of macroinvertebrate species sensitivity to toxic compounds by comparison with that of *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 360-367.
- Zhao, Y., Newman, M.C., 2006. Effects of exposure duration and recovery time during pulsed exposures. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1298-1304.
- Zivic, I., Markovic, Z., 2007. Distribution of the species *Gammarus balcanicus* and *Gammarus fossarum* on the territory of Serbia (central part of the Balkan peninsula). *Crustaceana* 80, 67-76.

c) Conclusions

Cette étude a montré une très forte réponse *in natura* de *G. fossarum*, notamment au niveau de sites contaminés par de faibles concentrations en produits de préservations du bois (quelques ppb dans le sédiment). La complémentarité des approches utilisées (bioindication passive/active, conditions naturelles/semi-contrôlées, échelle populationnelle/individuelle) a permis d'établir que cette forte sensibilité, notamment de la part des adultes, est essentiellement liée à des réponses sub-létales, une mortalité de ces individus n'ayant été observée à court terme qu'après des pluies répétées au niveau des sites les plus contaminés.

Comme ce qui a été précédemment observé pour *G. pulex* (chapitre III.1), les populations de *G. fossarum* sont donc aussi susceptibles d'être fortement et durablement altérées sur de longues distances à l'aval d'aires de traitement du bois.

III.2.2. Etude complémentaire : altération par une aire de traitement du bois de l'ensemble de la communauté macrobenthique et de *Elmis aenea* (Insecta, Coleoptera) en particulier.

Afin de vérifier si les réponses observées chez *G. pulex* et *G. fossarum* sont représentatives de celles des autres invertébrés aquatiques, et d'évaluer la possibilité d'utiliser des taxons co-indicateurs, l'altération de l'ensemble de la communauté des invertébrés aquatiques par une aire de traitement du bois a été documentée. L'influence de la distance ainsi que les variations saisonnières de l'impact ont été évaluées plus particulièrement chez une autre espèce macrobenthique, *Elmis aenea* (Insecta). Cette espèce a été choisie en raison de son appartenance au même ordre (Coleoptera) qu'une partie des organismes cibles du traitement du bois, c'est-à-dire les coléoptères xylophages comme les vrillettes ou les scolytes du bois. A l'image de *G. pulex* et *G. fossarum*, cette espèce a un cycle de vie quasi-exclusivement aquatique l'empêchant d'échapper à des flux de contaminants mêmes transitoires (chapitre I.6.2). De plus, des mesures semi-quantitatives sont réalisables à partir de cette espèce car elle est souvent présente en fortes densités. Toutefois, sur un plan écotoxicologique, ce coléoptère est beaucoup moins connu que *G. pulex*.

a) Méthode

La population d'*E. aenea* a été suivie mensuellement de mars 2004 à février 2005, conjointement aux observations réalisées sur *G. pulex* (chapitre III.1) dans les quatre sites

expérimentaux du Drugeon (site 1 amont, site 2 aval proche, site 3 aval moyen, site 4 aval lointain). Les larves et les imagos de cette espèce ont été dénombrés à partir des mêmes prélèvements que ceux réalisés pour suivre la population de *G. pulex*. L'influence de la distance ainsi que les variations saisonnières de l'impact de l'aire de traitement ont été évaluées à partir de leurs densités, de leurs proportions respectives au sein de la population, et par le *sex ratio* (déterminé uniquement chez les imagos). L'identification de ces organismes a été réalisée avec les clés de détermination de Olmi (1976) et Berthélemy (1979).

L'ensemble des taxons macrobenthiques a été dénombré dans les échantillons destinés au suivi de la population de *G. fossarum* dans chacun des trois sites expérimentaux de la Drésine (site 1 amont, site 2 aval moyen et site 3 aval lointain). Ces échantillons ont été prélevés le 11 octobre 2006 (deuxième campagne d'échantillonnage de *G. fossarum*, chapitre III.2.1). Des prélèvements supplémentaires de macrobenthos, effectués aussi le 11 octobre 2006 au sein des sites 1 et 2 de la Drésine, ont permis le calcul de l'indice biologique global normalisé (I.B.G.N., norme NFT 90-350), ce dernier permettant une évaluation synthétique de la qualité du peuplement macrobenthique d'un milieu aquatique. L'identification des taxons macrobenthiques a été réalisée avec les clés de détermination de Tachet 2002.

b) Résultats

i. Suivi de la population d'*Elmis aenea*

Aucune différence significative de densités d'imagos et de leur *sex ratio* n'a été observée chez *E. aenea* entre l'amont et l'aval de l'aire de traitement (Fig. III.13A). En revanche, une forte diminution des densités de larves d'*E. aenea* a été mise en évidence à l'aval des installations de traitement. Une réduction d'en moyenne 55,5%, 84,4%, et 74,4% de l'abondance de larves est observée entre l'amont et respectivement les sites 2, 3 et 4 du Drugeon (Fig. III.13B, $p < 0,001$, tests de Wilcoxon-Mann-Whitney).

A titre comparatif, les densités de *G. pulex* ont été réduites d'en moyenne 63.2%, 60.2% et 37.4% au sein des sites aval 2, 3 et 4 du Drugeon par rapport au site 1 amont (mêmes prélèvements). Ainsi, contrairement aux imagos, la diminution des densités de larves d'*E. aenea* entre l'amont et l'aval de l'aire de traitement a été positivement corrélée à celle observée chez *G. pulex* (r de Spearman = 0,298). Ceci est particulièrement vrai avec les gammares juvéniles (< 3 mm) où cette corrélation est significative (r de Spearman = 0,505 ; $p = 0,037$). En revanche, contrairement à ce qui a été observé chez *G. pulex*, aucune variation

significative de l'impact sur les larves d'*E. aenea* n'a été observée entre les douze dates de prélèvements.

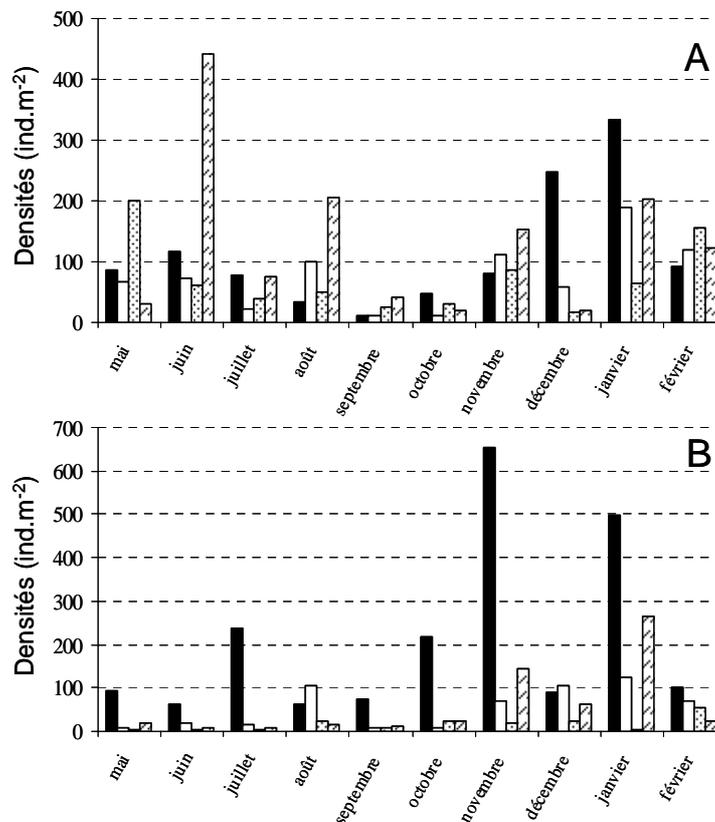


Figure III.13. Densités d'imagos (A) et de larves (B) d'*E. aenea* (ind.m⁻²) observés dans les bryophytes du Drugeon. Les prélèvements ont été effectués mensuellement à l'amont immédiat de l'aire de traitement (site 1 amont Drugeon, en noir), à l'aval immédiat (site 2 aval proche Drugeon, en blanc), à l'aval proche (site 3 aval moyen Drugeon, en pointillé) et à l'aval éloigné (site 4 aval lointain Drugeon, en hachuré).

Les larves étant davantage altérées que les imagos, la structure de la population d'*E. aenea* a été *de facto* modifiée au niveau des sites aval : les larves étaient majoritaire au sein de la population en amont de l'aire de traitement (63,7% des individus), et minoritaires au niveau des trois sites aval expérimentaux (entre 25,2% et 41,7% des individus).

Quatre autres espèces d'*Elmidae* ont été identifiés et dénombrés dans ces mêmes prélèvements : *Riolus sp.*, *Oulimnius sp.*, *Esolus sp.* et *Esolus sp.*. Les densités des individus représentant ces genres étant très faibles (y compris à l'amont de l'aire de traitement), l'interprétation d'une éventuelle sensibilité de ces taxons est très délicate à réaliser. On notera toutefois une forte diminution de leurs densités respectives au sein des sites aval 2 et 3 par rapport au site 1 amont Drugeon (Tableau III.6).

		Site 1 amont Drugeon	Site 2 aval proche Drugeon	Site 3 aval moyen Drugeon	Site 4 aval lointain Drugeon
<i>Elmis aenea</i>	Larve	208,8	53,0	17,3	58,2
	Imago	112,7	76,1	72,5	131,4
<i>Oulimnius sp.</i>	Larve	0,6	0,0	0,0	0,0
	Imago	10,0	2,2	6,7	6,7
<i>Riolus sp.</i>	Larve	0,6	0,0	0,0	0,0
	Imago	1,7	0,0	0,0	5,6
<i>Esolus sp.</i>	Larve	0,0	0,0	0,0	0,6
	Imago	5,0	0,0	0,0	6,1
<i>Limnius sp.</i>	Larve	0,0	0,0	0,0	0,0
	Imago	0,6	0,0	1,1	2,8

Tableau III.6. Moyenne annuelle des densités d'*Elmidae* au sein des bryophytes (ind.m⁻²) prélevés dans chacun des quatre sites étudiés du Drugeon

ii. Modification de l'ensemble de la communauté macrobenthique

Le nombre de taxons macrobenthiques présents dans les prélèvements de la Drésine a été réduit de 43% et 30% dans respectivement les sites aval 2 et 3 par rapport au site 1 amont. Parallèlement à cette perte de diversité taxonomique, la densité globale de macro-invertébrés a diminué de 46% et 58% au sein de ces deux sites (Tableau III.7). Les valeurs des I.B.G.N. mesurées au cours de cet échantillonnage étaient de 14/20 au niveau du site 1 amont Drésine et de 11/20 au niveau du site 2 aval moyen Drésine. A titre comparatif, les densités de *G. fossarum* ont diminué de respectivement 99,9% et 98,1% dans ces deux sites par rapport à l'amont (comptages effectués à partir des mêmes prélèvements).

A partir de cette liste faunistique a été établie une liste (indicative) de taxons « sensible », c'est-à-dire dont l'abondance est négativement corrélée au niveau de contamination du sédiment, ou « tolérante », c'est-à-dire dont l'abondance est positivement corrélée au niveau de contamination du sédiment. Cette classification a été obtenue à partir des taxons les plus abondants au niveau du site amont (au moins 50 ind.m⁻²) afin d'avoir une abondance potentielle suffisante pour mesurer un impact sur les effectifs. Dans le groupe des « sensibles » on retrouve en compagnie de *G. fossarum* : les larves de coléoptère *Elmis sp.* et d'*Oulimnius sp.* (famille des *Elmidae*), les trichoptères *Hydropsyche sp.* et *Tinodes sp.*, et les diptères *Anthomyiidae*. Dans le groupe des « tolérants » positivement corrélé au degré de contamination du sédiment on trouve l'éphéméroptère *Habrophlebia sp.* et les diptères *Chironomidae* et *Tipulidae*.

Ordre	Famille	Genre	Site 1 Drésine	Site 2 Drésine	Site 3 Drésine	
<i>Plecoptera</i>	<i>Leuctridae</i>	<i>Leuctra</i>	2,2			
	<i>Nemouridae</i>	<i>Nemoura</i>	2,0		8,9	
		Non identifié	2,2			
<i>Trichoptera</i>	<i>Hydropsychidae</i>	<i>Hydropsyche</i>	215,6	4,0	12,0	
	<i>Limnephilidae</i>	<i>Limnephilinae</i>	26,7	126,7	526,7	
	<i>Odontoceridae</i>	<i>Odontocerum</i>	2,2	2,2	142,2	
	<i>Polycentropodidae</i>	<i>Plectrocnemia</i>	2,2		2,2	
	<i>Psychomiidae</i>	<i>Lype</i>		2,2	4,4	4,4
		<i>Tinodes</i>		111,1	2,2	
		Non identifié				13,3
	<i>Rhyacophilidae</i>	<i>Rhyacophila</i>	11,1	11,1	22,2	
<i>Ephemeroptera</i>	<i>Baetidae</i>	<i>Baetis</i>	171,1	424,4	495,6	
	<i>Leptophlebiidae</i>	<i>Habrophlebia</i>	84,4	415,6	128,9	
<i>Coleoptera</i>	<i>Dytiscidae</i>	<i>Agabus</i> (larve)			15,6	
		<i>Plambus</i> (larve)	2,0			
	<i>Elmidae</i>	<i>Elmis</i> (imago)	8,8		6,6	
		<i>Elmis</i> (larve)	62,2			
		<i>Riolus</i> (larve)	2,2			
		<i>Oulimnius</i> (larve)	57,8			
		<i>Esolus</i> (imago)	2,2			
	<i>Hydraenidae</i>	<i>Hydraena</i>	4,4	2,2	2,2	
<i>Helodidae</i>	<i>Elodes</i>			2,2		
<i>Diptera</i>	<i>Anthomyiidae</i>		95,6		2,2	
	<i>Chironomidae</i>		56,0	622,2	371,1	
	<i>Ceratopogonidae</i>		2,0		4,4	
	<i>Limoniidae</i>		26,7		22,2	
	<i>Psychodidae</i>			48,9		
	<i>Rhagionidae</i>			2,2		
	<i>Simuliidae</i>		344,4	124,4	4,4	
	<i>Tabanidae</i>		2,2			
<i>Tipulidae</i>		62,2	135,6	75,6		
<i>Megaloptera</i>	<i>Sialidae</i>	<i>Sialis</i>	4,4			
<i>Amphipoda</i>	<i>Gammaridae</i>	<i>Gammarus</i>	2056,9	2,2	40,0	
<i>Acheta</i>	<i>Erpobellidae</i>	<i>Erpobdella</i>	4,4	22,2		
	<i>Glossiphoniidae</i>	<i>Glossiphonia</i>	68,9	26,7	2,2	
		<i>Hellobdella</i>	46,7	6,7	2,2	
<i>Triclada</i>	<i>Planaridae</i>		2,2			
<i>Bivalva</i>	<i>Sphaeridae</i>	<i>Pisidium</i>	6,7	2,2	2,2	
	<i>Limnaeidae</i>	<i>Radix</i>	2,2			
<i>Oligocheta</i>			1135,6	542,2	72,2	
<i>Hydracaria</i>			8,9	2,2	2,2	
<i>Nematode</i>			2,2			
Nombre de taxon			37	21	26	
Abondance totale			4701,0	2530,7	1984,2	

Tableau III.7. Densités (ind.m⁻²) des taxons échantillonnés avec *Gammarus fossarum* le 11 octobre 2006 au niveau des trois sites d'étude du ruisseau de la Drésine.

c) Discussion des résultats et mise en perspective avec les observations réalisées chez *G. pulex* et *G. fossarum*

A notre connaissance, il n'existe pas de donnée disponible dans la littérature quant à la sensibilité physiologique des *Elmidae* vis-à-vis de pesticides. Néanmoins, le plus grand impact observé sur les larves que sur les imagos d'*E. aenea* est cohérent avec le fait que ce sont aussi les stades larvaires de certains coléoptères qui sont les cibles du traitement du bois (chapitre I.1). Ces différences de sensibilité peuvent notamment trouver leur origine dans les profondes modifications biologiques et physiologiques engendrées par la métamorphose, comme illustré par les différences de modes respiratoires (et donc vraisemblablement d'exposition aux pesticides) entre larves (qui possèdent des branchies) et imagos (qui respirent *via* un plastron ventral, Bertrand 1954).

La similarité d'impact observée entre les effectifs de larves d'*E. aenea* et de juvéniles *G. pulex* peut être liée, pour partie, à des phénomènes comportementaux similaires. Par exemple, les mécanismes de dérive passive sont prépondérants chez de nombreux invertébrés aquatiques dans leurs comportements migratoires et colonisateurs (Walton Jr. 1980, Winkelmann *et al.* 2008). Le caractère ainsi présumé passif de ce phénomène chez les gammares juvéniles serait cohérent avec l'hypothèse d'un comportement d'évitement plus actif de la part des adultes, hypothèse en partie explicative des différences de réponses observées entre ces deux stades de développement (chapitres III.1).

Globalement, la confrontation des observations réalisées au sein de la communauté macrobenthique avec celles issues des populations de gammares a mis en évidence :

- i. une co-occurrence spatiale et temporelle de l'impact sur les effectifs de *G. pulex* et *G. fossarum* avec ceux observés chez plusieurs espèces macrobenthiques concomitantes, en particulier les larves d'*E. aenea*. Le lien de causalité entre une perturbation engendrée par une aire de traitement du bois et la réponse observée chez les populations de gammares est ainsi renforcé (effet non stochastique).
- ii. l'appartenance de *G. pulex* et *G. fossarum* au groupe des taxons macrobenthiques répondant sensiblement aux perturbations engendrées par les aires de traitement du bois. Ainsi, ces observations confortent l'intérêt du choix de ces crustacés à des fins bioindicatrices pour ce type de perturbation.
- iii. des pistes de développement relatives à la mise en place d'une méthode bioindicatrice utilisant *G. pulex* et *G. fossarum*, en particulier *via* l'usage d'organismes co-indicateurs tels que les larves d'*E. aenea*.

Conclusions de l'approche hydro-écologique

L'approche écotoxicologique holistique utilisée dans cette partie a mis en évidence une forte altération des deux milieux aquatiques étudiés par la présence d'une aire de traitement du bois à leur proximité, plus particulièrement en ce qui concerne la population de *G. pulex* dans un cas et la population de *G. fossarum* dans l'autre cas. Les processus conduisant à ces modifications populationnelles résultent, au moins en partie, d'une réduction des effectifs, d'une altération de la structure et du cycle de développement de la population, et vraisemblablement d'une modification du comportement de certains individus. En outre, une différence de réponses entre adultes et juvéniles a été observée.

La forte sensibilité de réponse observée *in natura* chez ces populations de crustacés se traduit par de sévères perturbations, y compris à de très faibles concentrations en pesticides dans le milieu et à des distances relativement éloignées de la source d'émission de ces contaminants. L'intensité de ces réponses est notamment renforcée en période estivale et après des pluies répétées. La constance des impacts observés, malgré la forte capacité recolonisatrice de ces amphipodes, est très probablement liée à la récurrence de l'exposition de ces organismes aux substances toxiques. Ceci serait cohérent avec les observations réalisées dans l'approche chimique où une récurrence de la contamination du milieu aquatique par les produits de traitement du bois a été mise en évidence (chapitre II.2.2).

La présente approche a aussi permis de mettre en évidence l'appartenance des *G. pulex* et *G. fossarum* au groupe des taxons répondant sensiblement aux perturbations engendrées par les aires de traitement. Par conséquent, l'impact observé sur leurs populations co-occure avec une altération de la structure de la communauté macrobenthique. L'intérêt bioindicateur de *G. pulex* et *G. fossarum* a ainsi été confirmé, ainsi que la possibilité de compléter les informations obtenues par des organismes co-indicateurs tels que les larves d'*E. aenea*.

Néanmoins, ce type d'approche hydro-écologique holistique réalisé à l'échelle de la population nécessite une meilleure compréhension des processus d'altération (Newman 2001, chapitre I.3). Parmi ces connaissances à acquérir, figurent notamment les sensibilités physiologiques respectives de *G. pulex* et *G. fossarum* aux produits de traitement du bois, les différences de sensibilité entre adultes et juvéniles, et la variabilité de cette sensibilité entre populations. Le chapitre suivant vise à documenter ces informations par une approche réductionniste à l'échelle de l'individu.

Quatrième Partie

Approche écotoxicologique

IV.1. Etude la toxicité de produits de traitement du bois seuls et en mélange sur *Gammarus pulex* (L.)

Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod Gammarus pulex (L.). Manuscrit soumis.

IV.2. Etude des différences de sensibilité des populations de *G. pulex* et *G. fossarum* en fonction de leur origine géographique et du stade de développement

Variability in Gammarus pulex (L.) and Gammarus fossarum (K.) sensitivity to the pyrethroid insecticide deltamethrin: outcomes for risk assessment. Manuscrit soumis.

Approche écotoxicologique

La compréhension des processus d'impact des produits de traitement du bois précédemment observés à l'échelle des populations de *G. pulex* et *G. fossarum* et en milieu naturel nécessite notamment une meilleure connaissance de leur sensibilité physiologique à ces substances. La présente approche se propose de répondre à ces besoins en informations complémentaires *via* la mise en place d'observations réalisées à l'échelle de l'individu et en conditions contrôlées. Des tests de toxicité aiguë en conditions contrôlées et standardisées ont ainsi été développés avec *G. pulex* et *G. fossarum* en s'inspirant notamment des préconisations faites pour *G. pulex* par Stephenson (1983) et McCahon et Pascoe (1988a et 1988b). Ces tests ont permis l'évaluation de l'écotoxicité de quatre matières actives, la cyperméthrine, du propiconazole, du tébuconazole et de l'IPBC, seules et en mélange chez *G. pulex*. La différence de sensibilité à la deltaméthrine entre *G. pulex* et *G. fossarum* a également été évaluée, notamment en fonction de l'origine de la population et du stade développement.

IV.1. Etude la toxicité de produits de traitement du bois seuls et en mélange sur *Gammarus pulex* (L.).

a). Introduction

Les bacs de traitement où sont immergés les bois fraîchement sciés contiennent une solution commerciale constituée entre autres d'un mélange de fongicides et d'insecticides. Parmi les matières actives les plus employées on retrouve la cyperméthrine, l'IPBC, le propiconazole et le tébuconazole (chapitre I.1). Comme cela a été mis en évidence dans le chapitre II.2.2, les communautés aquatiques des milieux situés à proximité des aires de traitement sont ainsi susceptibles d'être exposées à plusieurs de ces substances biocides, ainsi que d'être fortement altérées par cette contamination (voir chapitre III). Afin de mieux comprendre les effets liés à cette exposition, l'écotoxicité respective de ces pesticides doit tout d'abord être établie. Dans cette même perspective, les effets de ces substances en mélange ou en présence d'adjuvants commerciaux doivent également être évalués.

b) Etude

Les auteurs de l'article suivant (en cours de soumission) sont Olivier Adam, François Degiorgi, Grégorio Crini, Pierre-Marie Badot

Mixture Toxicity Assessment of Wood Preservative Pesticides in the Freshwater Amphipod *Gammarus pulex* (L.)

Abstract

All over the world, insecticides and fungicides are used to protect wood against pathogens. To document the environmental toxicity of wood preservative mixtures, freshwater amphipods *Gammarus pulex* (L.) were submitted to organic pesticides given independently or in mixtures. When given independently at realistic concentrations, propiconazole and tebuconazole (triazoles fungicides) were not toxic for *G. pulex*, 3-iodo-2-propinyl butyl carbamate (IPBC, fungicide) was moderately toxic, and cypermethrin (pyrethroid insecticide) was extremely toxic. 96-h LC₅₀ were respectively 4703, 1643, 604, 0.09 µg.L⁻¹. When amphipods were submitted to a mixture mimicking the composition of a commercial solution (18.2% of cypermethrin, 45.8% propiconazole, 17.2% tebuconazole, 18.8% IPBC), the overall toxicity was equal to that of the most toxic component, namely cypermethrin. But, when organisms were submitted to the real commercial mixture containing pesticides plus solvents and additives, the toxic effects were markedly higher. Moreover, a third mixture with only 0.002% cypermethrin showed lethality 2.5 to 18 fold higher than those predicted by the commonly used models. The present results show that toxicity of wood preservative mixture cannot be assessed starting only from the toxicities of each component. Furthermore, the present data strongly suggest that the environmental impacts of wood preservative mixture might be frequently underestimated.

Keywords: wood preservative, mixture toxicity, additive, *Gammarus pulex*, cypermethrin, propiconazole, tebuconazole, IPBC.

1. Introduction

All over the world, wood, especially from coniferous trees, may be attacked by pathogenic agents such as xylophagous insects or lignivorous fungi. To avoid alterations of the wood mechanical qualities, and consequently economic loss or lifespan reduction, treatments with insecticides and fungicides at different stages of production were given in tree nurseries, during wood storage, or at the sawmill stage (Rayzal, 1998; Juntunen and Kitunen, 2003).

In the past, European sawmills were frequently water-powered and thus they have been established very close to the forests in basin heads which are particularly vulnerable aquatic

ecosystems. The risk of wood preservative transfers and impacts into the aquatic environment has been recognized as very high in such areas (Gifford et al., 1996; Lyytikäinen et al., 2001; Hingston et al., 2002 and 2006). Following chronic or accidental pollution, wood preservatives are known to exert marked effects in macrobenthic and fish communities (Kingsbury and Kreutzweiser, 1987; Kreutzweiser and Kingsbury, 1987; Mian and Mulla, 1992; Lebkowska et al., 2003).

Wood preservative commercial solutions very often contain insecticide and fungicide mixtures. Propiconazole, tebuconazole, 3-iodo-2-propinyl butyl carbamate (IPBC), and cypermethrin are among the most frequently used chemicals to protect wood. Two of these pesticides, propiconazole and tebuconazole are triazole fungicides, displaying similar physiological effects: they are 14 α -demethylase inhibitors and also referred to as ergosterol biosynthesis inhibitors via cytochrome P450 inhibition (Egaas et al., 1999, Iwasa et al., 2004). Tebuconazole is frequently used in agricultural areas (Berenzen et al., 2005a) and propiconazole is one of the most widely distributed pesticides in the world (Castillo et al., 1997; Kreuger, 1998; Kronvang et al., 2003). IPBC is a halogenated unsaturated carbamate fungicide mainly used as wood preservative (Bailey et al., 1999a). Juergensen et al. (2000) hypothesized that its fungicidal property was related to the terminal iodine, whereas Jarrad et al. (2004) proposed that carbamate pesticides could act on different physiological targets by disturbing the acetylcholine esterase activity. The fourth commonly used pesticide in commercial mixtures is cypermethrin, a pyrethroid insecticide which exerts very severe toxic effects on aquatic invertebrates. Synthetic pyrethroids are among the most widely used insecticides around the world (Hill et al., 1994; Amweg et al., 2005). Pyrethroids act by slowing the gating of the voltage-dependent sodium channels, thus leading to a sustained membrane depolarization of motor neurons (Bradbury and Coats, 1989).

In the natural environment, aquatic organisms are most often exposed to a large range of potentially toxic chemicals at the same time (Kreuger, 1998; Neumann et al., 2002 and 2003a; Berenzen et al., 2005a). Furthermore, pesticides are generally used as commercial mixtures, whereas the vast majority of available toxicity data deals with the effects of single pure chemicals. Two basic concepts have been generally used for predicting multiple mixture toxicity: concentration addition (CA, Loewe and Muischnek, 1926) and independent action (IA, Bliss, 1939). The CA concept is devoted to similarly acting toxicants. Sprague (1970) proposed a derived concept: the toxic unit approach (TU). In this hypothesis any component

can be replaced by another if they display the same action mechanism as long as the corresponding relative toxic potency allows to obtain a similar toxic unit. It has been proved that this model provides highly accurate predictions of mixture toxicity when all of the components have a strictly similar mode of action, regardless of their levels and ratios in the mixture (Faust et al., 2001; Zwart and Posthuma, 2005; Junghans et al., 2006). However the CA model is not adapted to mixtures with components having dissimilar modes of action because it leads to an overestimation of the toxicity of such mixtures (Faust et al., 2003).

The independent action (IA) model is based on dissimilar actions of mixture components. In this approach, the toxicity of each component is independent and cannot be replaced by another. The basic idea of this approach is that different compounds act on different physiological systems within the exposed organisms and lead to a common toxicological endpoint. This model provides accurate predictions of the mixture toxicity when all of the components have dissimilar modes of action, regardless of their levels and ratios in the mixture (Faust et al., 2003). However the IA model is not adapted to mixtures with similar acting components because it leads to an underestimation of the overall toxicity (Faust et al., 2001; Junghans et al., 2006). Recently, Zwart and Posthuma (2005) proposed a mixed two-step approach for mixed-model (MM) calculations. The predictability assessment of the available models is still an opened question (Backhaus et al., 2003; Zwart and Posthuma, 2005; Junghans et al., 2006).

In this context, it may be useful to assess the true environmental toxicity of wood preservative mixtures on aquatic biota starting from commercial mixtures and to compare it to data obtained from the available models. The freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea, Amphipoda) has been chosen as test-organism because of its ecological and ecotoxicological importance. This crustacean species is one of the most widespread invertebrates in European streams and it is a major component of the biomass of many streams (Welton, 1979). As a detritus feeder, *G. pulex* plays a key role in nutrient cycling in freshwater systems (Welton, 1979) and *Gammarus* species are among the most eaten prey for many fish species (Bollache et al., 2006). *G. pulex* is known to be sensitive to a wide range of pollutants and to be among the most sensitive aquatic invertebrates (Helson and Surgeoner, 1986; Mian and Mulla, 1992; Schulz and Liess, 1999b; Wogram and Liess, 2001; Cold and Forbes, 2004; Van Wijngaarden et al., 2004; Bloor et al., 2005). This amphipod species can

be easily grown in the laboratory and has been recommended for use in toxicity tests (McCahon and Pascoe, 1988a and 1988b).

Freshwater amphipods *Gammarus pulex* (L.) were exposed to propiconazole, tebuconazole, IPBC, and cypermethrin given separately or in mixtures. Then, mixture toxicities were modelled using CA, IA, and MM and the modelled toxicity was compared with the measured mixture toxicity.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Propiconazole, tebuconazole, cypermethrin and IPBC (Pestanal[®]) were purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Seelze, Germany). Chemicals, CAS numbers, purity and solvent used for dilution are listed in Table IV.1. These chemicals were diluted in mineral water (Volvic[®] from Danone) that has constant physico-chemical characteristics (Tab. IV.2). These dilutions were made immediately before use.

Chemicals	CAS number	Molecular weight (g.mol ⁻¹)	Log K _{ow}	Purity (%)	Solvent	Maximum solvent concentration (% v/v)
Cypermethrin	52315-07-8	416.32	6.6	97.0	Acetonitrile	0.01
IPBC	55406-53-6	281.09	2.8	97.0	Acetone	0.10
Propiconazole	60207-90-1	342.23	3.7	98.6	1-Methoxy-2-Propanol	0.07
Tebuconazole	107534-96-3	307.80	3.7	99.6	Acetone	0.17

Table IV.1. Main features of the tested chemicals: cypermethrin, IPBC, propiconazole, tebuconazole, and solvents used for dilutions.

Chemicals	Concentration (mg.L ⁻¹)
Calcium	11.5
Magnesium	8.0
Sodium	11.6
Potassium	6.2
Bicarbonates	71.0
Chlorites	13.5
Nitrates	6.3
Sulfates	8.1
Silica	31.7
Total mineralization (dried residues at 180°C)	130 mg
pH	7.0

Table IV.2. Composition of mineral water (Volvic[®]) used for dilutions and laboratory acclimatization of *Gammarus pulex*.

2.2. Test organisms

Gammarus pulex (L.) visibly free from parasites were collected from an unpolluted stream (Ruisseau de la Fontaine des Ermites, France, N47°24'43'' E006°03'32''). Individuals were acclimated in freshwater (Volvic®) to laboratory conditions at least 10 days prior to testing. *Gammarus pulex* (L.) were fed with *Alnus glutinosa* leaves following McCahon and Pascoe (1988b). Temperature was maintained at 15°C during their stay in the laboratory and we only used large individuals (> 6 mm) for acute toxicity tests, following Stephenson (1983).

2.3. Acute toxicity tests

Ten *G. pulex* adults (> 6 mm) were randomly chosen and inserted into each test chamber (a 100 mL glass container) that was maintained at 15°C. For each acute test concentration, 6 replicates were used. The mortality was observed after 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h of exposure. Because pesticides require the use of solvent to be dissolved, we systematically tested solvent controls with concentrations as shown in Table IV.1. Negative controls were made with mineral water (Volvic®) to assess the validity of tests. Positive controls were made with 0.1 µg.L⁻¹ cypermethrin to take into account possible biological variability between batches and to assess inter-experimental variability between tested individuals. In each experiment, acute toxicity tests, negative, solvent and positive controls were performed at the same time with individuals coming from the same field collection.

Dissolved oxygen was equal to $49 \pm 8\%$ of saturation after 96 h exposure in a static environment. Conductivity was $252 \pm 8 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ and pH was 6.99 ± 0.02 .

2.4. Tested solutions

Mortalities of *G. pulex* exposed to propiconazole (0-10 mg.L⁻¹), tebuconazole (0-3 mg.L⁻¹), IPBC (0-3 mg.L⁻¹), and cypermethrin (0-0.2 µg.L⁻¹) solutions were investigated. The lethality effects of three mixtures of these chemicals were also studied. The active substances ratio of mixture 1 (M1) was identical to the composition of a commercial solution (M0) used as wood preservative (EX 2002 E.S.E.® from Dyrup®). M0 contained unknown additives and solvents. Another mixture (M2) used the same ingredients as M1, but with ratio of pesticides determined on the basis of 96-h LC₅₀ for cypermethrin and 96-h LC₅ for the three other components (concentrations measured in this study). Pesticide concentrations of M0, M1 and M2 are listed in Table IV.3.

	mixture 0 (M0)	mixture 1 (M1)		mixture 2 (M2)			
Chemicals	Concentrations in the commercial mixture EX 2002 E.S.E.® (mM)	Concentrations	Pesticide ratios in mixture 1	Toxic Units (%)	Reference concentrations (mM)	Pesticide ratios in mixture 2	Toxic Units (%)
	Cypermethrin	1.44	1.44	18.2%	99.98%	0.226*	0.0017%
IPBC	1.49	1.49	18.8%	0.01%	480**	3.7%	30.5%
Propiconazole	3.62	3.62	45.8%	<0.01%	9888**	76.2%	23.0%
Tebuconazole	1.36	1.36	17.2%	<0.01%	2612**	20.1%	11.5%

Table IV.3. Concentrations of active substances in the commercial mixture EX 2002 E.S.E.® (M0). Pesticide ratios (%) calculated for mixture 1 (M1), and for mixture 2 (M2) based on *G. pulex* 96-h LC₅₀ (*) of cypermethrin (mM) and on *G. pulex* 96-h LC₅ (**) of fungicides (mM). Toxic units ratio (%) based on respective *G. pulex* 96-h LC₅₀ are indicated for mixture 1 and mixture 2.

2.5. Single contaminant fit models

Three standard toxicity concentration-dependent fit models were tested for the single-contaminant experiments: Log-Normal, Weibull's and Hill's models. They were calculated as follows by the Regtox macro (open source) running with Microsoft Excel® software:

$$\text{Log-Normal (LN): } f(x) = \int_{-\infty}^x e^{-\frac{x^2}{2}} dx \quad (1)$$

where x is the concentration logarithm centred by the mean μ and reduced by the standard deviation σ .

$$\text{Weibull (W): } f(x) = 1 - e^{-\alpha x^\beta} \quad (2)$$

with α and β not having any particular meaning.

$$\text{Hill (H): } f(x) = \frac{x^{nH}}{x^{nH} + EC50^{nH}} \quad (3)$$

where nH is the Hill's number characterizing steepness in the inflexion point of the concentration-response relationship.

The best fit model was determined by applying Pearson's correlation coefficients (r) to observed and predicted data. The fit model showing highest correlations was selected and used for calculations of concentration-dependent curves.

Lethal concentrations LC x of the single pesticides were calculated using the inverse function of the respective model, and the corresponding statistical uncertainty (i.e. 95% confidence intervals) was estimated by a bootstrap approach (Scholze et al., 2001).

2.6. Mixture toxicity models

The concentration addition model takes into account the relative toxicities of components and occurs if the following relationship holds (Sprague, 1970):

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{ECx_i} = 1 \quad (4)$$

where c_i gives the concentration of the component i in the mixture. ECx_i denotes the effect concentration of chemical i which provokes the same $x\%$ effect when independently applied as the mixture, e.g. for a 50% mixture effect, ECx_i corresponds to EC_{50} of the chemical i . The quotient c_i/ECx_i quantifies the relative contribution of the chemical i , i.e. the dimensionless “toxic unit” (TU_{x_i}). So the concentration addition approach is defined by the summation of the n toxic units corresponding to the n mixture components.

Faust et al. (2003) demonstrates that Eq. (4) could be written as follows:

$$ECx_{mix} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{p_i}{ECx_i} \right)^{-1} \quad (5)$$

where ECx_{mix} is the effect concentration ($x\%$) of the mixture where the individual concentrations c_i are added up to c_{mix} , and p_i is the constant proportion of the chemical i in the mixture, i.e. $p_i = c_i/c_{mix}$.

The independent action model takes into account the relative relationships between response probabilities in test organisms. The concentration relationships can be calculated by multiplying the probabilities of nonresponse (Bliss, 1939):

$$E(c_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(c_i)] \quad (6)$$

$E(c_{mix})$ is the overall effect (scaled from 0 to 1) of a mixture of n components at the total concentration c_{mix} ($c_{mix} = c_1 + \dots + c_n$). $E(c_i)$ is the effect of the compound i if applied singly at the concentration c_i that corresponds to its concentration in the mixture.

The tested mixtures contain chemicals having similar and dissimilar toxic modes of action. Such mixtures are expected to have an intermediate toxicity between CA and IA toxicity predictions. We have tested a mixed-model (MM) with a two-step approach, as proposed by Zwart and Posthuma (2005): the first step requires evaluation of the CA responses to each

individual toxic mode of action, the second step consists in evaluating the IA effect of the different toxic modes of action. In the present paper we have evaluated the CA responses of triazole fungicides; then we have calculated the IA responses for triazole fungicides, IPBC and cypermethrin.

3. Results

The relevance of experimental results was methodologically checked using negative and positive controls. Mortality observed in negative controls varied from 0 to 3.3% after 24 h of exposure and from 5.0% to 13.3% after 96 h of exposure. No significant difference occurred between negative and solvent controls (Wilcoxon-Mann-Whitney tests).

The responses observed between the batches of positive controls were not significantly different (Wilcoxon-Mann-Whitney tests). They did not exceed 3% after 24 h of exposure, and 15% after 96 h of exposure. Furthermore, mortality measured in positive controls treated with $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ of cypermethrin was not significantly different from values predicted by the fit model (Student's test).

Predicted data obtained for single-contaminant tests from Hill's, Weibull's and Log-Normal models were close to experimental observations: the correlation coefficients between predicted and observed data were highly significant for each fit model (Table IV.4). Hill's model was the best fit model and then has been retained for each concentration-response curve.

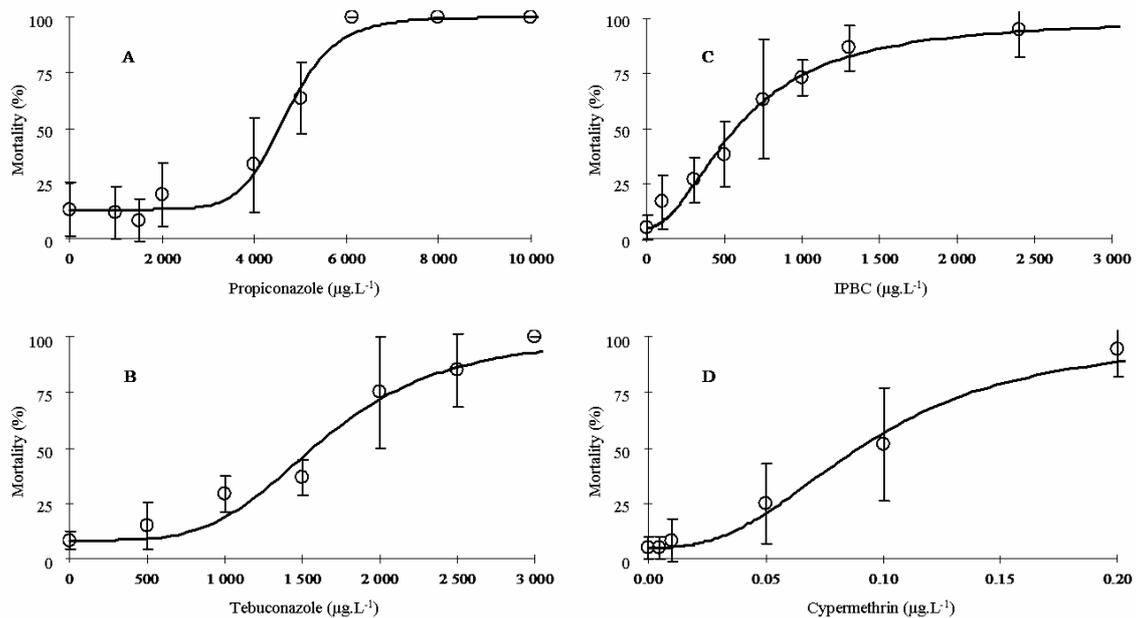
Chemicals	24h		48h		72h		96h	
	LC ₅₀	r						
Cypermethrin	0.116-0.135	0.9996	0.098-0.116	0.998	0.084-0.103	0.9933	0.082-0.101	0.9957
IPBC	8438-13712	0.9906	929-1294	0.978	605-742	0.9967	517-661	0.9954
Propiconazole	5156-5507	0.9988	5037-5331	0.9981	4844-5177	0.9971	4439-4919	0.9947
Tebuconazole	2196-2444	0.9817	1823-2172	0.9848	1541-1903	0.9838	1471-1745	0.9905

Table IV.4. LC₅₀ (95% IC) expressed in $\mu\text{g.L}^{-1}$ for cypermethrin, IPBC, propiconazole and tebuconazole obtained after 24, 48, 72, and 96 h of *G. pulex* exposure, and Pearson's correlation coefficient (r) between observed mortality data and predicted lethality values obtained by Hill's model.

3.1. Single contaminant toxicity

Mortality response curves of the four tested substances followed sigmoid curves. These results were confirmed by the pseudo-normality of the distribution of the mortality variance between replicates, corresponding to a unique threshold close to LC₅₀ (Fig. IV.1). LC₅₀s with

their 95% confidence intervals obtained from the Hill's model are given in Table IV.4. LC₅₀ decreased with increasing exposure duration for the four tested pesticides (Fig. IV.2).



[Adam et al., Fig 1]

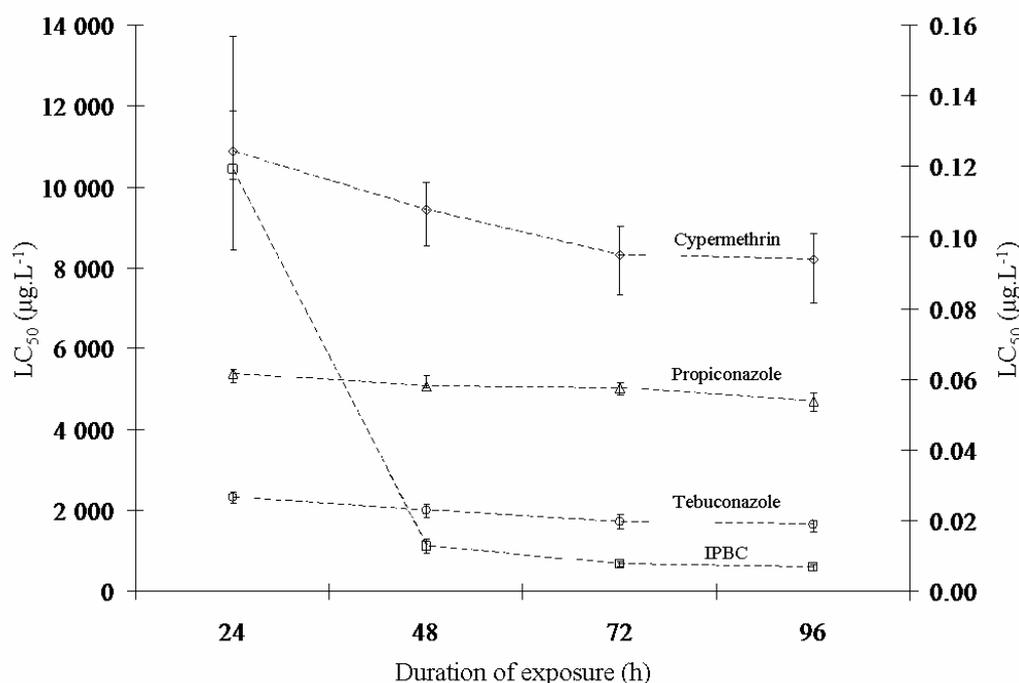
Figure IV.1. Concentration-response curves obtained by Hill's model after 96 h of exposure of *G. pulex* to propiconazole (A), tebuconazole (B), IPBC (C), and cypermethrin (D). Percentages correspond to *G. pulex* mortality (%). Pesticide concentrations are expressed in $\mu\text{g.L}^{-1}$. Plots represent the mean (\pm 95% CI) of 6 replicates.

Mortality of *G. pulex* exposed to propiconazole was observed above a threshold: 96-h LC₅ and 96-h LC₅₀ occurred respectively at 3384 and 4703 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Fig. IV.1A). The main part of *G. pulex* response to propiconazole was observed during the first 24 h of exposure, then, the LC₅₀ decrease was very low between 24 and 96 h of exposure (Fig. IV.2).

As for propiconazole, tebuconazole lethality on *G. pulex* displayed a threshold concentration: 96-h LC₅ and 96-h LC₅₀ occurred respectively at 804 and 1643 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Fig. IV.1B). The tebuconazole LC₅₀ decrease was approximately 30% between 24 and 96 h of exposure, indicating that, as for propiconazole, the main part of tebuconazole lethality on *G. pulex* is expressed in the first 24 h of exposure (Fig. IV.2).

Lethality provoked by IPBC on *G. pulex* was observed at very low concentrations. IPBC 96-h LC₅ and 96-h LC₅₀ occurred respectively at 135 and 604 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Fig. IV.1C). Contrary to triazole fungicides, the lethality caused by IPBC on *G. pulex* was low in the first hours of

exposure, but strongly increased between 24 and 48 h of exposure. The IPBC LC₅₀ decrease was higher than 90 % between 24 and 96 h of exposure (Fig. IV.2).



[Adam et al., Fig. 2]

Figure IV.2. LC₅₀ expressed in µg.L⁻¹ for *G. pulex* exposed to IPBC (square plot), propiconazole (triangle plot), tebuconazole (circle plot) and cypermethrin (rhomb plot) from 24 to 96 h of exposure. The left axis corresponds to fungicide (IPBC, propiconazole, tebuconazole) LC₅₀, the right axis corresponds to cypermethrin LC₅₀. Error bars indicate 95% confidence interval.

As for IPBC, mortality caused by cypermethrin on *G. pulex* was observed at the lowest concentrations. Cypermethrin 96-h LC₅ and 96-h LC₅₀ occurred respectively at 0.03 and 0.09 µg.L⁻¹ (Fig. IV.1D). As for triazole fungicides, and contrary to IPBC, the lethality caused by cypermethrin on *G. pulex* appeared mainly during the first 24 h of exposure (Fig. IV.2).

3.2. Mixture toxicity

The pesticide concentrations of M1 was designed to be identical to a commercial mixture composition (EX 2002 E.S.E.® from Dyrup). Observed M1 toxicity was accurately predicted by the three mixture toxicity models (CA, IA models and MM): no significant difference occurred between observed and predicted values at all concentrations tested (Student's test, p>0.05). Concentration-response curves predicted by the three mixture toxicity models (Fig. IV.3A) were superimposed onto the cypermethrin concentration-response curve (Fig. IV.1D). No significant difference occurred between cypermethrin (Fig. IV.1D) and the M1 dose-response curves (Fig. IV.3A, Wilcoxon-Mann-Whitney test). In M1, cypermethrin

represented 18.2% of the total amount of active substance concentrations expressed in mol.L⁻¹, and it was responsible for 99.98% of the overall mixture toxicity expressed in terms of Toxic Units. Fungicides had a very low impact on the overall mixture toxicity (only 0.02% in terms of Toxic Units) in spite of a higher concentration in its composition, i.e. 77.6% of the concentrations expressed in mol.L⁻¹ (Tab. IV.4). No synergism was observed at this pesticide concentrations ratio-level.

The lethal effect of M0 (commercial mixture EX 2002 E.S.E.[®] from Dyrup) was significantly higher (Wilcoxon test, p=0.044) than observed with M1 which did not contain any commercial additives (Fig. IV.3A).

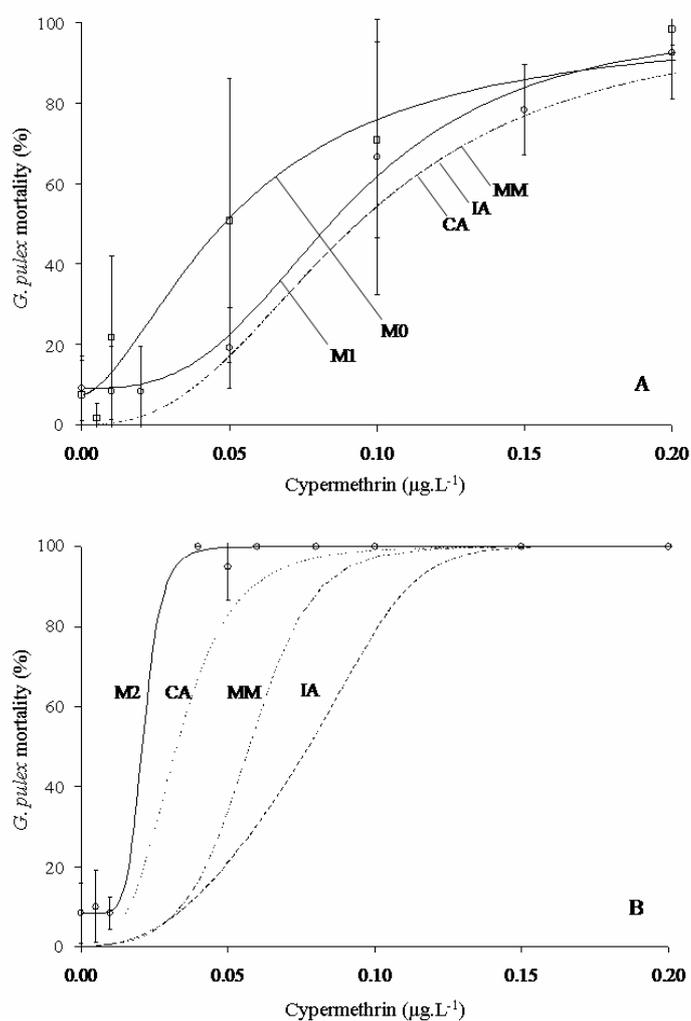


Figure IV.3. Concentration-response curves obtained for *G. pulex* exposed to M0 or M1 (A) and M2 (B) after 96 h of exposure. Percentages correspond to *G. pulex* mortality (%). Pesticide concentrations are expressed in terms of cypermethrin concentration (µg.L⁻¹) in mixtures. White plots give the mean percentages (+/-Standard Deviation) of 6 replicates. Circle plots correspond to M1 (A) and M2 (B). Square plots correspond to M0, commercial solution EX 2002 E.S.E.[®] (A). Solid lines are the concentration-response curves obtained by Hill's model. Predicted concentration-response curves calculated by CA, IA models and MM are represented with dotted lines.

Another mixture (M2) used the same ingredients as M1, but with ratio of pesticides determined on the basis of 96-h LC₅₀ for cypermethrin and 96-h LC₅ for the three other components. Cypermethrin represented only 0.002% of the total amount of active substances concentrations in M2, but it still represented 35.0% of the overall mixture toxicity expressed in terms of Toxic Units. Fungicides concentrations in M2 were higher than in M1 (Tab. IV.3). With M2, the concentration-response curves predicted by CA, IA models, and MM were different. Moreover, measured M2 toxicity was higher than toxicities predicted by the CA, IA, and MM mixture models (Fig. IV.3B). This indicated a synergism occurring between the four pesticides at this ratio-level. M2 toxicity was about 2.5, 17 and 18 fold stronger than predicted by respectively CA, IA models and MM as regards its 96-h LC₅₀ (Fig. IV.3B). Differences between the observed lethality and predicted values were significant for all tested concentrations (Student's tests, $p < 0.05$).

4. Discussion

4.1. Single-contaminant toxicity

In the case of wood preservative pesticides, LC₅₀ was an easy and relevant parameter to assess and compare measured and calculated toxicities. *G. pulex* populations were differently impaired by the four pesticides tested. The propiconazole acute toxicity observed for *G. pulex* in this study was lower than that observed for *Gammarus lacustris* and *Gammarus kischineffensis* in other studies: the 96-h LC₅₀ were respectively 4.70, 1.30 and 1.80 mg.L⁻¹ (present data, Baekken and Aanes, 1991; Meliyan, 1991). Tebuconazole had a higher acute toxicity for *Gammarus pulex* than propiconazole with 96-h LC₅₀ that were respectively 1.64 and 4.70 mg.L⁻¹. Toxicity studies related to tebuconazole are very scarce. U.S. E.P.A. reported a higher sensitivity of *Americamysis bahia* (Malacostraca, Crustacea) which has a tebuconazole LC₅₀ of 0.49 mg.L⁻¹ but without specified exposure duration. These adverse effects of propiconazole and tebuconazole on non-target biological groups are likely to be caused by inhibiting other cytochrome P450s than the target-one, i.e. fungal sterol 14-demethylase (Jackson et al., 2000).

Gammarus pulex was moderately sensitive to IPBC with a 96-h LC₅₀ at 604 µg.L⁻¹. The acute toxicity of this pesticide in this species was in the same order as those observed for the amphipod *Hyalalela azteca*, and lower than those observed for the cladoceran *Daphnia magna*: 48-h LC₅₀ were respectively 500 and 40 µg.L⁻¹ (Farrell et al., 1998). The latent period

observed for the expression of IPBC lethality on *G. pulex* could be related to the time necessary for having a sufficient toxic uptake by individuals. But, the IPBC mode of action is still largely unknown and other species displayed far shorter time responses: for instance, Tierney et al. (2006) reported that in the coho salmon *Oncorhynchus kisutch* physiological alarm reaction was impaired in a few minutes after an acute exposure at only 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of IPBC.

Cypermethrin is recognised as extremely toxic for aquatic organisms even at very low concentrations (Helson and Surgeoner, 1986; Bradbury and Coats, 1989; Solomon et al., 2001; Sanchez-Fortun and Barahona, 2005). 96-h LC_{50} estimated for *G. pulex* in this study was between 0.082 and 0.101 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (CI 95%). These values were in accordance with those reported in the literature for this species: 0.06-0.13 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Stephenson, 1982; Shires, 1983). Crustaceans and particularly *Gammarus sp.* are among the most sensitive species to pyrethroid insecticides (Anderson and Shubat, 1984; Helson and Surgeoner, 1986; Cold and Forbes, 2004; Van Wijngaarden et al., 2004). Adverse effects can occur at very low levels in these taxa: for instance, a treatment of 0.001 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of lambda-cyhalothrin (pyrethroid insecticide) caused significant increase in the drift of *G. pulex* (Lauridsen and Friberg, 2005). This high sensitivity of *Gammarus sp.* to synthetic pyrethroids was confirmed by the present results.

Mortality was essentially observed before 24 h of exposure. After this stage, a slow decrease of cypermethrin LC_{50} occurred between 24 and 96 h of exposure. This can be related to the high permeability of synthetic pyrethroids which are able to quickly penetrate arthropods bodies through the complex cuticular barrier (Bradbury and Coats, 1989). Of the four active substances tested, cypermethrin was by far the most acutely toxic for *G. pulex*, even at environmentally realistic concentrations (Crossland et al., 1982).

Lethality risk from triazole fungicides appeared to be low when comparing LC_{50} values from the present study and environmental concentrations found in previous studies (Castillo et al., 1997; Mortensen et al., 1998; Kronvang et al., 2003, Berenzen et al., 2005a). Despite the wide gap of environmental data related to IPBC, the concentration level and exposure duration that are necessary to record mortality in this study suggested that the lethality risk of IPBC for *G. pulex* is moderate in natural conditions.

4.2. Mixture toxicity

CA, IA models and MM have proved to be equally relevant for predicting mixture toxicity of M1. The three predicted concentration-response curves were superimposed, and we could not discriminate a better one in this case. The lethality of this mixture for *G. pulex* was mainly caused by cypermethrin. The lethality of fungicides was too low to be observed at the tested concentrations. No synergism or antagonism has been detected between pesticides at the concentration ratio tested in M1.

Acute toxicity tests with M0, the corresponding commercial wood preservative mixture, have revealed a higher toxicity on *G. pulex* than observed with M1. As indicated by Zwart and Posthuma (2005), such results should be given only in terms of similarity or dissimilarity from the test-models and interaction between compounds could be suspected when the overall mixture toxicity observed was higher or lower than predicted by the three mixture toxicity models. In the present study, additives present in M0 commercial solution were likely to modify interactions between active substances and their toxicity expression (Stratton, 1985; Krogh et al., 2003). Additives could also act because they are themselves toxic, or they facilitate pesticides intake, or they reduce activity of detoxification mechanisms (Holloway and Western, 2003; Green and Abdelghani, 2004; Paul et al., 2005). Whatever the mechanism operating, the commercial solution containing additives displayed a higher toxicity than a mixture differing only by the absence of these additives. Therefore, when the composition of the mixture is not known with accuracy, available mixture toxicity models failed to predict ecotoxicity effects even if the exact contents in active compounds are known. In the present case, environmental toxicity predicted by mixture models was markedly underestimated. Consequently, ecotoxicological risk assessment of wood preservative mixture on aquatic systems have to be based on reliable data obtained by testing the overall commercial mixtures and cannot be calculated from single component toxicity data.

M2 was designed according to cypermethrin 96-h LC₅₀ and fungicides 96-h LC₅. IPBC, cypermethrin and both triazole fungicides act on three different physiological targets (Coats et al., 1989; Levine et al., 1999; Jackson et al., 2000; Juergensen et al., 2000), and we could presume that the MM was the most relevant approach currently available for predicting toxicity of this mixture (Zwart and Posthuma, 2005). The observed M2 mixture toxicity reached up to 18 times the predicted one. This result suggests that a relatively high synergism would occur between active substances in M2. A more careful approach for risk assessment is to consider the “worst case model”, namely the model predicting the highest toxic effect: the CA model (Thompson, 1996; Faust et al., 2003). Then the suspected synergism phenomenon

does occur, but to a lesser degree than predicted by the MM, the observed mixture toxicity being about 2.5 fold higher than predicted by the CA model. However, whichever model was used, observed M2 toxicity was higher than predicted. Very likely synergism occurred between the four active substances at this concentration ratio. This synergism could have several origins. Synergism between pyrethroid and carbamate insecticides has been reported (Corbel et al., 2003). But IPBC is a carbamate fungicide that is expected to display a different physiological mode of action compared with those having insecticidal action (Juergensen et al., 2000). No relevant data on interaction between pyrethroid insecticide and triazole fungicide on an aquatic organism have been found in the literature. However, co-application of propiconazole and other pesticides may lead to unexpected toxicological interactions by either inhibition or induction of hepatic cytochrome CYP1A protein activity and potentially other cytochrome P450 isoenzymes (Levine et al., 1999). Likewise, synergism between pyrethroid insecticides and an azole fungicide (prochloraz) was observed on the honeybee *Apis mellifera* from treatment at sub-lethal concentrations (Colin and Belzunces, 1992; Belzunces et al., 1993; Pilling et al., 1995; Vandame and Belzunces, 1998; Papaefthimiou and Theophilidis, 2001). A hypothesis on the synergy mode of action between these compounds lies in the modification of the oxidative metabolism of the pyrethroid insecticide by the fungicides, particularly by the inhibition of microsomal oxidation (Colin and Belzunces, 1992; Pilling et al., 1995). However, results tend to show that synergism mechanisms do not seem to be as simple as expected (Colin and Belzunces, 1992). Another suggestion is that this synergistic action could be caused by the action of both compounds on a same target site which is gap junctional intercellular communication in the heart of the bee (Papaefthimiou and Theophilidis, 2001).

In the present study dose ratio-dependent deviation occurred as defined by Jonker et al. (2005), i.e. deviation from reference model depends on the proportion of mixture components. This could be related to the dose-dependent modification of oxidative metabolism by triazole fungicides. Lethality of these chemicals on *G. pulex* being observed only from a threshold concentration, it is assumed that a modification of cypermethrin oxidation may also be dose-dependent of triazole fungicides. Thus, the dose ratio-dependent deviation observed in tested mixtures could be caused by an insufficient alteration of oxidative mechanisms at the lowest fungicides concentrations for a significantly reduced biodegradation rate of cypermethrin by *G. pulex*. Then, interaction between active substances would depend partly on the ratio between chemicals displaying acute toxicity and chemicals altering *G. pulex* metabolism.

Relevant environmental risk assessment of wood preservative mixture has also to take into account changes that may occur in the natural environment. Indeed, pesticide environmental concentrations are known to change at different rates because of differences in degradation rates and transfer properties. Interactions between compounds can also change co-solute concentrations: for instance, a repeated application of triazole fungicides may alter the ecosystem functioning, through changes in co-solutes biodegradation by the microflora (Munier-Lamy and Borde, 2000). Then, the initial pesticide ratio of the commercial solution was likely to be modified between the treatment area and the contaminated aquatic environment. Furthermore, aquatic biota is typically exposed to brief pulses of pesticides in their natural environment (Liess et al., 1999). Then, aquatic organisms are expected to be exposed to fluctuating ratios of pesticides displaying different toxic interactions. Thus, relevant risk assessment should also consider possible patterns of pesticides ratio exposure.

5. Conclusion

Among the four wood preservatives tested, cypermethrin was the pesticide exerting the most acute toxicity on *G. pulex*. CA, IA models, and MM were of limited interest for the environmental risk assessment of wood preservative mixtures especially because the use of additives in the commercial mixtures prevents from predicting toxicity and because possible interactions between mixture active components may occur. Then, toxicity assessment of pesticide mixtures should be necessarily based on testing experiments performed with real commercial solutions.

Acknowledgements - The authors are indebted to Agence de l'Eau Rhône, Méditerranée et Corse for financial support. Olivier Adam is indebted to Conseil Régional de Franche-Comté for PhD fellowship.

References

- Amweg, E.L., Weston, D.P., Ureda, N.M., 2005. Use and toxicity of pyrethroid pesticides in the Central Valley, California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 966-972.
- Anderson, R.L., Shubat, T P., 1984. Toxicity of flucythrinate to *Gammarus lacustris* (Amphipoda), *Pteronarcys dorsata* (Plecoptera) and *Brachycentrus americanus* (Trichoptera): importance of exposure duration. *Envir. Pollut. Series A* 35, 353-365.
- Backhaus, T., Altenburger, R., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., 2003. The BEAM-project : prediction and assessment of mixture toxicities in the aquatic environment. *Cont. Shelf Res.* 23,1757-1769.

- Baekken, T., Aanes, K.J., 1991. Pesticides in Norwegian agriculture. Their effects on benthic fauna in lotic environments. Preliminary results. *Int. Assoc. Theor. Appl. Limnol. Proc.* 24, 2277-2281.
- Bailey, H.C., Elphick, J.R., Potter, A., Chao, E., Zak, B., 1999a. Acute toxicity of the antisapstain chemicals DDAC and IPBC, alone and in combination, to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Wat. Res.* 33, 2410-2414.
- Belzunces, L.P., Garin, S., Colin, M.E., 1993. Synergistic effects of pyrethroid insecticides and azole fungicides on bees, at sublethal doses. *Mesogees* 53, 13-16.
- Berenzen, N., Lentzen-Gogging, A., Probst, M., Schulz, H., Schulz, R., Liess, M., 2005a. A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticides concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemos.* 58, 683-691.
- Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Biol.* 26, 585-615.
- Bloor, M.C., Banks, C.J., Krivtsov, V., 2005. Acute and sublethal toxicity tests to monitor the impact of leachate on an aquatic environment. *Environ. Int.* 31, 269-273.
- Bollache, L., Kaldonski, N., Troussard, J.P., Lagrue, C., Rigaud, T., 2006. Spines and behaviour as defences against fish predators in an invasive freshwater amphipod. *Anim. Behav.* 72, 627-633.
- Bradbury, S.P., Coats, J.R., 1989. Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 108, 133-177.
- Castillo, L.E., de la Cruz, E., Ruepert, C., 1997. Ecotoxicology and pesticides in tropical aquatic ecosystems of Central America. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 41-51.
- Coats, J.R., Symonik, D.M., Bradbury, S.P., Dyer, S.D., Timson, L.K., Atchinson, G.J., 1989. Toxicology of synthetic pyrethroids in aquatic organisms: an overview. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 671-679.
- Cold, A., Forbes, V.E., 2004. Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. *Aquat. Toxicol.* 67, 287-299.
- Colin, M.E., Belzunces, L.P., 1992. Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin : a convenient biological approach. *Pestic. Sci.* 36, 115-119.
- Corbel, V., Chandre, F., Darriet, F., Lardeux, F., Hougard, J-M., 2003. Synergism between permethrin and propoxur against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. *Med. Vet. Entomol.* 17, 158-164.
- Crossland, N.O., Shires, S.W., Bennett, D., 1982. Aquatic toxicology of cypermethrin. III. Fate and biological effects of spray drift deposits in fresh water adjacent to agricultural land. *Aquat. Toxicol.* 2, 253-270.
- Egaas, E., Sandvik, M., Fjeld, E., Kallqvist, T., Goksoyr, A., Svensen, A., 1999. Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione S-transferase in brown trout (*Salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 122, 337-344.
- Farrell, A.P., Stockner, E., Kennedy, C.J., 1998. A study of the lethal and sublethal toxicity of polyphase P-100, an antisapstain fungicide containing 3-iodo-2-propynyl butyl carbamate (IPBC), on fish and aquatic invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 472-478.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blank, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Vighi, M., Grimme, L.H., 2001. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquat. Toxicol.* 56, 13-32.

- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blank, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H., 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquat. Toxicol.* 63, 43-63.
- Gifford, J.S., Buckland, S.S., Judd, M.C., McFarlane, P.N., Anderson, S.M., 1996. Pentachlorophenol (PCP), PCDD, PCDF and pesticide concentrations in a freshwater lake catchment. *Chemosphere* 32, 2097-2113.
- Green, R.M., Abdelghani, A.A., 2004. Toxicity of a mixture of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Mono-sodium Methanearsonate to the Red Swamp Crawfish, *Procambarus clarkii*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 1, 35-38.
- Helson, B.V., Surgeoner, G.A., 1986. Efficacy of cypermethrin for the control of mosquito larvae and pupae, and impact on non-target organisms, including fish. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2, 269-275.
- Hill, I.R., Shaw, J.L., Maund, S.J., 1994. Review of aquatic field tests with pyrethroid insecticides. *Fresh. Field Tests Haz. Asses. Chem.* 15, 249-271.
- Hingston, J.A., Moore, J., Bacon, A., Lester, J.N., Murphy, R.J., Colins, C.D., 2002. The importance of the short-term leaching dynamics of wood preservatives. *Chemosphere* 47, 517-523.
- Hingston, J.A., Murphy, R.J., Lester, J.N., 2006. Monitoring losses of copper based wood preservatives in the Thames estuary. *Environ. Pollut.* 143, 367-375.
- Holloway, P.J., Western, M., 2003. Tank-mix adjuvants and pesticide residues: some regulatory and quantitative aspects. *Pest. Manag. Sci.* 59, 1237-1244.
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J.T., Roe, R.M.R.M., 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop. Protect.* 23, 371-378.
- Jackson, C.J., Lamb, D.C., Kelly, D.E., Kelly, S.L., 2000. Bactericidal and inhibitory effects of azole antifungal compounds on *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol. Letters* 192, 159-162.
- Jarrad, H.E., Delaney, K.R., Kennedy, C.J., 2004. Impacts of carbamate pesticides on olfactory neurophysiology and cholinesterase activity in coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*). *Aquat. Toxicol.* 69, 133-148.
- Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.A., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2701-2713.
- Juergensen, L., Busnarda, J., Caux, P.Y., Kent, R., 2000. Fate, behavior, and aquatic toxicity of the fungicide IPBC in the Canadian environment. *Environ. Toxicol.* 15, 201-213.
- Junghans, M., Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., 2006. Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticide mixtures. *Aquat. Toxicol.* 76, 93-110.
- Juntunen, M.L., Kitunen, V., 2003. Leaching of propiconazole and chlorothalonil during protection of *Pinus sylvestris* seedlings in containers. *Scandinav. J. Forest Res.* 18, 45-53.
- Kingsbury, P.D., Kreutzweiser, D.P., 1987. Permethrin treatments in Canadian forests. Part 1: impact on stream fish. *Pestic. Sci.* 19, 35-48.
- Kreuger, J., 1998. Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990-1996. *Sci. Total Environ.* 216, 227-251.
- Kreutzweiser, D.P., Kingsbury, P.D., 1987. Permethrin treatments in Canadian forests. Part 2: impact on stream invertebrates. *Pestic. Sci.* 19, 49-60.

- Krogh, K.A., Halling-Sorensen, B., Mogensen, B.B., Vejrup, K.V., 2003. Environmental properties and effects on nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere* 50, 871-901.
- Kronvang, B., Laubel, A., Larsen, S.E., Friberg, N., 2003. Pesticides and heavy metals in Danish streambed sediment. *Hydrobiologia* 494, 93-101.
- Lauridsen, R.B., Friberg, N., 2005. Stream macroinvertebrate drift response to pulsed exposure of the synthetic pyrethroid lambda-cyhalothrin. *Environ. Toxicol.* 20, 513-521.
- Lebkowska, M., Zaleska-Radziwill, M., Rutkowska-Narozniak, A., Kobiela, S., 2003. Toxicity assessment of wood preservatives. *Environ. Int.* 28, 801-802.
- Levine, S.L., Oris, J.T., Denison, M.S., 1999. Modulation of Cyp1A expression in rainbow trout by a technical grade formulation of propiconazole. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2565-2573.
- Liess, M., Schulz, R., Liess, M.H.D., Rother, B., Kreuzig, R., 1999. Determination of insecticide contamination in agricultural headwater streams. *Wat. Res.* (33, 239-247.
- Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Uber kombinationswirkungen. 1. Mitteilung: hilfsmittel der fragestellung. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 114, 313-326.
- Lyytikäinen, M., Sormunen, A., Peraniemi, S., Kukkonen, J.V.K., 2001. Environmental fate and bioavailability of wood preservatives in freshwater sediments near an old sawmill site. *Chemosphere* 44, 341-350.
- McCahon, C.P., Pascoe, D., 1988a. Use of *Gammarus pulex* (L.) in safety evaluation tests: culture and selection of a sensitive life stage. *Ecotox Environ Saf* 15, 245-252.
- McCahon, C.P., Pascoe, D., 1988b. Culture techniques for three freshwater macroinvertebrate species and their use in toxicity tests. *Chemosphere* 17, 2471-2480.
- Meliyan, R.I., 1991. Effects of pesticides on reproductive function of the freshwater amphipod *Gammarus kischineffensis*. *Gidrobiologicheskij zhurnal* 27, 107-111.
- Mian, L.S., Mulla, M.S., 1992. Effects of pyrethroid insecticides on nontarget invertebrates in aquatic ecosystems. *J. Agric. Entomol.* 9, 73-98.
- Mortensen, S.R., Johnson, K.A., Weisskopf, C.P., Hooper, M.J., Lacher, T.E., Kendall, R.J., 1998. Avian exposure to pesticides in Costa Rican banana plantations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 562-568.
- Munier-Lamy C., Borde, O., 2000. Effect of a triazole fungicide on the cellulose decomposition by the soil microflora. *Chemosphere* 41, 1029-1035.
- Neumann, M., Schulz, R., Scafer, K., Muller, W., Mannheler, W., Liess, M., 2002. The significance of entry routes as point and non-point sources of pesticides in small streams. *Wat. Res.* 36, 835-842.
- Neumann, M., Liess, M., Schulz, R., 2003a. A qualitative sampling method for monitoring water quality in temporary channels or point sources and its application to pesticide contamination. *Chemosphere* 51, 509-513.
- Papaefthimiou, C., Theophilidis, G., 2001. The Cardiotoxic Action of the Pyrethroid Insecticide Deltamethrin, the Azole Fungicide Prochloraz, and their Synergy on the Semi-Isolated Heart of the Bee *Apis mellifera macedonica*. *Pest. Biochem. Physio.* 69, 77-91.
- Paul, E.A., Simonin, H.A., Tomajer, T.M., 2005. A comparison of the toxicity of synergized and technical formulations of permethrin, sumithrin, and resmethrin to trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 251-259.

- Pilling, E.D., Bromleychallenor, K.A.C., Walker, C.H., Jepson, P.C., 1995. Mechanism of Synergism between the Pyrethroid Insecticide λ -Cyhalothrin and the Imidazole Fungicide Prochloraz, in the Honeybee (*Apis mellifera* L.). Pestic. Biochem. Physio. 51, 1-11.
- Rayzal, M., 1998. Guide de la préservation du bois. CTBA Edition, Paris.
- Sanchez-Fortun, S., Barahona, M.V., 2005. Comparative study on the environmental risk induced by several pyrethroids in estuarine and freshwater invertebrate organisms. Chemosphere 59, 553-559.
- Scholze, M., Boedeker, W., Faust, M., Backhaus, T., Altenburger, R., Grimme, L.H., 2001. A general best-fit method for concentration-response curves and the estimation of low-effect concentrations. Environ. Tox. Chem. 20, 448-457.
- Schulz, R., Liess, M., 1999b. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. Aquat. Toxicol. 46, 155-176.
- Shires, S.W., 1983. The use of small enclosures to assess the toxic effects of cypermethrin on fish under field conditions. Pestic. Sci. 14, 475-480.
- Solomon, K.R., Giddins, J.M., Maund, S.J., 2001. Probabilistic risk assessment of cotton pyrethroids: I. Distributional analyses of laboratory aquatic toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 20, 652-659.
- Sprague, J.B., 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. Wat. Res. 4, 3-32.
- Stephenson, R.R., 1982. Aquatic toxicology of cypermethrin. I. Acute toxicity to some freshwater fish and invertebrates in laboratory tests. Aquat. Toxicol. 2, 175-185.
- Stephenson, R.R., 1983. Effects of water hardness, water temperature, and size of the test organism on the susceptibility of the freshwater shrimp *Gammarus pulex* (L.) to toxicants. Bull Environ Contam Toxicol 31, 459-466.
- Stratton, G.W., 1985. The influence of solvent type on solvent-pesticide interactions in bioassays. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 14, 651-658.
- Thompson, H.M., 1996. Interactions between pesticides; a review of reported effects and their implications for wildlife risk assessment. Ecotoxicology 5, 59-81.
- Tierney, K.B., Taylor, A.L., Ross, P.S., Kennedy, C.L., 2006. The alarm reaction of coho salmon parr is impaired by the carbamate fungicide IPBC. Aqua. Toxicol. 79, 149-157.
- Vandame, R., Belzunces, L.P., 1998. Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation. Neurosciences Letters 251, 57-60.
- Welton, J.S., 1979. Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream. Fresh. Biol. 9, 263-275.
- Van Wijngaarden, R.P.A., Cuppen, J.G.M., Arts, G.H.P., Crum, S.J.H., Van den Hoorn, M.W., Van den Brink, P.J., Brock, T.C.M., 2004. Aquatic risk assessment of a realistic exposure to pesticides used in bulb crops: a microcosm study. Environ. Toxicol. Chem. 23, 1479-1498.
- Wogram, J., Liess, M., 2001. Rank ordering of macroinvertebrate species sensitivity to toxic compounds by comparison with that of *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 67, 360-367.
- Zwart, D., Posthuma, L., 2005. Complex mixture toxicity for single and multiple species: proposed methodologies. Environ. Toxicol. Chem 24, 2665-2676.

c) Conclusions de l'étude

Des quatre pesticides testés, la cyperméthrine est de loin le plus toxique pour *G. pulex* : sa CL50 est de 0,09 µg.L⁻¹ après 96 h d'exposition. La présente étude a également montré qu'une synergie entre la cyperméthrine, le tébuconazole, le propiconazole et l'IPBC a lieu à certains ratios entre ces pesticides. La présence d'adjuvants commerciaux est également susceptible de fortement augmenter la toxicité du mélange de ces matières actives.

Cette étude a donc montré que l'impact des produits de traitement du bois est souvent sous-évalué, et qu'une évaluation pertinente du risque doit prendre en compte la toxicité de la solution commerciale dans son ensemble, ainsi que les différents ratios de substances toxiques auxquels sont exposés les organismes aquatiques dans leur milieu.

Ce travail vise notamment à une meilleure évaluation de la vulnérabilité de *G. pulex* et de *G. fossarum* aux produits de traitement du bois. Le précédent chapitre a permis de documenter la sensibilité de *G. pulex* à ces substances, mais on ne dispose pas d'information quant à la tolérance de *G. fossarum* à ces substances. L'usage équivalent ou non de ces deux espèces à des fins bioindicatrices doit donc être vérifié. En outre, la vulnérabilité de ces espèces dépend aussi des variations de sensibilité physiologique inter- et intra-populationnelles. L'étude de la vulnérabilité de *G. pulex* et de *G. fossarum* doit donc prendre en compte des variations de sensibilité à plusieurs échelles : entre espèces, entre populations et entre individus.

Le chapitre suivant compare la sensibilité de *G. pulex* à celle de *G. fossarum*, et traite de la différence de sensibilité selon l'origine de la population et du stade de développement de ces deux espèces en prenant le cas d'une cinquième substance fréquemment utilisée au niveau d'aires de traitement du bois, à savoir la deltaméthrine.

IV.2. Etude des différences de sensibilité des populations de *G. pulex* et *G. fossarum* en fonction de leur origine géographique et du stade de développement.

a) Introduction

L'usage de *G. pulex* et *G. fossarum* à des fins bioindicatrices doit notamment tenir compte de leur différence de sensibilité aux contaminants. Il n'existe pas, à notre connaissance, d'information relative à cette différence de sensibilité interspécifique dans la littérature. Une évaluation du risque pertinente pour les populations de ces amphipodes doit également tenir compte de la variabilité de leur sensibilité selon leur origine géographique. Ce type d'information est également très peu documenté dans la littérature. Enfin, une meilleure compréhension des processus d'impact des produits de traitement du bois sur les populations de *G. pulex* et *G. fossarum*, particulièrement les différences de réponses observées entre adultes et juvéniles (chapitre III), nécessite de documenter la différence de sensibilité physiologique entre ces deux stades de développement. A notre connaissance, seuls McCahon et Pascoe (1988a) ont évalué cette différence de sensibilité : la tolérance au cadmium des *G. pulex* adultes s'est avérée 250 fois plus grande que celle des juvéniles. La différence de sensibilité entre ces stades de développement n'est donc pas documentée pour les pesticides organiques chez *G. pulex*, et pas documenter du tout chez *G. fossarum*.

Afin de répondre à ces objectifs de meilleure compréhension des processus d'impact et d'évaluation du risque pour *G. pulex* et *G. fossarum*, des tests d'écotoxicité dans des conditions similaires à celles décrites dans le chapitre précédent ont été effectués avec de la deltaméthrine. Cet insecticide de la famille des pyréthrinoïdes de synthèse, non testé dans le chapitre précédent, est utilisé pour les traitements préventifs occasionnels des grumes stockées avant sciage.

b) Etude

Les auteurs de l'article suivant (en cours de soumission) sont Olivier Adam, Davis Bouché, François Degiorgi, Gregorio Crini, Pierre-Marie Badot

Variability in *Gammarus pulex* (L.) and *Gammarus fossarum* (K.) sensitivity to the pyrethroid insecticide deltamethrin: outcomes for risk assessment.

Abstract

To provide comparative ecotoxicological data for a relevant risk assessment, difference of sensitivity occurring between species, developmental stages, and geographical origins of populations must be assessed. To investigate this variability of sensitivity among natural populations the lethality of deltamethrin, a commonly used pyrethroid insecticide, was assessed on juvenile and adult *Gammarus fossarum* and *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) sampled in seven sites. *G. fossarum* adults were about twofold more sensitive to deltamethrin than adult *G. pulex*, 96-h LC50 being respectively 33.2 and 68.0 ng.L⁻¹. A hierarchical cluster analysis indicated that response to contaminant was similar between two close geographical origins, i.e. inside a population. However, significant difference of sensitivity was observed between these populations: some *G. pulex* populations were more sensitive to deltamethrin than some *G. fossarum* populations. These differences in sensitivity corresponded rather to a biological variability occurring between natural populations than to a tolerance mechanism. 48-h LC50 in *G. fossarum* and *G. pulex* juveniles were 4.0 and 5.7 ng.L⁻¹. Then, juveniles of both tested species were about 14 to 22 fold more sensitive to deltamethrin than adults. Therefore, lethal effect of deltamethrin on *Gammarus sp.* populations was rather defined by juvenile sensitivity, that were also the highest population component, than by adult tolerance. According to the difference in sensitivity observed among populations and development stages, risk assessment should integrate a factor of at least 40 and 60 on adult LC50s to assess similar deltamethrin effects on the most sensitive specimens of *G. pulex* and *G. fossarum* tested populations.

Keywords: pesticide; tolerance; lethality; developmental stage; population; amphipod

1. Introduction

Gammarus pulex (L.) and *Gammarus fossarum* (K.) are widely distributed in Europe and in other parts of the world (Karaman and Pinkster, 1977; Welton, 1979; Janetzky, 1994). These both species are a major component of aquatic biomass in numerous freshwater ecosystems (Rosillon, 1985; Ladewig, 2006). As detritus feeder, these amphipods are known to display a strong functional role in nutrient cycling (Welton, 1979; McNeil et al., 1997). As predator of

other freshwater invertebrates they are known likely to display a strong structural role in many communities composition (McNeil et al., 1997; Kelly et al., 2002). Furthermore, these species are among the most eaten prey items for many fish species (Maitland, 1966). Therefore, *G. pulex* and *G. fossarum* are key organisms in many freshwater ecosystems.

G. pulex has been revealed to be among the most sensitive aquatic invertebrates to numerous contaminants (Helson and Surgeoner, 1986; Mian and Mulla, 1992; Schulz and Liess, 1999; Van Wijngaarden et al., 2004 and 2006). Moreover, numerous headwater streams, that are preferential living zone of these both species, are frequently contaminated by numerous pesticides (Kreuger, 1998; Berenzen et al., 2005). Then, because of its ecological importance, its high sensitivity, and because it can be quite easily grown in the laboratory, *G. pulex* is among the most widely used test organisms in ecotoxicological studies for many years (Stephenson, 1983; McCahon and Pascoe, 1988).

Despite their similar ecological role, the current knowledge about *G. fossarum* sensitivity to pollutants remains relatively poor in comparison to *G. pulex*. For instance, to our knowledge no comparative data are available on their respective sensitivity to contaminants, and therefore on respective vulnerability of their natural populations to pesticide contaminations. Thus, difference of sensitivity between species must be assessed to provide comparative data between studies, and then to have a relevant risk assessment for these both species. Furthermore, difference of sensitivity to contaminants could occur between developmental stages of *Gammarus sp.* (McCahon and Pascoe, 1988). Then, ecotoxicological data obtained with different developmental stages could not be compared without an assessment on their difference of sensitivity to pollutants.

In a same way, genetic, biological and physiological variability occurring between *G. fossarum* populations (Meyran et al., 1998; Müller et al., 2000; Schirling et al., 2005) can also modulate the responses of organisms to pollutants (Picado et al., 2007). Thus, available toxicological and ecotoxicological data remained specific to a tested population. Thus, relevant risk assessment must assessed difference of sensitivity occurring between geographical origins of populations to perform comparative data obtained with several wild *Gammarus sp.* population sources. Therefore, to be relevant, risk assessment must used comparative ecotoxicological data between studies by assessing difference of sensitivity occurring between species, developmental stages, and geographical origins of populations.

This study aimed to document and to assess the difference of sensitivity to pesticides among some *G. pulex* and *G. fossarum* populations. The pyrethroid insecticide deltamethrin was

retained as test molecule, pyrethroids being among insecticides the most used throughout the world and being very highly toxic for many freshwater invertebrates (Coats et al., 1989; Mian and Mulla, 1992; Amweg et al., 2005). *G. pulex* and *G. fossarum* populations sampled in seven sites were tested. Deltamethrin lethality was studied with respect to species, developmental stages (juvenile versus adult specimens), and spatial origins of natural populations.

2. Material and Method

2.1. Sampling sites of tested populations

Sampling sites were established in seven headwater streams running in Jura Mountains, Eastern France. Location and hillside characteristics of sampling sites are given in Table IV.5 and Figure IV.4.

The *ruisseau des Dames* was a tributary of the *ruisseau des Buthiers*. It flowed through a forest and very few anthropic activities were located on its hillsides. It was disconnected from its confluent by a small chute.

The *Drésine* experimental site was located just in the upstream of a small village, near its source in a wetland. Left hillside was mainly covered by woods and right hillside by pastures, a few dwellings and farms being established near the stream above the sampling site.

The *Petits Biefs* was a small size tributary of the *Drésine*. Hillsides were covered only by forest and meadows, and very scarce anthropic activities occurred in this area. The sampling site was established about 130 meters in the upstream of the confluence with the *Drésine*.

The *Bief Belin* sampling site was implanted 300 meters above its confluence with the *ru de la Goutte d'Or*. Hillsides of *Bief Belin* were mainly covered by meadows and woods from its source in a wetland to its confluence with a peat-bog creek. A small village was established a few hundreds meters above its source.

The *ru de la Goutte d'Or* was a small size tributary of *Bief Belin* flowing through a meadow. No anthropic activity occurred in this area. The sampling site was established 420 meters above its confluence with *Bief Belin*.

The first sampling site along *Rivière Drugeon* was implanted in a village, hillsides being mainly covered by dwellings and pastures. The second *Rivière Drugeon* sampling site was located in a wetland, 1200 meters in the downstream of site 1 and about 400 meters in the downstream of a wood treatment area using pesticides notably deltamethrin.

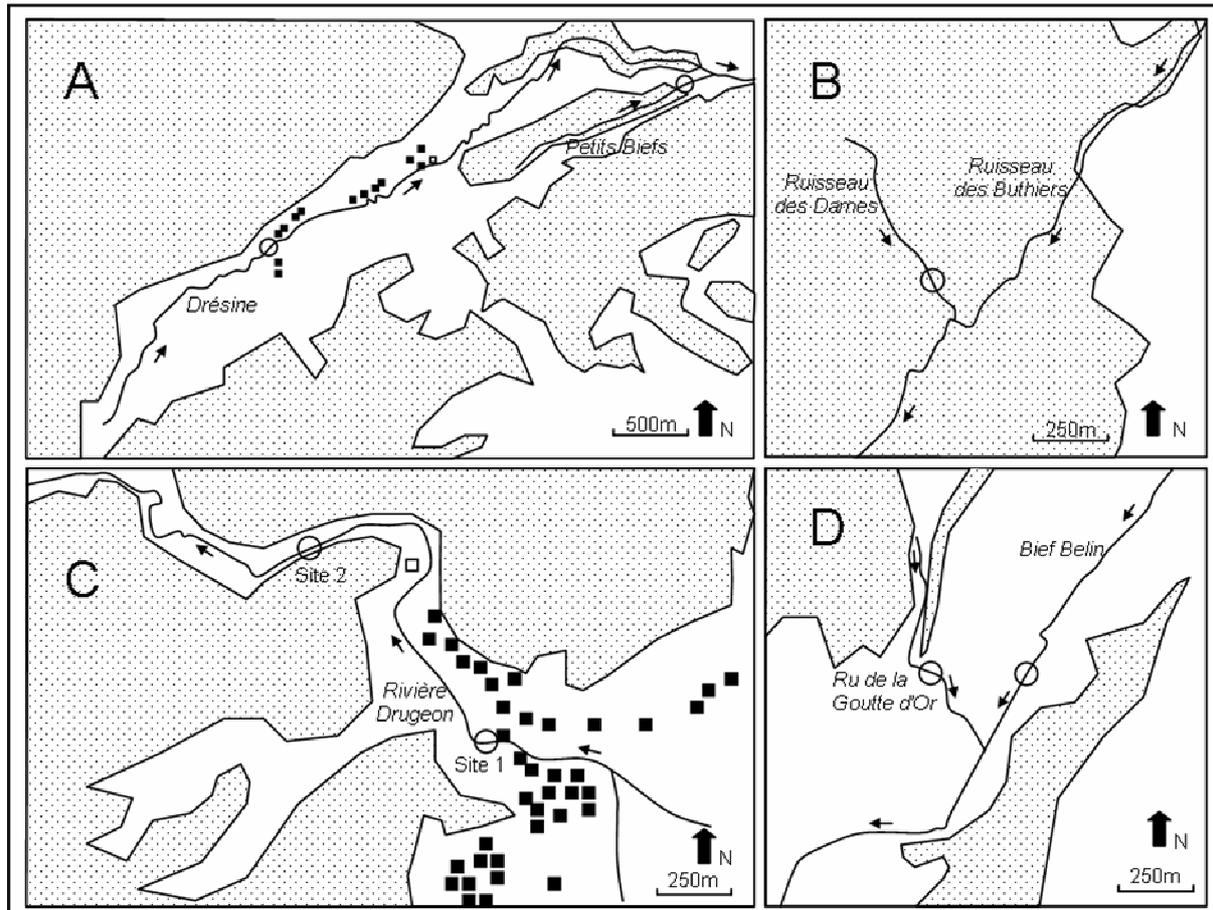


Figure IV.4. Experimental sites showing sampling areas (circle), wood cover (dotted areas), dwellings (black rectangles), and wood treatment areas (white rectangles). *G. fossarum* populations were sampled in ruisseau de la Drésine, Petits Biefs (A) and in ruisseau des Dames (B), and sampling of *G. pulex* populations was performed along rivière Drugeon (C), in Bief Belin and ruisseau de la Goutte d'Or (D).

Sampling site	<i>Ruisseau des Dames</i>	<i>Drésine</i>	<i>Petits Biefs</i>	<i>Ru de la Goutte d'Or</i>	<i>Bief Belin</i>	<i>Drugeon (site 1)</i>	<i>Drugeon (site 2)</i>
Latitude	N47°24'42.9"	N46°45'00.3"	N46°45'30.8"	N46°49'09.7"	N46°49'09.0"	N46°48'46.6"	N46°49'07.1"
Longitude	E006°03'31.8"	E006°12'15.4"	E006°14'24.0"	E006°16'03.4"	E006°16'17.6"	E006°14'53.2"	E006°14'27.9"
Distance (m) from source	600	1400	1500	500	1860	440	1670
Distance (m) of confluence	170	6000	130	330	1640	29500	28300
Confluence	<i>Ruisseau des Buthiers</i>	<i>Lac de Rémoray</i>	<i>Drésine</i>	<i>Bief Belin</i>	Peat-bog's creek	<i>Doubs</i>	<i>Doubs</i>
Width (m)	0.6	1.3	0.3	0.3	0.4	6	7
Depth (cm)	15	20	5	10	10	40	40
Altitude (m)	250	950	870	888	886	866	858
Hillsides cover	Forest	Pasture Farms Woods	Woods Pasture	Pasture Woods	Pasture Woods	Village Wetland	Village Wetland Woods

Table IV.5. Location and main hillside cover of the experimental sites.

2.2. Population sampling and identification

Populations were sampled with a with 0.5 mm mesh bag and quadrat area of 0.05 m² (Surber sampler). Field densities were assessed by sampling populations in the main substrates occurring in sampling sites, i.e. gravel, bryophyte populations (*Fontinalis sp.*), and litter. Population structure was assessed by ranging individuals in four size categories: juvenile (<3mm), young specimens (3-5mm), immature specimens (5-7mm) and adult (>7mm), and by measuring their respective ratio among the overall population.

Population samples were acclimatized with their substrate a few days in a laboratory room at 15°C. Then adults (>7mm) and juveniles (<3mm) visibly free from parasite were manually separated from other individuals and placed in Volvic® water at 15°C at least 10 days prior to ecotoxicological tests.

At least 100 adult individuals from each sampling site were examined using a Wild M3B microscope (Leica) with a magnification up to 40x. Each site displays only one *Gammarus* species: *G. pulex* or *G. fossarum*. *G. pulex* (L.) was distinguished from *G. fossarum* (K.) by the setation of the second antenna, as well as by the length of the inner ramus of the third uropod, which was approximately 2/3 of the outer ramus (Karaman and Pinkster, 1977).

2.3. Chemicals

Technical deltamethrin diluted in cyclohexane (Pestanal®, CAS numbers 52918-63-5, 98.0% of purity) was purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Seelze, Germany). Dilutions were performed with mineral water (Volvic® from Danone, Tab. IV.6). These dilutions were made immediately before ecotoxicological tests.

Chemicals	Concentration (mg.L ⁻¹)
Calcium	11.5
Magnesium	8.0
Sodium	11.6
Potassium	6.2
Bicarbonates	71.0
Chlorites	13.5
Nitrates	6.3
Sulfates	8.1
Silica	31.7

Table IV.6. Composition of mineral water (Volvic®) used for dilutions and laboratory acclimatization of *Gammarus sp.*.

2.4. Acute toxicity test

Acute toxicity tests were performed with adults and juveniles from each sampling site. Ten acclimatized individuals were randomly chosen and introduced in a test chamber (100 mL glass container). At least 6 replicates were used for each acute test concentration using adult individuals. At least 3 replicates were performed at each tested concentration when juvenile specimens were used. The lethality of deltamethrin solutions (0-0.10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) was investigated after 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h of exposure. Because deltamethrin required the use of cyclohexane to be dissolved, solvent lethality was tested. In a same way, Volvic® water controls were systematically assayed.

Dissolved oxygen was equal to $55 \pm 6\%$ of saturation after 96h exposition in static environment. Conductivity was $263 \pm 9 \mu\text{S.cm}^{-1}$ and pH was 7.01 ± 0.02 . Temperature was maintained at 15°C .

2.5. Fit model

Toxicity dose-dependent relationship was calculated as it follows by Hill's fit model with the Regtox software (Vindimian et al., 1999):

$$f(x) = \frac{x^{nH}}{x^{nH} + EC50^{nH}}$$

where nH is the Hill's number characterising steepness in the inflexion point of the dose-response relationship. Lethal concentrations LC_x were calculated using the inverse function of the fit model, and the corresponding statistical uncertainty, i.e. 95% confidence interval, was estimated by a bootstrap approach.

2.6. Statistical and cluster analysis

Cluster analysis (CA) aims to uncover some latent structure of the objects in terms of groups of similar elements. Hierarchical agglomerative clustering provides intuitive similarity relationships between any one sample and the entire data set. It is typically illustrated by a dendrogram that provides a picture of the group and their proximity, with a reduction in the dimensionality of the original data. In this study, hierarchical agglomerative CA was employed to investigate associations between spatial origins of specimens. It was performed on the standardized data set of adult mortality rates. The distance was computed with Gower's method which gives dissimilarity index between two samples following the equation:

$$d_{jk} = \sum \frac{x_{ij} - x_{jk}}{\max(x_i) - \min(x_i)}$$

The complete linkage method was applied to find similar clusters.

Significance of differences was assessed using Wilcoxon-Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests. Statistical analysis, CA and dendrogram were performed by R2.2.0© software.

3. Results

Field densities of the sampled *Gammarus sp.* populations were ranged between 2 080 and 61 320 ind.m⁻². Highest values were recorded in bryophyte and litter samples. Populations of both species were composed by 30 to 45% of juveniles (< 3 mm), 17% to 50% of young specimens (between 3 and 5 mm), 6% to 22% of immature specimens (between 5 and 7 mm), and only 2 to 20% of adults (> 7 mm). This study focuses on the most and the less abundant developmental stages among sampled populations, i.e. juveniles and adults (Tab. IV.7).

Sampling site	<i>Ruisseau des Dames</i>	<i>Drésine</i>	<i>Petits Biefs</i>	<i>Ru de la Goutte d'Or</i>	<i>Bief Belin</i>	<i>Drugeon</i> (site 1)	<i>Drugeon</i> (site 2)
<i>Gammarus sp.</i> populations	<i>G. fossarum</i>	<i>G. fossarum</i>	<i>G. fossarum</i>	<i>G. pulex</i>	<i>G. pulex</i>	<i>G. pulex</i>	<i>G. pulex</i>
Population densities in bryophyte settlement (ind.m ⁻²)		61320		54360	37120	29520	56940
Population densities in litter (ind.m ⁻²)	44040		35460				
Population densities in gravel (ind.m ⁻²)	5260	2840	2980	7060	2080	2500	2200
Proportion of juveniles (<3mm) among the population (%)	48%	28%	30%	41%	41%	40%	35%
Proportion of young specimens (3-5mm) among the population (%)	44%	24%	34%	17%	21%	26%	50%
Proportion of immature specimens (5-7mm) among the population (%)	6%	13%	21%	22%	20%	18%	13%
Proportion of adults (>7mm) among the population (%)	2%	15%	15%	20%	18%	16%	2%

Table IV.7. Field densities (ind.m⁻²) of *Gammarus sp.* populations sampled in bryophyte settlement, litter and gravel, and proportion (%) of the four size categories (< 3 mm, 3-5 mm, 5-7 mm, and > 7mm) among the overall population in the experimental sites.

No significant difference was recorded between water and solvent controls. Then, the effect measured in the tests, i.e. mortality, was related to deltamethrin lethality. Adult mortality observed by water controls varied from 0 to 2.5% after 24 h of exposure and steadily increased to 15.0% after 96 h of exposure. Juvenile mortality recorded in controls from each

tested population significantly increased ($p=0.040$) between 48h of exposure (0-10%) and 72h of exposure (3-37.5%). Then, lethal concentrations of deltamethrin for *Gammarus sp.* given in this study will be those obtained after 48h of exposure for juveniles and after 96h of exposure for adults.

Compared to water controls, lethality caused by deltamethrin was significant ($p=0.002$) even at the lowest tested concentration: 34.5 and 38.0% of *G. fossarum* and *G. pulex* juveniles died after 48h of exposure to 1 ng.L^{-1} of deltamethrin (Fig. IV.5).

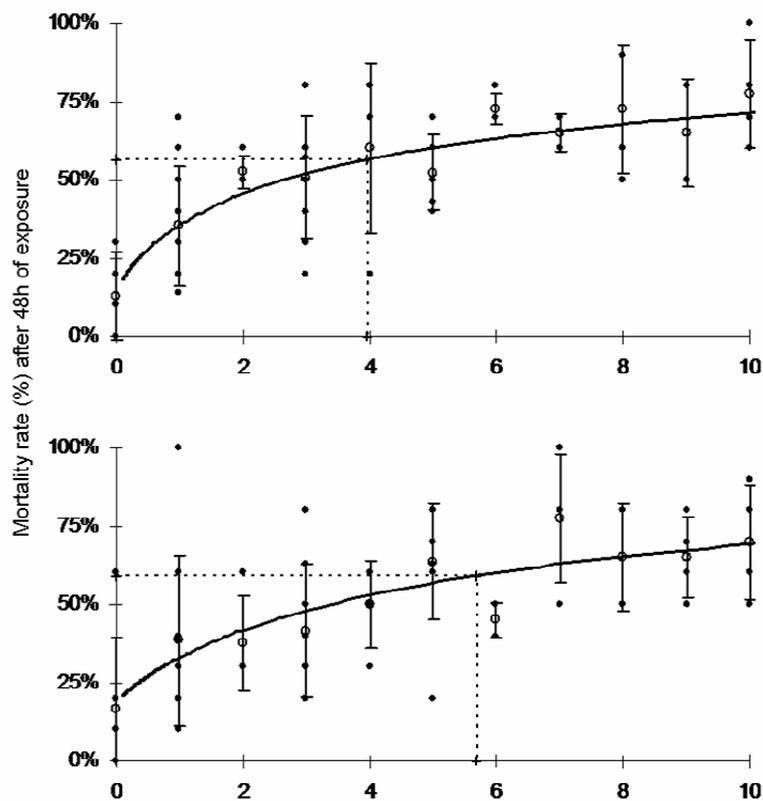


Figure IV.5. Dose-response curves obtained by Hill's model after 48 h of exposure of *G. fossarum* (A) and *G. pulex* (B) juveniles to deltamethrin. Percentages correspond to mortality (%). Deltamethrin concentrations are expressed in ng.L^{-1} . White plots represent the mean (+/-Standard Error) of replicates. Replicates are indicated with black plots. Broken line indicates LC50.

Deltamethrin 48-h LC50 in *G. fossarum* and *G. pulex* juveniles were respectively 4.0 ng.L^{-1} ($2.5\text{-}6.3 \text{ ng.L}^{-1}$, 95% IC) and 5.7 ng.L^{-1} ($3.1\text{-}9.9 \text{ ng.L}^{-1}$, 95%IC). *G. pulex* and *G. fossarum* juveniles were similarly impaired by deltamethrin, no significant difference of sensitivity having been observed between juveniles of these both species (Fig. IV.5).

Deltamethrin 96-h LC50 in *G. fossarum* and *G. pulex* adults were respectively 33.2 ng.L^{-1} ($22.6\text{-}44.3 \text{ ng.L}^{-1}$, 95% IC) and 68.0 ng.L^{-1} ($61.4\text{-}73.6 \text{ ng.L}^{-1}$, 95% IC). Mortality in *G.*

fossarum adults exposed to deltamethrin was significantly higher ($p=0.009$) than observed in *G. pulex* adults (Fig. IV.6).

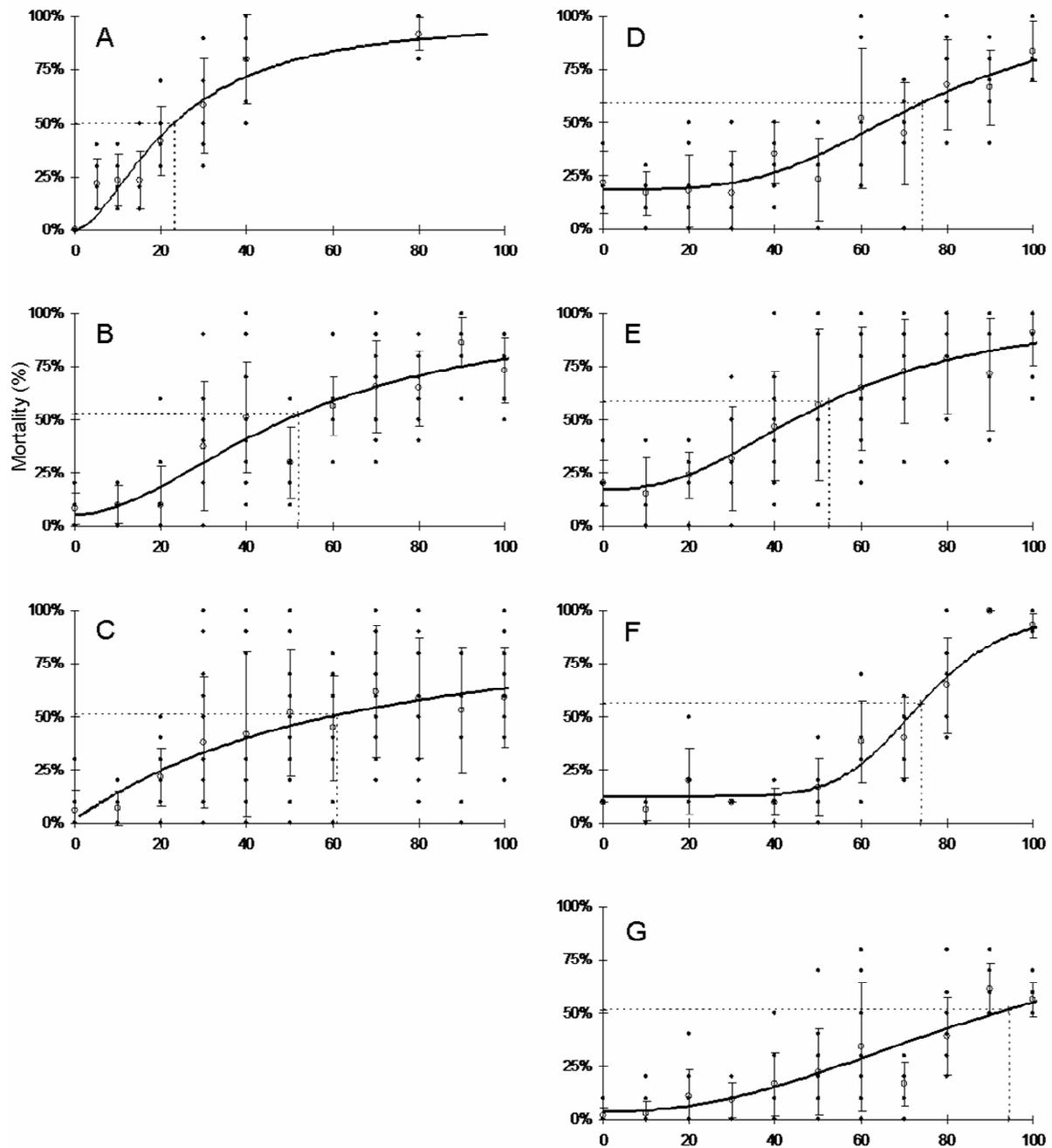


Figure IV.6. Dose-response curves obtained by Hill's model after 96 h of exposure to deltamethrin of adult *G. fossarum* sampled in *ruisseau des Dames* (A), *ruisseau de la Drésine* (B) and *Petits Biefs* (C); and of adult *G. pulex* sampled in *rivière Drugeon* (site 1 = D, site 2 = E), and *ru de la Goutte d'Or* (F), and *Bief Belin* (G). Percentages correspond to adult mortality (%), and deltamethrin concentrations are expressed in ng.L^{-1} . White plots represent the mean ($\pm 95\%$ CI) of at least 6 replicates that are indicated with black plots. Broken lines indicated the 96-h LC50.

In one hand, no difference of deltamethrin lethality was recorded between juveniles of *Gammarus sp.* populations sampled in the seven sites. On the other hand, deltamethrin lethality for adults depended of the spatial origin of these specimens: 96-h LC50 in tested populations of *G. fossarum* and *G. pulex* adults were respectively ranged from 22.9 to 61.0 ng.L⁻¹ and from 52.5 and 94.3 ng.L⁻¹ (Fig. IV.7). Then, significant differences of mortality of adults were observed between populations from a same species ($p=0.020$ for *G. fossarum* and $p<0.001$ for *G. pulex*).

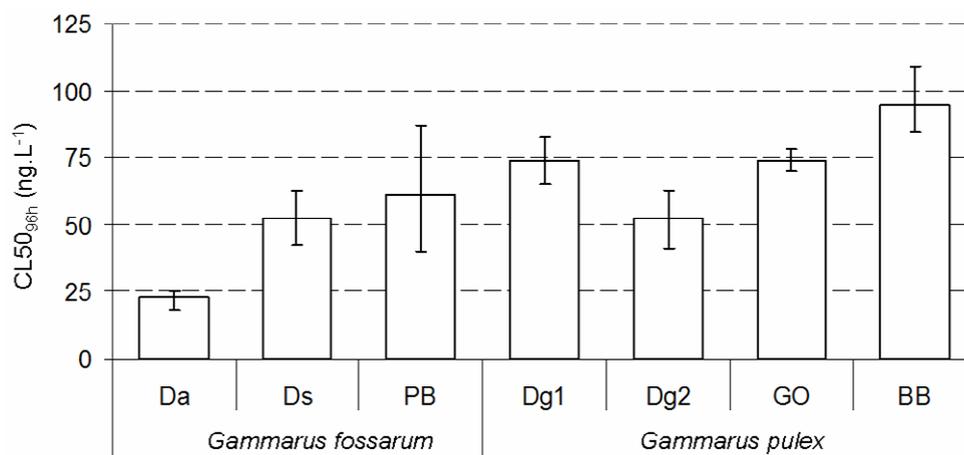


Figure IV.7. Bars indicate lethal concentrations for 50% of adult *G. pulex* or adult *G. fossarum* individuals. LC50s were obtained after 96h of exposure to deltamethrin (ng.L⁻¹). Populations tested were sampled in each of the seven studied sites. Error bars indicate 95% interval confidence. Da = ruisseau des Dames ; Ds = ruisseau de la Drésine ; PB = Petits Biefs ; Dg1 = rivière Drugeon (site 1) ; Dg2 = rivière Drugeon (site 2) ; GO = ru de la Goutte d'Or ; BB = Bief Belin.

This tolerance variability among populations could be higher than the difference of sensitivity occurring between the both species. For instance, despite the overall higher sensitivity of *G. pulex* to deltamethrin comparing to *G. fossarum*, 96-h LC50 of *G. pulex* adults sampled in the site 2 of *Rivière Drugeon* was lower than 96-h LC50 obtained in *G. fossarum* adults sampled in *Petits Biefs* (Fig. IV.7). Then, the hierarchical cluster analysis has shown that the dissimilarity of sensitivity could be greater between both species than between some tested populations. Closest spatial origins of adult specimens provided the less dissimilar responses to deltamethrin (Fig. IV.8): *Petits Biefs* and *Drésine*, site 1 and 2 along *Rivière Drugeon*, *Bief Belin* and *ruisseau de la Goutte d'Or* (Fig. IV.4).

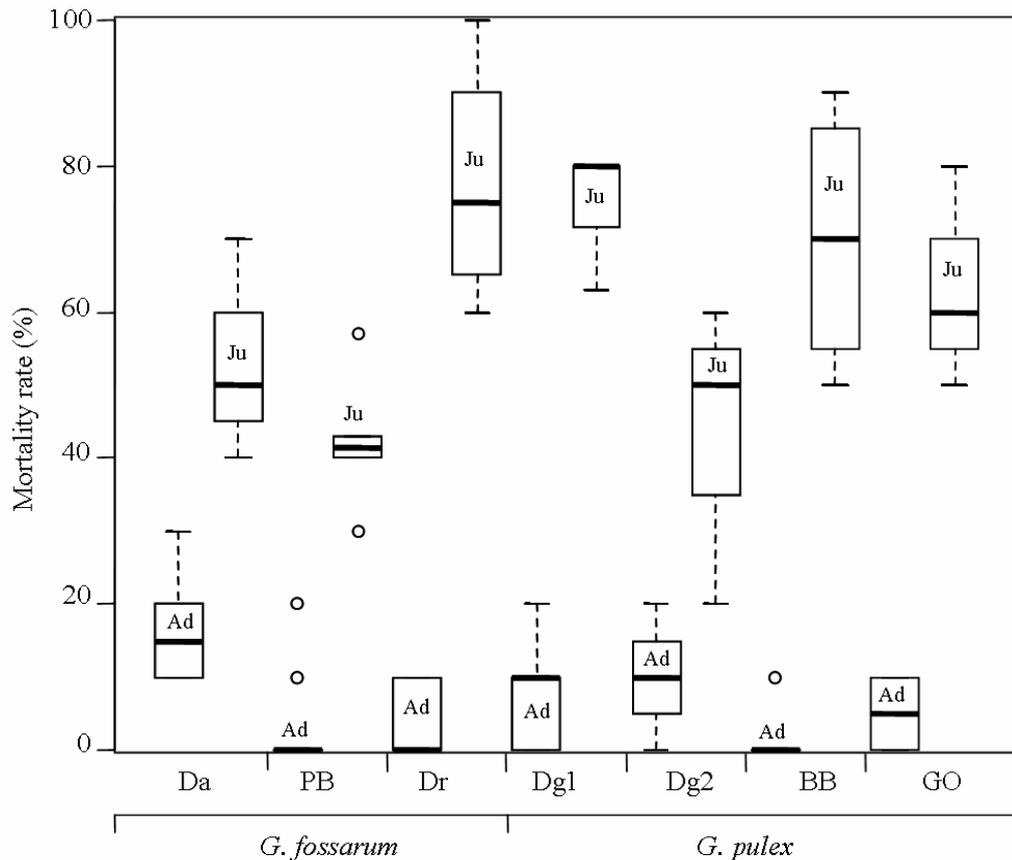


Figure IV.9. Mortality rate (%) after 48h of exposure to 5 ng.L⁻¹ of deltamethrin of juvenile (Ju) and adult (Ad) *Gammarus* sp. sampled in the seven studied sites. The medians are indicated by horizontal lines, 25% and 75% quartiles are indicated by boxes, error bars presenting standard deviation, and white circle plots being outputs. *G. fossarum* was sampled in *ruisseau des Dames* (Da), *Petits Biefs* (PB) and *ruisseau de la Drésine* (Ds). *G. pulex* was sampled in *rivière Drugeon* (site 1 = Dg1, and site 2 = Dg2), *Bief Belin* (BB), and *ru de la Goutte d'Or* (GO).

4. Discussion

Acute toxicity of deltamethrin for *Gammarus* sp. is insufficiently documented in literature. Despite their large distribution areas and ecological importance, no comparative data are currently available on *G. pulex* and *G. fossarum* sensitivity to pesticides. Deltamethrin 48-h LC50 has been reported to be 30 ng.L⁻¹ for *G. pulex*. However, tested solution was a formulated product and not a technical one (WHO, 1990). The present study shows that both *G. pulex* and *G. fossarum* were highly sensitive to deltamethrin. Furthermore, *G. fossarum* adults were (96-h LC50 = 33.2 ng.L⁻¹) about twofold more sensitive to deltamethrin than *G. pulex* adults (96-h LC50 = 68 ng.L⁻¹). Thus, *G. pulex* being also more ubiquitous than *G. fossarum* (Maitland, 1966; Janetzky, 1994), one can presume that *G. fossarum* is more vulnerable than *G. pulex* to pesticide contaminations.

Juveniles of both tested species were about 14.0 to 22.2 fold more sensitive to deltamethrin than adults, and were then very highly sensitive to deltamethrin. Similar observations on the influence of *G. pulex* age on its sensitivity to toxics were made by McCahon and Pascoe (1988): juveniles have been revealed to be 250 fold more sensitive to cadmium than adults. In a same way, Maund et al. (1992) have shown in a mesocosm experiment that *G. pulex* juveniles were more sensitive to copper than adults. Thus, young *G. pulex* and *G. fossarum* would be more sensitive than adults to pollutants. In a same way, variations in sensitivity to deltamethrin with age were observed for many crustacean species. For instance, deltamethrin also displayed a higher lethal effect on *D. magna* neonates than on juveniles (Xiu et al., 1989). Then, environmental exposure to deltamethrin acute concentrations will lead to the selection of the most tolerant specimens. Furthermore, such selection will be more drastic on the most sensitive developmental stage. So, rather than using adults, species sensitivity should be defined by the most sensitive stage, i.e. juvenile. The present data have shown that juveniles of both species displayed similar sensitivity to deltamethrin. Thus, results obtained in ecotoxicological tests with juveniles are relevant and can be compared whatever the species used.

In one hand, *G. fossarum* adults were about twofold more sensitive to deltamethrin than *G. pulex* adults. In the other hand, at a same developmental stage, a high variability in the biologic parameters occurred in natural *Gammarus sp.* populations (Müller et al., 2000; Schirling et al., 2005). For instance, the ratio of 96-h LC50 between the most and the less sensitive tested populations was 1.8 for and 2.7 for *G. pulex* and *G. fossarum* adults. Then, the present study has showed that the intra-specific variability of sensitivity tended to be higher than the inter-specific variability. Therefore, the higher sensitivity of *G. fossarum* adults to deltamethrin than *G. pulex* adults is a trend that must be modulated with the variability occurring between natural populations.

This difference of sensitivity could be related to the presence of tolerant populations in contaminated environments. For instance, the freshwater shrimp *Paratya australiensis* and the cladoceran *Daphnia magna* inhabiting polluted sites were likely to be respectively 3.5 fold and 9 fold more tolerant to organophosphate pesticides than specimens originated from less exposed areas (Olima et al., 1997; Barata et al., 2001). In a same way, acclimation mechanism of the amphipod *Hyalella azteca* was observed after the first exposure periods to toxics (Zhao and Newman, 2006). Thus, the development of tolerance mechanisms to pollutants could lead

to an intra-specific variability of sensitivity among populations. However, no relationship was observed between expected field disturbances and physiological sensitivity to deltamethrin: the highest LC50s were not observed in populations inhabiting the most exposed areas to anthropic activities. Furthermore, despite their high sensitivity to toxics, *Gammarus sp.* populations were mainly composed by youngest individuals as previously observed in unpolluted sites by Welton (1979). In a same way, the high field densities recorded in the experimental sites were in accordance with those observed in reference sites from previous studies (Rosillon, 1985; Janetzky, 1994; Ladewig et al., 2006). Therefore, the variability of sensibility observed in the present study among tested populations was obviously not explained by the development of tolerance mechanisms to pollutants.

Picado et al. (2007) have observed that the natural genetic variability, i.e. independent of a selection process, occurring between *D. magna* clones was also likely to lead to a tolerance variation ranging from about 2 to 13 fold. Natural genetic, physiologic and biologic variability was also observed in *G. fossarum* populations (Meyran et al., 1998; Müller et al., 2000; Schirling et al., 2005). Therefore, the differences of sensitivity observed between *Gammarus sp.* populations were rather related to a natural physiologic variability than to the development of tolerance mechanisms. The response similarity observed between populations sampled in closest sites indicated that these populations were relatively homogeneous in term of sensitivity. This could be related to individual migrations occurring between close connected sampling sites, these amphipods having very high downstream and upstream dispersal potency (Hultin, 1971; Elliott, 2002).

This intra-specific variability in response of natural populations to pollutants must be assessed when using wild *Gammarus sp.* populations in ecotoxicological tests to get toxicity data that would effectively protect most individuals of a particular species. Then, the use of a laboratory grown population would be only relevant for comparing toxicity tests using a same specimen source. The use of field collected animals from an unpolluted source for toxicity tests, as recommended by McCahon and Pascoe (1988) and Olima et al. (1997), would likely to reduce risk of selecting resistant strains.

Risk assessment could be performed by applying a security factor to the concentration producing no observed effect in *Gammarus sp.* populations. For instance, according to the adult tolerance ratio among tested population, this study indicated that at least a factor 1.8 and 2.7 should be used to assess respectively *G. pulex* and *G. fossarum* adults similar lethal effect in the most sensitive tested populations. In a same way, according to the difference of

sensitivity between juveniles and adults, a factor of at least 22.2 and 22.0 must be used for assessing similar lethal effect in the most sensitive specimens of respectively *G. pulex* and *G. fossarum*. Of course, such values are only indicative, tolerance to deltamethrin does not meaning tolerance to other chemicals (Lopes et al., 2005).

In conclusion, the present study shows that deltamethrin lethality for *Gammarus sp.* populations was highest in the youngest specimens that were also the highest population component. Then, according to the tolerance ratio between juveniles and adults, and to the variability of sensitivity occurring between populations, a safety factor of at least 40 and 60 should be applied to LC50s measured in *G. pulex* and *G. fossarum* adults to assess similar lethal effect of deltamethrin on the most sensitive *Gammarus sp.* specimens.

Acknowledgements - The authors are indebted to Agence de l'Eau Rhône, Méditerranée et Corse for financial support. Olivier Adam is indebted to Conseil Régional de Franche-Comté for PhD fellowship. David Bouché is grateful acknowledged for valuable technical assistance.

References

- Amweg, E.L., Weston, D.P., Ureda, N.M., 2005. Use and toxicity of pyrethroid pesticides in the Central Valley, California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 966-972.
- Barata, C., Baird, D.J., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2001. Biochemical factors contributing to response variation among resistant and sensitive clones of *Daphnia magna* Straus exposed to ethyl parathion. *Ecotox. Environ. Saf.* 49, 155-163.
- Berenzen, N., Lentzen-Gogging, A, Probst, M., Schulz, H., Schulz, R., Liess, M., 2005. A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticides concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere.* 58, 683-691.
- Coats, J.R., Symonik, D.M., Bradbury, S.P., Dyer, S.D., Timson, L.K., Atchinson, G.J., 1989. Toxicology of synthetic pyrethroids in aquatic organisms: an overview. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 671-679.
- Elliott, J.M., 2002. The drift distances and time spent in the drift by freshwater shrimps, *Gammarus pulex*, in a small stony stream, and their implications for the interpretation of downstream dispersal. *Freshwater Biol.* 47, 1403-1417.
- Helson, B.V., Surgeoner, G.A., 1986. Efficacy of cypermethrin for the control of mosquito larvae and pupae, and impact on non-target organisms, including fish. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2, 269-275.
- Hultin, L., 1971. Upstream movements of *Gammarus pulex pulex* (Amphipoda) in a south Swedish stream. *Oikos* 22, 329-347.
- Janetzky, W., 1994. Distribution of the genus *Gammarus* (Amphipoda: Gammaridae) in the River Hunte and its tributaries (Lower Saxony, northern Germany). *Hydrobiologia* 294, 23-34.

- Karaman, G.S., Pinkster, S., 1977. Freshwater *Gammarus* species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda). *Bijdr. Dierk.* 47, 1-97.
- Kelly, D.W., Dick, J.T.A., Montgomery, W.I., 2002. The functional role of *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): shredders, predators, or both? *Hydrobiologia* 485, 199-203.
- Kreuger, J., 1998. Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990-1996. *Sci. Total Environ.* 216, 227-251.
- Ladewig, V., Jungmann, D., Köhler, H.-R., Schirling, M., Triebkorn, R., Nagel, R., 2006. Population structure and dynamics of *Gammarus fossarum* (Amphipoda) upstream and downstream from effluents of sewage treatment plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 370-383.
- Lopes, I., Baird, D.J., Ribeiro, R., 2005. Genetically determined resistance to lethal levels of copper by *Daphnia longispina*: association with sublethal response and multiple/coresistance. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1414-1419.
- McCahon, C.P., Pascoe, D., 1988. Use of *Gammarus pulex* (L.) in safety evaluation tests: culture and selection of a sensitive life stage. *Ecotox. Environ. Saf.* 15, 245-252.
- McNeil, C., Dick, J.T.A., Elwood, R.W., 1997. The trophic ecology of freshwater *Gammarus* (Crustacea : Amphipoda) ; problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biol. Rev* 72, 349-364.
- Maitland, P.S., 1966. Notes on the biology of *Gammarus pulex* in the river Endrick. *Hydrobiologia* 28, 142-152.
- Maund, S.J., Taylor, E.J., Pascoe, D., 1992. Population responses of the freshwater amphipod crustacean *Gammarus pulex* (L.) to copper. *Freshwater Biol.* 28, 29-36.
- Meyran, J.C., Gielly, L.; Taberley, P., 1998. Environmental calcium and mitochondrial DNA polymorphism among local populations of *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). *Molec. Ecol.* 7, 1391-1400.
- Mian, L.S., Mulla, M.S., 1992. Effects of pyrethroid insecticides on nontarget invertebrates in aquatic ecosystems. *J. Agric. Entomol.* 9, 73-98.
- Müller, J., Patsch, E., Link, A., 2000. Differentiation in morphology and habitat partitioning of genetically characterized *Gammarus fossarum* forms (Amphipoda) across a contact zone. *Biol. J. Limn. Soc.* 69, 41-53.
- Olima, C., Pablo, F., Lim, R.P., 1997. Comparative tolerance of three populations of the freshwater shrimp (*Paratya australiensis*) to the organophosphate pesticide, chlorpyrifos. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 321-328.
- Picado, A., Chankova, S., Fernandes, A., Simoes, F., Leverett, D., Johnson, I., Hernan, R., Pires, A.M., Matos, J., 2007. Genetic variability in *Daphnia magna* and ecotoxicological evaluation. *Ecotox. Environ. Saf.* 67, 406-410.
- Rosillon, D., 1985. Seasonal variations in the benthos of a chalk trout stream, the river Samson, Belgium. *Hydrobiologia* 126, 253-262.
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R., Triebkorn, R., Köhler, H.R., 2005. Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): influence of wastewater effluents, temporal variability, and spatial aspects on natural populations. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* (49), pp. 53-61, 2005.
- Schulz, R., Liess, M., 1999. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. *Aquat. Toxicol.* 46, 155-176.

- Stephenson, R.R., 1983. Effects of water hardness, water temperature, and size of the test organism on the susceptibility of the freshwater shrimp *Gammarus pulex* (L.) to toxicants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 459-466.
- Vindimian, E., Garric, J., Flammarion, P., Thybaud, E., Babut, M., 1999. An index of effluent aquatic toxicity designed by partial least squares regression, using acute and chronic tests and expert judgements. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2386–2391.
- Welton, J.S., 1979. Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream. *Freshwater Biol.* 9, 263-275.
- WHO - World Health Organization, 1990. International Program on Chemical Safety – Environmental Health Criteria 97 - Deltamethrin. World Health Organization Geneva.
- Van Wijngaarden, R.P.A., Cuppen, J.G.M., Arts, G.H.P., Crum, S.J.H., Van den Hoorn, M.W., Van den Brink, P.J., Brock, T.C.M., 2004. Aquatic risk assessment of a realistic exposure to pesticides used in bulb crops: a microcosm study. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1479-1498.
- Van Wijngaarden, R.P.A., Brock T.C.M., van den Brink, Gylstra R., Maund S.J., 2006. Ecological effects of spring and late summer applications of lambda-cyhalothrin on freshwater microcosms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 220-239.
- Xiu, R., Xu, Y., Gao, S., 1989. Toxicity of the new pyrethroid insecticide, deltamethrin, to *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* 188/189, 411-413.
- Zhao, Y., Newman, M.C., 2006. Effects of exposure duration and recovery time during pulsed exposures. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1298-1304.

c) Conclusions

La CL50_{96h} de la deltaméthrine est de 33,2 et 68,0 ng.L⁻¹ pour les adultes *G. fossarum* et *G. pulex* respectivement, soit une différence d'un facteur 2 environ. Néanmoins, cette différence de sensibilité interspécifique est parfois atténuée par les variations de sensibilité observées entre populations (également environ d'un facteur 2) : des populations de *G. fossarum* peuvent être ainsi plus tolérantes à la deltaméthrine que des populations de *G. pulex*. L'influence de l'origine géographique des individus sur leur niveau de sensibilité est indépendante de phénomènes de résistance dans nos observations, elle est donc vraisemblablement liée aux variations biologiques naturellement présentes entre les populations.

Les juvéniles des deux espèces se sont avérés beaucoup plus sensibles que les adultes (d'un facteur 14 à 22) : la CL50_{96h} de la deltaméthrine est de 4.0 et 5.7 ng.L⁻¹ pour les juvéniles *G. fossarum* et *G. pulex*. La létalité du pyréthrianoïde de synthèse deltaméthrine envers les populations de ces deux espèces s'exprime donc d'abord sur les individus les plus jeunes qui sont aussi les plus nombreux au sein des populations.

L'étude de la vulnérabilité de *G. fossarum* et *G. pulex* doit donc tenir compte de la différence de sensibilité entre individus d'une même population d'une part, et des variations de sensibilités entre populations d'autres part. Cette étude a ainsi montré que pour évaluer un effet similaire sur les individus les plus sensibles à partir d'une valeur d'écotoxicité obtenues pour des adultes, un facteur de sécurité d'au moins 40 ou 60 doit être appliqué selon qu'il s'agit de *G. pulex* ou de *G. fossarum*. Bien sûr, ces valeurs ne sont qu'indicatives, tant les paramètres biotiques et abiotiques pouvant influencés cette sensibilité physiologique sont nombreux et eux aussi soumis à des variations.

Conclusions de l'approche écotoxicologique

Parmi les pesticides testés, les pyréthriinoïdes de synthèse sont de loin les plus toxiques pour *G. pulex* et *G. fossarum*, la deltaméthrine l'étant légèrement plus que la cyperméthrine. Cette sensibilité est particulièrement forte chez les juvéniles, un effet léthal ayant été observé chez ces individus après la plus faible exposition en deltaméthrine testée, c'est-à-dire à 1 ng.L⁻¹ pendant 24 heures.

Les fongicides propiconazole, tébuconazole et IPBC ne présentent pas de risque majeur de toxicité aiguë pour ces espèces d'amphipodes à des concentrations réalistes d'un point de vue environnemental. Néanmoins ces fongicides sont susceptibles d'interagir à certains ratios avec les pyréthriinoïdes de synthèse et ainsi d'augmenter la toxicité du mélange. La toxicité de la solution de traitement du bois est également susceptible d'être renforcée par la présence d'adjuvants commerciaux.

La plus grande sensibilité de *G. fossarum* que *G. pulex* à la deltaméthrine tend à être gommée par les variations de sensibilité entre populations. Ces variations de sensibilité n'excédant pas d'un facteur 4,2 parmi les 7 origines géographiques testées (les deux espèces confondues), l'extrême sensibilité de ces deux espèces aux produits de traitement du bois, et plus particulièrement aux pyréthriinoïdes de synthèse, ne peut être remis en cause. Ceci confirme l'intérêt d'une utilisation relativement équivalente de *G. pulex* et de *G. fossarum* à des fins bioindicatrices, en particulier au regard de leur très fortes réponses *in natura* (chapitre III).

Cette approche écotoxicologique a permis de montrer qu'une évaluation pertinente du risque des produits de traitement du bois pour *G. pulex* et *G. fossarum* doit tenir compte des variations de sensibilité entre espèces, entre populations et entre stades de développement, ainsi que des ratios en pesticides auxquels sont exposés les organismes et de l'éventuelle présence d'adjuvants commerciaux.

Cinquième Partie

Discussion générale et Perspectives

► *Contamination par des produits de traitement du bois et impact chez G. pulex et G. fossarum*

Les deux aires de traitement du bois étudiées ont contaminé le milieu aquatique environnant et altéré son état biologique. Cette relation de causalité a été établie grâce à :

- la co-occurrence spatiale observée entre la présence de produits de préservation du bois et les perturbations observées au sein des populations d'invertébrés aquatiques, et en particulier de *G. pulex* et de *G. fossarum* (chapitres III.1 et III.2),
- la co-occurrence temporelle entre cet impact et la contamination du milieu, à savoir que la récurrence de la contamination observée a engendré une durabilité de l'altération des populations de *G. pulex* et de *G. fossarum* (chapitres II.2.2 et III.1),
- la mise en évidence d'une relation entre l'intensité de réponse de ces deux espèces de crustacés, en particulier leur mortalité, et l'amplitude de leur exposition à ces produits de préservation du bois (chapitres IV.1 et IV.2),
- la présence avérée de ces pesticides dans le sédiment, la contamination de ce compartiment constituant très vraisemblablement une voie d'exposition (au moins indirecte) de ces espèces à ces substances, comme montré pour une autre espèce d'amphipode épibenthique par Maund *et al.* (2002),
- les mécanismes d'action toxique des pyréthriinoïdes de synthèse, et dans une moindre mesure des fongicides triazolés, ont déjà été identifiés chez les arthropodes (Bradbury et Coats 1989, Bradberry *et al.* 2005, Jackson *et al.* 2000, Roussel UCLAF 1982),
- la cohérence des observations réalisées dans le cadre de cette thèse avec les données disponibles dans la littérature scientifique, en particulier vis-à-vis de leur forte sensibilité physiologique aux pesticides par rapport aux autres taxons macrobenthiques (Helson et Surgeoner 1986, Mian et Mulla 1992, Schulz et Liess 1999b, Wogram et Liess 2001, Cold et Forbes 2004, Van Wijngaarden *et al.* 2004, Bloor *et al.* 2005),
- la cohérence de l'ensemble du corpus expérimental, avec notamment des mesures réalisées à l'échelle individuelle et populationnelle, et avec des conditions contrôlées, semi-contrôlées et naturelles.

La contamination du compartiment sédimentaire de la Drésine a mis en évidence un transfert de produits de préservation du bois depuis l'aire de traitement vers le milieu aquatique environnant. Ce transfert augmente vraisemblablement après des pluies répétées plutôt qu'après un évènement orageux isolé, ce qui est corroboré par la présence d'un impact biologique accru lors de ces pluies répétées, bien qu'une modification de la biodisponibilité des contaminants puisse également intervenir (chapitres II.2 et III.2, Maund *et al.* 2002, Bondarenko *et al.* 2006). Les périodes d'étiage ne correspondent pas nécessairement à une augmentation de la concentration en pesticides dans les sédiments. Néanmoins, les étiages estivaux s'accompagnant entre autres d'une augmentation de la température de l'eau, facteur de stress pour les organismes aquatiques, ils sont donc aussi susceptibles de favoriser une augmentation de l'impact (chapitres II.2 et III.1, Overmyer *et al.* 2005).

La présence de produits de préservation du bois dans le sédiment a été avérée sur au moins deux kilomètres à l'aval des installations de traitement au niveau des deux sites étudiés. Ceci est corroboré par l'altération des populations de *G. pulex* et de *G. fossarum* au niveau de ces stations dites « éloignées ». Les produits de traitement du bois sont donc transportés sur de longues distances à l'aval de leur source d'émission, avec des modalités vraisemblablement différentes selon leurs caractéristiques physico-chimiques.

La sévérité des effets observés sur les populations de *G. pulex* et *G. fossarum* est vraisemblablement liée à la récurrence de la contamination du milieu aquatique, les effets chroniques s'ajoutant aux effets aigus. Les tests écotoxicologiques réalisés sur *G. pulex* et *G. fossarum* ont permis d'établir que ce sont essentiellement les pyréthriinoïdes de synthèse qui exercent un effet toxique aigu sur ces espèces. De plus, les solutions commerciales utilisées en scierie pour le traitement préventif du bois sont constituées d'un mélange de matières actives et d'adjuvants. Or, les interactions entre ces pesticides sont liées à leur ratio. Ainsi, une augmentation de la proportion en fongicides par rapport à la cyperméthrine est susceptible de créer des phénomènes synergiques. Une telle augmentation de la proportion en fongicides triazolés parmi les contaminants a d'ailleurs été observée au niveau de la station dite éloignée de l'aire de traitement par rapport à l'aval proche (chapitre II.2). Il a aussi été montré qu'une contamination du milieu aquatique par des adjuvants présents dans la solution commerciale est susceptible de renforcer l'effet toxique engendré par les produits de traitement du bois. Ces adjuvants n'ont pas pu être recherchés dans le milieu, la composition complète des mélanges commerciaux étant protégée par le secret industriel et la nature chimique des adjuvants ne nous ayant pas été communiquée.

Les juvéniles *G. pulex* et *G. fossarum* sont beaucoup plus sensibles que les adultes aux pyréthrinoïdes de synthèse (chapitre IV.2). Ceci peut apparaître contradictoire avec le plus fort impact mesuré *in natura* sur les *G. pulex* adultes vivant à proximité des aires de traitement (chapitre III.1). Cela peut traduire la présence d'un comportement ou d'un effet sub-létal particulier aux adultes s'exprimant au niveau de ces zones les plus contaminées. Cette observation est cohérente avec celle réalisée chez *G. fossarum* par la comparaison des résultats obtenus par les bioessais implantés *in situ* et les mesures effectuées *in natura* : la mortalité des adultes n'est très vraisemblablement pas le seul facteur expliquant les fortes diminutions d'effectifs dans les zones les plus contaminées (chapitre III.2). Un comportement d'évitement particulier aux adultes depuis les zones contaminées vers des sites davantage préservés pourrait rendre compte des résultats observés.

Les forts impacts observés sur les populations de *G. pulex* et *G. fossarum* s'expliquent donc vraisemblablement, d'une part, par la très forte sensibilité physiologique des juvéniles, et, d'autre part, par la sensibilité de réponse des adultes. En outre, d'autres perturbations à long terme, non directement évaluées dans le présent travail, sont susceptibles de s'ajouter, comme par exemple la reprotoxicité suspectée des fongicides triazolés (Meliyan 1991, Kast-Hutcheson *et al.* 2001, Soetaert *et al.* 2006). En revanche, aucune perturbation du *sex ratio* ou du taux de femelle ovigère par les produits de traitement du bois n'a été mise en évidence dans le présent travail.

► *Evaluation de concentrations en produits de traitement du bois prédites comme étant sans effet sur les populations de G. pulex et G. fossarum*

G. pulex et *G. fossarum* font partie des invertébrés macrobenthiques les plus sensibles à de multiples substances dont les produits de traitement du bois, comme le montrent les différences de réponses observées entre ces taxons *in natura* (chapitre III.2, Friberg *et al.* 2003), ainsi que la comparaison des valeurs de toxicité aiguë (chapitre I.5, Anderson et Shubat 1984, Helson et Surgeoner 1986, Bradbury et Coats 1989, Coats *et al.* 1989, Mian et Mulla 1992, Wogram et Liess 2001, Cold et Forbes 2004, Van Wijngaarden *et al.* 2004). Or, la présence de contaminants à des concentrations préservant les espèces les plus sensibles d'un écosystème doit également aboutir à la protection de l'ensemble des espèces qui le

composent. Par conséquent, la protection des espèces considérées comme étant les plus sensibles doit conduire en la préservation de la structure et du fonctionnement de l'ensemble de l'écosystème en question (European Commission 2003a). L'estimation des risques engendrés pour l'écosystème aquatique à l'aval d'installations de traitement nécessite donc une évaluation des risques engendrés par les produits de préservation du bois pour *G. pulex* et *G. fossarum*.

Les principes qui fondent les procédures d'évaluation du risque sont basés sur le rapport entre l'estimation de la concentration du contaminant en question dans l'environnement (*Predicted Effect Concentration* = PEC) et sa concentration prédite comme étant sans effet sur les organismes au sein de l'écosystème (*Predicted No Effect Concentration* = PNEC). L'extrapolation de la PNEC à partir de données écotoxicologiques est réalisée *via* l'application d'un facteur de sécurité. En l'absence d'informations relatives à des effets à moyen terme, un facteur de sécurité de 1 000 est appliqué aux valeurs d'écotoxicité aiguë du type CL50 (European Commission 2003a). En outre, l'étude des variations de sensibilité selon l'origine géographique et le stade de développement des gammarès a montré qu'un facteur d'au moins 40 et 60 doit être appliqué à la CL50 obtenues sur respectivement des *G. pulex* adultes et des *G. fossarum* adultes, ceci afin d'évaluer un effet similaire sur les individus les plus sensibles de cette même espèce (chapitre IV.2).

Les variations de sensibilité entre individus et entre populations dépendent de plusieurs autres paramètres, comme par exemple des interactions entre les pesticides lorsque les organismes sont exposés à des mélanges. Deux scénarios sont ainsi présentement élaborés, le premier (scénario 1) considérant l'absence d'interaction entre les composants du mélange, le second (scénario 2) considérant une augmentation de la toxicité d'un facteur 17 due à la synergie entre les pesticides et d'un facteur 1,2 due à la présence d'adjuvants (valeurs des facteurs observées au niveau de la CL50 dans le chapitre IV.1), soit une application d'un facteur 20. Les PNEC des produits de traitement du bois pour *G. pulex* et *G. fossarum* sont ainsi évaluées à partir des CL50 estimées dans le présent travail (Tableau V.1).

Les flux de contaminants hydrophobes dans la phase aqueuse se faisant essentiellement par des pics de concentration transitoires et intermittents (Reinert *et al.* 2002), il est souvent plus aisé de doser ce type de substance dans le sédiment, leur concentration étant soumise à de moins fortes variations dans le temps dans ce compartiment (chapitre II.2). La prédiction de la concentration d'une substance dans le sédiment (C_{sed}) à partir de sa concentration dans l'eau

(C_{eau}) peut se faire de façon approximative grâce au calcul du coefficient de partage de cette substance entre le sédiment et l'eau (Kp_{sed} , $Kg.L^{-1}$). Ce coefficient est estimé en multipliant le coefficient de partage de la substance entre la fraction organique du sédiment et l'eau (Koc , $L.Kg^{-1}$) par la teneur en matière organique du sédiment (Foc_{sed} , $Kg.Kg^{-1}$). On a donc :

$$Kp_{sed} = C_{sed} / C_{eau} = Koc \times Foc_{sed}, \quad (1)$$

$$c'est\text{-à-dire } C_{sed} = C_{eau} \times Koc \times Foc_{sed}. \quad (2)$$

La valeur de Foc_{sed} est considérée par défaut à $0,05 \text{ Kg.Kg}^{-1}$, soit 5% de matière organique (European Commission 2003a) et les Koc maximales et minimales présents dans la littérature sont pris en compte pour chacune des substances (voir Tableaux I.3 à I.7).

En considérant que ces contaminants sont essentiellement disponibles pour *G. pulex* et *G. fossarum* lorsqu'ils sont sous forme dissoute, comme cela a été démontré pour plusieurs substances dont les pyréthriinoïdes de synthèse (Maund *et al.* 2002, Burgess *et al.* 2005, Yang *et al.* 2006a et 2006b), la $PNEC_{sed}$ peut être évaluée à partir de la $PNEC_{eau}$ en appliquant l'équation (2) (Tableau V.2) :

$$PNEC_{sed} = PNEC_{eau} \times Koc \times Foc_{sed} \quad (3)$$

Pesticide	CL50 _{96h} pour les adultes (ng.L ⁻¹)	Estimation de la CL50 _{96h} (ng.L ⁻¹) pour les individus les plus sensibles (facteur de 40 pour <i>G. pulex</i> et de 60 pour <i>G. fossarum</i>)		Estimation de la PNEC (ng.L ⁻¹) (facteur de sécurité de 1000)	
		Scénario 1 (pas d'interaction)	Scénario 2 (facteur 20)	Scénario 1	Scénario 2
Deltaméthrine	68,0	1,70	85.10^{-3}	$1,7.10^{-3}$	85.10^{-6}
	33,2 *	0,55 *	$27,5.10^{-3}$ *	$0,6.10^{-3}$ *	$27,5.10^{-6}$ *
Cyperméthrine	90	2,25	$112,5.10^{-3}$	$2,2.10^{-3}$	$112,5.10^{-6}$
Propiconazole	4 703 000	117 575	5 879	118	5,9
Tébuconazole	1 643 000	41 075	2 054	41	2,1
IPBC	604 000	15 100	755	15	7,6

Tableau V.1. Estimation des PNEC (ng.L⁻¹) de la deltaméthrine, la cyperméthrine, du propiconazole, du tébuconazole et de l'IPBC pour *G. pulex* suivant 2 scénarios liés à la présence ou non d'interactions. * : Estimation de la PNEC (ng.L⁻¹) de la deltaméthrine pour *G. fossarum*.

Les pyréthriinoïdes de synthèse étant les molécules les plus toxiques pour *G. pulex* et *G. fossarum* parmi les pesticides étudiés, les $PNEC_{eau}$ sont extrêmement faibles pour ces substances, c'est-à-dire de l'ordre du $pg.L^{-1}$, voire du centième de $pg.L^{-1}$ selon le scénario choisi (Tableau V.1). Ces pesticides étant également les plus hydrophobes parmi ceux étudiés, les $PNEC_{sed}$ sont beaucoup moins élevées que leur $PNEC_{eau}$. Ainsi, à concentration

équivalente dans le sédiment, le classement de toxicité des pesticides étudiés pour *G. pulex* et *G. fossarum* apparaît comme étant le suivant : cyperméthrine (le plus toxique) > deltaméthrine ~ IPBC > tébuconazole > propiconazole (le moins toxique, Tableau V.2).

Pesticide	PNEC _{eau} (ng.L ⁻¹ , ppt)	Koc (L.Kg ⁻¹)		PNEC _{sed} (ng.g ⁻¹ , ppb)		Limites de détection (ng.g ⁻¹)
		Koc min	Koc max	PNEC _{sed} min	PNEC _{sed} max	
				Scénario 1 (pas d'interaction entre les pesticides)		
Deltaméthrine	1,7.10 ⁻³	4,60.10 ⁵	1,63.10 ⁷	0,04	1,39	0,7
	0,55.10 ^{-3*}			0,01*	0,45*	
Cyperméthrine	2,22.10 ⁻³	20 800	385 000	0,002	0,04	0,3
Propiconazole	118	382	1789	2,25	10,56	3,3
Tébuconazole	41	902		1,85		2,7
IPBC	15	61	309	0,05	0,23	0,6
Scénario 2 (augmentation de la toxicité d'un facteur 20)						
Deltaméthrine	85.10 ⁻⁶	4,60.10 ⁵	1,63.10 ⁷	1,9.10 ⁻³	0,07	0,7
	27,5.10 ^{-6*}			0,6.10 ^{-3*}	22,4.10 ^{-3*}	
Cyperméthrine	112,5.10 ⁻⁶	20 800	385 000	0,1.10 ⁻³	2,1.10 ⁻³	0,3
Propiconazole	5,9	382	1789	112,7.10 ⁻³	527,8.10 ⁻³	3,3
Tébuconazole	2,1	902		92,5.10 ⁻³		2,7
IPBC	7,6	61	309	2,3.10 ⁻³	11,6.10 ⁻³	0,6

Tableau V.2. Estimation pour *G. pulex* de la PNEC_{sed} (ng.g⁻¹ ou µg.Kg⁻¹ ou ppb) de la deltaméthrine, de la cyperméthrine, de l'IPBC, du tébuconazole et du propiconazole dans un sédiment contenant 5% de matière organique. * : Estimation de la PNEC_{sed} de la deltaméthrine pour *G. fossarum*. Les limites de détection des produits de préservation du bois dans le sédiment (ng.g⁻¹) sont celles de la méthode développée dans le présent travail (chapitre II.2.1).

Quelque soit le scénario choisi, les concentrations dans le sédiment en cyperméthrine, IPBC et tébuconazole prédites sans effet pour *G. pulex* et *G. fossarum* sont inférieures aux limites de détection de la méthode analytique développée (chapitre II.2.1). Les limites de détection de la deltaméthrine et du propiconazole ne sont supérieures aux limites hautes de la PNEC_{sed} que dans le cas du scénario le plus « optimiste », ce dernier considérant une absence d'interaction entre les substances et un coefficient de partage minimum du pesticide entre le sédiment et la phase aqueuse. Néanmoins les valeurs de PNEC_{sed} doivent être considérées avec prudence tant les facteurs d'incertitude pouvant intervenir (traduits pas les facteurs de sécurité) sont nombreux et complexes.

L'absence de détection de ces pesticides ne signifie donc pas une absence d'effet pour *G. pulex* et *G. fossarum*. En revanche, la détection de produits de traitement du bois dans le sédiment indique la présence vraisemblable d'effets néfastes pour ces crustacés. Ceci est corroboré par les forts impacts mesurés sur les populations de gammarès échantillonnées dans la Drésine alors qu'une contamination par au moins deux pesticides ait été à chaque fois détectée au niveau des sites aval.

► *Qualités bioindicatrices de G. pulex et G. fossarum*

La pertinence du choix de *G. pulex* et *G. fossarum* comme taxons bioindicateur est liée aux rôles structurels et fonctionnels clés qu'occupent ces espèces dans de nombreux écosystèmes aquatiques. En effet, ces espèces :

- occupent une large aire de répartition (Karaman et Pinkster 1977, Zivic et Markovic 2007),
- sont ubiquistes (Hynes 1955, Karaman et Pinkster 1977, Janetzki 1994),
- sont potentiellement présentes en fortes densités (Welton 1979, Gee 1992, Obrdlik 1972),
- constituent une source importante du régime alimentaire de nombreuses espèces de poissons (Maitland 1966),
- ont un régime alimentaire omnivore à tendance détritivore fait qu'elles peuvent à la fois être prépondérantes dans la dégradation de la matière organique grossière et structurer les peuplements de la communauté macrobenthique (McNeil *et al.* 1997, Kelly *et al.* 2002, Rawer-Jost *et al.* 2000, Dick 1996).

Le présent travail a permis de confirmer l'intérêt d'utilisation de ces espèces à des fins bioindicatrices, en raison :

- de leur forte sensibilité physiologique aux produits de traitement du bois,
- des réponses marquées de leurs populations *in natura*,
- de leur appartenance au groupe des taxons macrobenthiques répondant le plus sensiblement aux contaminations par des produits de traitement du bois, leur protection devant conduire à une préservation des espèces davantage tolérantes,
- de leur relative similarité de réponse conjointe à leur très forte sensibilité, en particulier aux pyréthrinoïdes de synthèse. *G. pulex* et *G. fossarum* peuvent ainsi être

proposés comme ne formant qu'un seul groupe bioindicateur. D'un point de vue pratique, cela permet en outre de s'affranchir des difficultés de détermination liées à leur proximité morphologique (Roux 1970).

Ces crustacés sont relativement tolérants aux perturbations engendrant un déficit en oxygène dissous telles que les excès en matière organique oxydable et l'eutrophisation du milieu aquatique (Meijering 1991, Maltby 1995, Spicer *et al.* 2002). Par conséquent, leur forte sensibilité aux produits de traitement du bois, en particulier aux pyréthrinoïdes de synthèse, fait que ces espèces peuvent aussi être pertinemment utilisées lorsque le milieu aquatique est altéré par des pollutions organiques ou par des excès en éléments nutritifs.

Toutefois, la sensibilité de ces espèces diffère fortement selon le pesticide considéré, comme montré dans le présent travail avec leur tolérance à la toxicité aiguë des fongicides triazolés. La réponse de ces espèces aux différentes substances toxiques doit donc être mieux cerner afin de davantage appréhender leurs qualités bioindicatrices (indicateur de quels types de contaminants ?), particulièrement dans un contexte de contamination généralisée des cours d'eau par les pesticides (IFEN 2006).

La bioindication passive peut être réalisée par la mesure de l'impact de la contamination par des produits de traitement du bois sur les effectifs de *G. pulex* et *G. fossarum*, à l'image de ce qui a été réalisé dans l'approche hydro-écologique. En outre, les différences de réponses observées entre adultes et juvéniles fournissent des informations complémentaires quant à cet impact, les adultes étant proportionnellement moins abondants que les juvéniles dans les zones les plus contaminées. La finesse du diagnostic peut être renforcée par le suivi d'autres taxons macrobenthiques parmi les plus sensibles aux substances toxiques. Par exemple, notre travail montre que les densités de larves d'*E. aenea* et le ratio larves/adultes sont susceptibles de confirmer et de compléter les informations obtenues par le suivi des populations de *G. pulex* et *G. fossarum*. Toutefois, certains auteurs faisant état d'une forte variation de sensibilité selon l'espèce d'*Elmis sp.* considérée (Garcia-Criado et Fernandez-Alaez 2001), une détermination spécifique est nécessaire pour valider les résultats obtenus à partir de ce coléoptère.

Cette approche, très sensible grâce aux fortes réponses *in natura* de ces taxons, permet une intégration des perturbations qui est à la fois temporelle à l'échelle de leur cycle de vie, et spatiale à l'échelle de leur habitat. En revanche, ce dispositif est difficilement standardisable

du fait de la diversité et de la complexité des paramètres environnementaux auxquels sont sensibles ces organismes. Les informations fournies par cette méthode sont donc essentiellement qualitatives et ne renseignent pas sur la nature et l'intensité de la contamination.

Une approche bioindicatrice active, *via* l'implantation de cages *in situ*, est complémentaire aux suivis de populations (Calow 1989; Chappie et Burton 2000, Schulz et Liess 1999a). Le dispositif étant relativement standardisable, il autorise une comparaison plus facile des effets mesurés dans différents sites ou à divers périodes. En outre, ces bioessais peuvent être réalisés dans des zones où les gammares sont très peu abondants voire absents (les individus sont alors prélevés dans un autre site). En revanche, le manque de sensibilité observé par cette méthode, lié à la mesure de mortalité d'individus adultes, nécessite des développements supplémentaires du dispositif tels que l'utilisation d'autres catégories d'individus ou d'autres paramètres plus sensibles.

► *Perspectives*

Le présent travail visait à documenter l'impact de contaminations par des produits de traitement du bois sur les populations de *G. pulex* et *G. fossarum* ainsi qu'à mieux appréhender les processus conduisant à cette altération. Les objectifs sous-jacents à ce travail sont, d'une part, de permettre une meilleure compréhension de la vulnérabilité de ces espèces, et, d'autre part, de mieux cerner leur potentiel bioindicateur.

Les résultats obtenus ont permis d'établir la sensibilité physiologique de ces espèces aux produits de traitement du bois, en particulier les effets létaux, ainsi que de qualifier leur réponse *in natura*. En outre, les investigations menées ont montré que les populations sont susceptibles d'être exposées dans leur milieu naturel à une contamination récurrente par des produits de préservation du bois sur plusieurs kilomètres à l'aval des installations de traitement.

Les processus conduisant à cette altération des populations de *G. pulex* et *G. fossarum* ont été partiellement élucidés. Ainsi, à l'échelle individuelle, une modification des effets a été observée selon les interactions entre les composés des solutions commerciales, selon le stade de développement de l'organisme, et selon son origine géographique. A l'échelle de la population, des différences de réponse ont aussi été observées entre adultes et juvéniles, et

l'influence de certains paramètres environnementaux (température de l'eau, pluviométrie) a été évaluée. La comparaison de ces observations avec celles obtenues à l'échelle de la communauté macrobenthique a permis de confirmer que ces espèces font partie des invertébrés répondant le plus sensiblement à la contamination. Ces résultats ont notamment conduit à fortement suspecter la présence, voire à la prépondérance, de phénomènes sub-létaux dans les processus d'altérations des populations, en particulier chez les adultes.

Des investigations supplémentaires doivent donc être réalisées afin de compléter les connaissances nécessaires à la réalisation totale des objectifs initialement formulés. Deux principaux axes de recherches sont à développer, l'un visant à mieux appréhender le devenir des produits de traitement du bois et l'exposition des organismes à ces substances dans leur environnement (i), l'autre ayant pour objectif une meilleure compréhension des effets de cette exposition chez *G. pulex* et *G. fossarum* (ii).

(i) Suite au présent travail, et afin de mieux comprendre les mécanismes de transfert des produits de traitement du bois, les études à mener dans un premier temps sont celles qui viennent en complément de l'étude de l'adsorption du fongicide propiconazole sur le charbon actif (chapitre II.1). Des études en *batch* doivent donc être réalisées afin de tester (par ordre chronologique) :

- l'adsorption du propiconazole à faible concentration sur du charbon actif,
- l'adsorption de ce fongicide à faible concentration sur différents types de sédiments,
- l'adsorption des autres substances utilisées pour traiter le bois (tébuconazole, cyperméthrine, deltaméthrine, IPBC), à faibles concentrations et en présence de sédiment,
- l'effet sur les propriétés d'adsorption de ces substances lorsqu'elles sont en mélange et en présence d'adjuvants utilisés dans les solutions commerciales,
- l'adsorption et la désorption de ces substances selon plusieurs modalités d'agitation du milieu.

Des dispositifs plus complexes (type aquarium ou mésocosme) pourront permettre par la suite de se rapprocher de conditions plus proches d'un milieu naturel. Outre la compréhension des mécanismes régissant les transferts des substances, les objectifs pourront aussi s'orienter à moyen ou long terme vers l'élaboration de capteurs qui, implantés *in situ*, auraient en charge la détection, voire la quantification, d'une contamination du milieu aquatique par les produits

de traitement du bois (à l'image du système américain *Semi-Permeable Membrane Device*). Implanté à proximité de l'aire de traitement, un dispositif adsorbant adapté pourrait aussi être susceptible de limiter le risque de transfert de produits de préservation du bois vers l'environnement proche du site.

Parallèlement aux expérimentations menées en conditions contrôlées, des dosages réalisés *in natura* pourront être réalisés dans des compartiments de différentes natures afin d'établir un état de contamination complet du milieu à proximité d'une aire de traitement du bois. Les compartiments concernés seraient le sol, la litière, l'eau de ruissellement et du milieu aquatique, le sédiment, les matières en suspension, la matière organique grossière présente dans le milieu aquatique, et le monde vivant (bioaccumulation) avec les mousses aquatiques, les algues, la faune invertébrée (en particulier les gammares) et vertébrée (essentiellement les poissons). Une étude visant à mieux évaluer la variation spatiale (distance maximale de la contamination par exemple) ainsi que la variation temporelle (à différentes échelles) des concentrations en produits de traitement du bois dans certains de ces compartiments serait complémentaires à l'état de contamination du milieu établi à un instant précis. En outre, la présence éventuelle dans le milieu d'adjuvants utilisés dans les solutions commerciales devra aussi être avérée.

(ii) Afin de compléter les connaissances acquises dans le présent travail sur les effets engendrés chez *G. pulex* et *G. fossarum* suite à une pollution par des produits de préservation du bois, une évaluation de la réponse à une échelle sub-individuelle est nécessaire. Ainsi, la détermination de biomarqueurs d'effets, de sensibilité aux effets et d'exposition viendrait en complément des approches à l'échelle de l'individu et de la population déjà entreprises.

Des tests de toxicité chronique visant à évaluer les effets de produits de traitement du bois à moyen et long terme chez *G. pulex* et *G. fossarum* doivent également être effectués. Cette étude pourrait être effectuée à l'échelle de la population à l'aide de microcosmes. Les variables mesurées, chez les adultes et les juvéniles, pourraient être le taux de mortalité, des marqueurs de la reproduction (par exemple, taux de désappariement ou de formation des *precopula* chez les adultes), ainsi que les biomarqueurs préalablement définis. Les produits de préservation du bois seraient testés individuellement aux concentrations observées dans un environnement proche d'une aire de traitement et aussi à une concentration proche de la PNEC précédemment évaluée. A la suite de cette étude, les effets à moyen et long terme de

ces substances pourraient être testés lorsqu'elles sont en mélange et éventuellement en présence d'adjuvants commerciaux.

Des mesures plus proches de conditions naturelles peuvent aussi compléter les données expérimentales déjà acquises. Ainsi, par exemple, la mesure de biomarqueurs chez des individus exposés dans des cages implantés *in situ* pourraient renseigner plus finement sur leur exposition et les effets engendrés que lors de la simple mesure d'un effet létal. Cette étude pourrait faire intervenir des juvéniles, ceux-ci étant plus sensibles que les adultes, au moins aux effets létaux, tout en composant la plus grande partie des populations.

Des dispositifs expérimentaux relativement complexes, par exemple des microcosmes interconnectés, pourraient permettre de vérifier l'hypothèse d'un évitement actif des zones les plus contaminées, en particulier par les adultes. Une autre possibilité consisterait en la mesure du taux de dérive, *via* des filets de dérive implantés *in situ*, en prenant en compte les différences de réponses entre juvéniles et adultes, et de compléter ces données par des mesures de biomarqueurs et/ou par des tests de survie parmi les individus dérivant échantillonnés.

Ces propositions d'expérimentations sont celles qui viennent en priorité à la suite du présent travail, d'autres compléments s'avérant nécessaires, notamment à l'échelle de la communauté, avant de pouvoir pleinement répondre à l'objectif visant à mettre en place une méthode bioindicatrice par *G. pulex* et *G. fossarum* qui soit opérationnelle.

Un axe de développement supplémentaire concerne le traitement du bois et ses pratiques. Outre par le respect de la réglementation, les aménagements de nouveaux sites de traitement (le contexte économique actuel étant favorable aux regroupements de scieries) constituent l'occasion d'une meilleure éco-conception des sites qui serait susceptible de limiter le transfert de produits de préservation du bois vers le milieu aquatique environnant. De plus, des traitements alternatifs à l'usage d'agents biocides, et *a priori* moins dommageables pour l'environnement, existent déjà ou sont en cours d'élaboration (traitement thermique ou à base d'huiles végétales par exemple). Enfin, une réflexion quant aux facteurs socio-économiques incitant à systématiquement traiter les bois de résineux est nécessaire, alors qu'un choix raisonné quant aux essences de bois utilisées et à leur mise en œuvre permettrait de se passer de traitement sous certaines conditions comme l'atteste la présence de fermes comtoises construites en bois non traité il y a plus d'un siècle sur les hauts plateaux du Jura.

Bibliographie

- Adam, O., 2002. Impact des produits de traitement du bois en scieries sur les biocénoses aquatiques. Rapport de D.E.S.S. Qualité et traitement des eaux, Université de Franche-Comté, 43 p.
- Adam, O., 2004. Approche écotoxicologique de l'impact des produits de traitement du bois sur les milieux aquatiques – toxicité sur *Gammarus pulex* (L.) et capacités d'adsorption différentielle. Rapport de D.E.A. Environnement, Santé, Société, Université de Franche-Comté, 30 p.
- Adam, O., Degiorgi, F., Crini, G., Badot, P.-M.. Pesticide mixture toxicity on *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea, Amphipoda). 27th annual meeting of SETAC North America, Montréal, Canada, November 2006.
- ADIB (Association Des Industrie du Bois en Franche-Comté), Août 2002. Traitement chimique de préservation du bois dans les scieries de résineux de Franche-Comté – Etats des lieux. 30 p.
- AFNOR (Association Française de Normalisation), 1989. Préservation du bois – Recueil de normes françaises 1989. Edition AFNOR, 671p.
- Agriculture Canada, 1987. Propiconazole – Document de travail D87-05. 18p.
- Ali, M.A., Baugh, P.J. 2003. Sorption-desorption studies of six pyrethroids and mirex on soils using GC/MS-NICI. Intern. J. Anal. Chem. 83, 923-933.
- Amiard, J.-C., Caquet, T., Lagadic, L., 1998. Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F. (Eds). Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier Tec & Doc, Paris, 21-31.
- Amweg, E.L., Weston, D.P., Ureda, N.M., 2005. Use and toxicity of pyrethroid pesticides in the Central Valley, California, USA. Environ. Toxicol. Chem. 24, 966-972.
- Anderson, R.L., Shubat, T P., 1984. Toxicity of flucythrinate to *Gammarus lacustris* (Amphipoda), *Pteronarcys dorsata* (Plecoptera) and *Brachycentrus americanus* (Trichoptera): importance of exposure duration. Environ. Pollut. Series A 35, 353-365.
- Ania, C.O., Parra, J.B., Pis, J.J., 2002. Influence of oxygen-containing functional groups on active carbon adsorption of selected organic compounds. Fuel Proc. Technol. 79, 265-271.
- Ashauer, R., Boxall, A.B.A., Brown, C.D., 2006. Predicting effects on aquatic organisms from fluctuating or pulsed exposure to pesticides. Environ. Toxicol. Chem. 25, 1899-1912.
- Ashauer, R., Boxall, A.B.A., Brown, C.D., 2007. New ecotoxicological model to simulate survival of aquatic invertebrates after exposure to fluctuating and sequential pulses of pesticides. Environ. Sci. Technol. 41, 1480-1486.
- Aubertot, J.N., J.M., Barbier, A., Carpentier, J.J., Gril, L., Guichard, P., Lucas, S., Savary, I., Savini, M., Voltz (éditeurs), 2005. Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'Expertise scientifique collective, INRA et Cemagref (France).
- Babut, M.P., Delmas, H., Bray, M., Durrieu, C., Perrodin, Y., Garric, J., 2006. Characterizing the risks for aquatic ecosystems: a tentative approach in the context of freshwater dredged material disposal. Integrat. Environ. Assess. Manag. 2, 330-343.
- Backhaus, T., Altenburger, R., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., 2003. The BEAM-project : prediction and assessment of mixture toxicities in the aquatic environment. Cont. Shelf Res. 23,1757-1769.
- Badreshia, S., Marks, Jr J.G., 2002. Iodopropynyl Butylcarbamate. Am. J. Contact Dermatitis 13, 77-79.

- Baekken, T., Aanes, K.J., 1991. Pesticides in Norwegian agriculture. Their effects on benthic fauna in lotic environments. Preliminary results. *Int. Assoc. Theor. Appl. Limnol. Proc.* 24, 2277-2281.
- Bailey, H.C., Elphick, J.R., Potter, A., Chao, E., Zak, B., 1999a. Acute toxicity of the antispaltin chemicals DDAC and IPBC, alone and in combination, to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Wat. Res.* 33, 2410-2414.
- Bailey, S.E., Olin, T.J., Bricka, M., Adrian, D.D., 1999b. A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. *Wat. Res.* 33, 2469-2479.
- Barata, C., Baird, D.J., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2001. Biochemical factors contributing to response variation among resistant and sensitive clones of *Daphnia magna* Straus exposed to ethyl parathion. *Ecotox. Environ. Saf.* 49, 155-163.
- Barnthouse, L.W., 2004. Quantifying population recovery rates for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 500-508.
- Bascombe, A.D., Ellis, J.B., Revitt, D.M., Shutes, R.B.E., 1990. The development of ecotoxicological criteria on urban catchments. *Wat. Sci. Technol.* 22, 173-179.
- Belfroid, A.C., van Drunen, M., Beek, M.A., van Gestel, C.A.M., van Hattum, B., 1998. Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems. *Sci. Tot. Environ.* 222, 167-183.
- Belzunces, L.P., Garin, S., Colin, M.E., 1993. Synergistic effects of pyrethroid insecticides and azole fungicides on bees, at sublethal doses. *Mesogeos* 53, 13-16.
- Berenzen, N., Lentzen-Gogging, A., Probst, M., Schulz, H., Schulz, R., Liess, M., 2005a. A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticides concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere* 58, 683-691.
- Berenzen, N., Kumke, T., Schulz, H.K., Schulz, R., 2005b. Macroinvertebrate community structure in agricultural streams : impact of runoff-related pesticide contamination. *Ecotox. Environ. Saf.* 60, 37-46.
- Berthélemy, C., 1979. *Elmidae* paléarctiques. Université Paul Sabatier Toulouse, Annales de limnologie 15, 1-104.
- Bertrand, H., 1954. Les insectes aquatiques d'Europe – Volume I. Ed. Paul Lechevalier, 556 p.
- Biniak, S., Kazmierczak, J., Swiatkowski, A., 1990. Adsorption of phenol from aqueous solutions on activated carbons with different oxygen contents. *Adsorp. Sci. Technol.* 6, 182-191.
- Birdwell, J., Cook, R.L., Thibodeaux, L.J., 2007. Desorption kinetics of hydrophobic organic chemicals from sediment to water: a review of data and models. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 424-434.
- Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Biol.* 26, 585-615.
- Bloor, M.C., Banks, C.J., 2006. An evaluation of mixed species *in-situ* and *ex-situ* feeding assays: the altered response of *Asellus aquaticus* and *Gammarus pulex*. *Environ. Int.* 32, 22-27.
- Bloor, M.C., Banks, C.J., Krivtsov, V., 2005. Acute and sublethal toxicity tests to monitor the impact of leachate on an aquatic environment. *Environ. Int.* 31, 269-273.
- Bollache, L., Kaldonski, N., Troussard, J.P., Lagrue, C., Rigaud, T., 2006. Spines and behaviour as defences against fish predators in an invasive freshwater amphipod. *Anim. Behav.* 72, 627-633.
- Bondarenko, S., Putt, A., Kavanaugh, S., Poletika, N., Gan, J., 2006. Time dependence of phase distribution of pyrethroid insecticides in sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 3148-3154.

- Bradberry, S.M., Cage, S.A., Proudfoot, A.T., Vale J.A., 2005. Poisoning due to pyrethroids. *Toxicol. Rev.* 24, 93-106.
- Bradbury, S.P., Coats, J.R., 1989. Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 108, 133-177.
- Burgess, R.M., Pelletier, MC, Gundersen, JL, Perron, MM., Ryba, SA, 2005. Effects of different forms of organic carbon on the partitioning and bioavailability of nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1609-1617.
- Calow, P., 1989. The choice and implementation of environmental bioassays. *Hydrobiologia* 188/189, 61-64.
- Calow, P., Sept. 1994. *Handbook of Ecotoxicology*. Ed. Blackwell Science, 416 p.
- Calow, P., 1995. Methods to assess the effects of chemicals on fresh waters. In *Methods to assess effects of chemicals on ecosystems*, Ed. Wiley, Linthurst, Bourdeau and Tardiff, 416 p.
- Canadian Department of Environment, Food and Rural Affairs, 1989. Evaluation of IPBC (1). 27 p.
- Caquet, T., Lagadic, L., 1998. Conséquences d'atteintes individuelles précoces sur la dynamique des populations et la structuration des communautés et des écosystèmes. In : Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F. (Eds.). *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. Lavoisier Tec & Doc, Paris, 265-298.
- Caquet, T., Thybaud, E., Bras, S., Jonot, O., Ramade, F., 1992. Fate and biological effects of lindane and deltamethrin in freshwater mesocosms. *Aquat. Toxicol.* 23, 261-278.
- Caquet, T., Hanson, M.L., Roucaute, M., Graham, D.W., Lagadic, L., 2007. Influence of isolation on the recovery of pond mesocosms from the application of an insecticide. II. Benthic macroinvertebrate responses. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1280-1290.
- Castillo, L.E., de la Cruz, E., Ruedert, C., 1997. Ecotoxicology and pesticides in tropical aquatic ecosystems of Central America. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 41-51.
- Chappie, D.J., Burton, G.A., 2000. Applications of aquatic and sediment toxicity testing in situ. *Soil Sed. Contam.* 9, 219-245.
- Chern, J.M., Chien, Y.W., 2002. Adsorption of nitrophenol onto activated carbon: isotherms and breakthrough curves. *Wat. Res.* 36, 647-655.
- Coats, J.R., Symonik, D.M., Bradbury, S.P., Dyer, S.D., Timson, L.K., Atchinson, G.J., 1989. Toxicology of synthetic pyrethroids in aquatic organisms: an overview. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 671-679.
- Cold, A., Forbes, V.E., 2004. Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. *Aquat. Toxicol.* 67, 287-299.
- Colin, M.E., Belzunces, L.P., 1992. Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin : a convenient biological approach. *Pestic. Sci.* 36, 115-119.
- Cook, S.R., Dickinson, D.J.. Studies on the toxicity of IPBC and other biocides to bacteria. The international research group on wood preservation, 35th annual meeting, Ljubljana, Solvenia, 6-10 June 2004.
- Corbel, V., Chandre, F., Darriet, F., Lardeux, F., Hougard, J.-M., 2003. Synergism between permethrin and propoxur against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. *Med. Vet. Entomol.* 17, 158-164.
- Crane, M., Maltby, L., 1991. The lethal and sublethal responses of *Gammarus pulex* to stress: sensitivity and sources of variation in an *in situ* bioassay. *Environ Toxicol Chem* 10, 1331-1339.

- Crane, M., 1994. Population characteristics of *Gammarus pulex* (L.) from five English streams. *Hydrobiologia* 281, 91-100.
- Crane, M., Delaney, P., Watson, S., Parker, P., Walker, C., 1995a. The effect of Malathion 60 on *Gammarus pulex* (L.) below watercress beds. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1181-1188.
- Crane, M., Delaney, P., Mainstone, C., Clarke, S., 1995b. Measurement by *in situ* bioassay of water quality in an agricultural catchment. *Wat. Res.* 29, 2441-2448.
- Crane, M., Attwood, C., Sheahan, D., Morris, S., 1999. Toxicity and bioavailability of the organophosphorus insecticide pirimiphos methyl to the freshwater amphipod *Gammarus pulex* L. In laboratory and mesocosm systems. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1456-1461.
- Crini, G., 2003. Studies on adsorption of dyes on beta-cyclodextrin polymer. *Bioresour. Technol.* 90, 193-198.
- Crini, G., 2005. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Proj. Polym. Sci.* 30, 38-70.
- Crini, G., 2006. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. *Bioresour. Technol.* 97, 1061-1085.
- Crini, G., Morcellet, M., 2002. Synthesis and applications of adsorbents containing cyclodextrins. *J. Sep. Sci.* 25, 789-813.
- Crossland, N.O., Shires, S.W., Bennett, D., 1982. Aquatic toxicology of cypermethrin. III. Fate and biological effects of spray drift deposits in fresh water adjacent to agricultural land. *Aquat. Toxicol.* 2, 253-270.
- CTBA (Centre Technique du Bois et de l'Ameublement), 1996. *Le traitement des bois dans la construction.* Edition Eyrolles, 140 p.
- Dahl, J., Greenberg, L., 1996. Effects of habitat structure on habitat use by *Gammarus pulex* in artificial streams. *Freshwater Biol.* 36, 487-495.
- Daka, P.S., Obuseng, V.C., Torto, N., Huntsman-Mapila, P., 2006. Deltamethrin in sediment samples of the Okavango delta, Botswana. *Water SA* 32, 483-488.
- De Lange, H.J., Lurling, M., Van Den Borne, B., Peeters, E.T.H.M., 2005. Attraction of the amphipod *Gammarus pulex* to water-borne cues of food. *Hydrobiologia* 544, 19-25.
- De Lange, H.J., Sperber, V., Peeters, E.T.H.M., 2006. Avoidance of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediments by the freshwater invertebrates *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 452-457.
- Dedecker, A.P., Goethals, P.L.M., D'Heygere, T., De Pauw, N., 2006. Development of an in-stream migration model for *Gammarus pulex* L. (Crustacea, Amphipoda) as a tool in river restoration management. *Aquat. Toxicol.* 40, 249-261.
- Defoe, D.L., Ankley, G.T., 2003. Evaluation of time-to-effects as a basis for quantifying the toxicity of contaminated sediments. *Chemosphere* 51, 1-5.
- Degani, G., Herbst, G. N., Ortal, R., Bromley, H. J., Levanon, D., Netzer, Y., Harari, N., Glazman, H., 1993. Relationship between current velocity, depth and the invertebrate community in a stable river system. *Hydrobiologia* 263, 163-172.
- Delval, F., Crini, G., Morin, N., Vebrel, J., Bertini, S., Torri, G., 2002. Sorption of textile dyes on crosslinked polysaccharides derivatives. *Dyes and Pigments* 53, 79-92.

- Dick, J.T.A., 1996. Post-invasion amphipod communities of Lough Neagh, N. Ireland ; influences of habitat selection and differential predation. *J. Anim. Ecol.* 65, 756-767.
- Dirol, D., Deglise, X., 2001. Durabilité des bois. Hermes Science Publications, 415 p.
- Dubinin, M.M. Porous structure and adsorption properties of activated carbons. In: Walker Jr. P.L., editor, Chemistry and physics of carbon, vol. 2, New-York: Marcel Dekker, 1996, pp. 51-120.
- Egaas, E., Sandvik, M., Fjeld, E., Kallqvist, T., Goksoyr, A., Svensen, A., 1999. Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione S-transferase in brown trout (*Salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 122, 337-344.
- Eggers, T.O., Martens, S A., 2001. Bestimmungsschlüssel der Süßwasser-Amphipoda (Crustacea) Deutschland – A key to the freshwater Amphipoda (Crustacea) of Germany. *Lauterbornia* 42, 1-70.
- Ekelund, F., Westergaard, K., Soe, D., 2000. The toxicity of the fungicide propiconazole to soil flagellates. *Biol. Fertil. Soils* 31, 70-77.
- Eloy A.E., Goguilly M., 2000. Traitement de préservation du bois dans les scieries du Haut-Doubs et qualité des eaux superficielles. Rapport de D.E.S.S. Qualité et traitement des eaux, Université de Franche-Comté, 61 p.
- Elliott, J.M., 2002. The drift distances and time spent in the drift by freshwater shrimps, *Gammarus pulex*, in a small stony stream, and their implications for the interpretation of downstream dispersal. *Freshwater Biol.* 47, 1403-1417.
- Elliott, J.M., 2005. Day-night changes in the spatial distribution and habitat preferences of freshwater shrimps, *Gammarus pulex*, in a stony stream. *Freshwater Biol.* 50, 552-566.
- Elliott, J.M., 2006. Critical periods in the life cycle and the effects of a severe spate vary markedly between four species of elmid beetles in a small stream. *Freshwater Biol.* 51, 1527-1542.
- European Commission, 2002a. Working document – Guidance document on aquatic ecotoxicology. 62 p.
- European Commission, 2002b. Review report for the active substance deltamethrin. 78 p.
- European Commission, 2003a. Technical guidance on risk assessment – Part II. European Chemicals Bureau, European Communities Edition, 337 p.
- European Commission, 2003b. Review report for the active substance propiconazole. 58 p.
- European Commission, 2005. Review report for the active substance cypermethrin. 41 p.
- European Commission, 2006. Document I. Evaluation report - propiconazole. 50 p.
- Farrell, A.P., Stockner, E., Kennedy, C.J., 1998. A study of the lethal and sublethal toxicity of polyphase P-100, an antispain fungicide containing 3-iodo-2-propynyl butyl carbamate (IPBC), on fish and aquatic invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 472-478.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blank, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Vighi, M., Grimme, L.H., 2001. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquat. Toxicol.* 56, 13-32.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blank, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H., 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquat. Toxicol.* 63, 43-63.
- Figueiredo, J.L., Pereira, M.F.R., Freitas, M.M.A., Orfao, J.J.M., 1999. Modification of the surface chemistry of activated carbons. *Carbon* 37, 1379-1389.

- Foeckler, F., 1983. Untersuchungen zur Verbreitung und Schadstoffbelastung ober-fränkischer *Gammarus*-populationen. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Tierökologie, Universität Bayreuth, Allemagne, 112 p.
- Forbes, V.E., Cold, A., 2005. Effects on the pyrethroid esfenvalerate on life-cycle traits and population dynamics of *Chironomus riparius* – importance of exposure scenario. Environ. Toxicol. Chem. 24, 78-86.
- Forrow, D.M., Maltby, L., 2000. Toward an understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: direct and indirect effects on detritivore feeding. Environ. Toxicol. Chem. 19, 2100-2106.
- Franz, M., Arafat, H.A., Pinto, N.G., 2000. Effect of chemical surface heterogeneity on the adsorption mechanism of dissolved aromatics on activated carbon. Carbon 38, 1807-1819.
- Fränze, O., 2006. Complex bioindication and environmental stress assessment. Ecol. Indic. 6, 114-136.
- Friberg, N., Lindstrom, M., Kronvang, B., Larsen, S.E., 2003. Macroinvertebrates/sediment relationships along a pesticide gradient in Danish streams. Hydrobiologia 494, 103-110.
- Gan, J., Lee, S.J., Liu, W.P., Haver, D.L., Kabashima, J.N., 2005. Distribution and persistence of pyrethroids in runoff sediments. J. Environ. Qual. 34, 836-841.
- García-Criado, F., Fernández-Alaiz, M., 2001. *Hydraenidae* and *Elmidae* assemblages (Coleoptera) from a Spanish river basin : good indicators of coal mining pollution ? Arch. Hydrobiol. 150, 641-660.
- Gardner, D.S., Branham, B.E., 2001. Effects of turfgrass cover and irrigation on soil mobility and dissipation of mefenoxam and propiconazole. J. Environ. Qual. 30, 1612-1618.
- Gee, J.H.R., 1988. Population dynamics and morphometrics of *Gammarus pulex* L. : evidence of seasonal food limitation in a freshwater detritivore. Freshwater Biol. 19, 333-343.
- Giesy, J.P., Graney, R.L., 1989. Recent developments in and intercomparisons of acute and chronic bioassays and bioindicators. Hydrobiologia 188/189, 21-60.
- Gifford, J.S., Buckland, S.S., Judd, M.C., McFarlane, P.N., Anderson, S.M., 1996. Pentachlorophenol (PCP), PCDD, PCDF and pesticide concentrations in a freshwater lake catchment. Chemosphere 32, 2097-2113.
- Glazier, D.S., Horne, M.T., Lehman, M.E., 1992. Abundance, body composition and reproductive output of *Gammarus minus* (Crustacea: Amphipoda) in ten cold springs differing in pH and ionic content. Freshwater Biol. 28, 149-163.
- Graça, M.A.S., Maltby, L., Calow, P., 1994a. Comparative ecology of *Gammarus pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.) I: population dynamics and microdistribution. Hydrobiologia 281, 151-162.
- Graça, M.A.S., Maltby, L., Calow, P., 1994b. Comparative ecology of *Gammarus pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.) II: fungal preferences, Hydrobiologia 281, 163-170.
- Gray, J.S., 1980. The measurement of effects of pollutants on benthic communities. Rapp. Réun. Cons. Explor. Mer. 179, 188-193.
- Green, R.M., Abdelghani, A.A., 2004. Toxicity of a mixture of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Monosodium Methanearsonate to the Red Swamp Crawfish, *Procambarus clarkii*. Int. J. Environ. Res. Public Health 1, 35-38.

- Hadfield, S.T., Sadler, J.K., Bolygo, E., Hill, S., Hill, I.R., 1993. Pyrethroid residues in sediment and water samples from mesocosm and farm pond studies of simulated accidental aquatic exposure. *Pestic. Sci.* 38, 283-294.
- Hagger, J.A., Jones, M.B., Leonard, D.R.P., Owen, R., Galloway, T.S., 2006. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are the more questions than answers? *Integrat. Environ. Assess. Manag.* 2, 312-329.
- Hallenbeck, W.H., Gochfeld, M., 2000. Toxicology and Risk Assessment. *Protecting Personnel at Hazardous Waste Sites*, Third Edition, 83-136.
- Hansen, P.-D., Blasco, J., DelValls, T.A., Poulsen, V., van den Heuvel-Greve, V., 2007. Biological analysis (Bioassays, Biomarkers, Biosensors). *Sustainable Management of Sediment Resources*, Volume 1, 131-161.
- Harino, H., Mori, Y., Yamagushi, Y., Shibata, K., Senda, T., 2005. Monitoring of antifouling booster biocides in water and sediment from the port of Osaka, Japan. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 303-310.
- Haydar, S., Ferro-Garcia, M.A., Rivera-Utrilla, J., Joly, J.P., 2003. Adsorption of p-nitrophenol on an activated carbon with different oxidations. *Carbon* 41, 387-395.
- Heckmann, L.-H., Friberg, N., 2005. Macroinvertebrate community response to pulse exposure with the insecticide lambda-cyhalothrin using in-stream mesocosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 582-590.
- Heckmann, L.-H., Friberg, N., Ravn, H., 2005. Relationship between biochemical biomarkers and pre-copulatory behaviour and mortality in *Gammarus pulex* following pulse-exposure to lambda-cyhalothrin. *Pest. Manag. Sci.* 61, 627-635.
- Helson, B.V., Kingsbury, P.D., De Groot, P., 1986. The use of bioassay to assess aquatic arthropod mortality from permethrin drift deposits. *Aquat. Toxicol.* 9, 253-262.
- Helson, B.V., Surgeoner, G.A., 1986. Efficacy of cypermethrin for the control of mosquito larvae and pupae, and impact on non-target organisms, including fish. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2, 269-275.
- Hill, I.R., 1985. Effects on nontarget organisms in terrestrial and aquatic environments. 151-262. *The pyrethroid insecticides*. J.P. Leadey Edition, Taylor and Francis, London and Philadelphia, 440 p.
- Hill, I.R., Shaw, J.L., Maund, S.J., 1994. Review of aquatic field tests with pyrethroid insecticides. *Fresh. Field Tests Haz. Assess. Chem.* 15, 249-271.
- Hingston, J.A., Moore, J., Bacon, A., Lester, J.N., Murphy, R.J., Colins, C.D., 2002. The importance of the short-term leaching dynamics of wood preservatives. *Chemosphere* 47, 517-523.
- Hingston, J.A., Murphy, R.J., Lester, J.N., 2006. Monitoring losses of copper based wood preservatives in the Thames estuary. *Environ. Pollut.* 143, 367-375.
- Holloway, P.J., Western, M., 2003. Tank-mix adjuvants and pesticide residues: some regulatory and quantitative aspects. *Pest. Manag. Sci.* 59, 1237-1244.
- Hultin, L., 1971. Upstream movements of *Gammarus pulex pulex* (Amphipoda) in a south Swedish stream. *Oikos* 22, 329-347.
- Hynes, H.B.N., 1955. The reproductive cycle of some British freshwater Gammaridae. *J Anim Ecol* 24, 352-387.
- IFEN (Institut Français de l'ENvironnement), 2006. Les pesticides dans les eaux – Données 2003 et 2004. Numéro 5, 40 p.

- INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité), 2006. Produits de traitement du bois – Composition, dangers, mesures de prévention, 12 p.
- Ismail, I.S., Kalithasan, K., 2003. Dissipation and mobility of permethrin in the field with repeated applications under tropical conditions. *J. Environ. Sci. Health B.* 38, 133-146.
- Iversen, T.M., Jessen, J., 1977. Life-cycle, drift and producing of *Gammarus pulex* L. (Amphipoda) in a Danish spring. *Freshwater Biol.* 7, 287-296.
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J.T., Roe, R.M.R.M., 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop. Protect.* 23, 371-378.
- Jackson, C.J., Lamb, D.C., Kelly, D.E., Kelly, S.L., 2000. Bactericidal and inhibitory effects of azole antifungal compounds on *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol. Letters* 192, 159-162.
- Janetzky, W., 1994. Distribution of the genus *Gammarus* (Amphipoda: Gammaridae) in the River Hunte and its tributaries (Lower Saxony, northern Germany). *Hydrobiologia* 294, 23-34.
- Jarrad, H.E., Delaney, K.R., Kennedy, C.J., 2004. Impacts of carbamate pesticides on olfactory neurophysiology and cholinesterase activity in coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*). *Aquat. Toxicol.* 69, 133-148.
- Jepson, P.C., 1993. Ecological insights into risk analysis: the side-effects of pesticides as a case study. *Sci. Tot. Environ (suppl.)*, 1547-1566.
- Jergentz, S., Mugni, H., Bonetto, C., Schulz, R., 2005. Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61, 817-826.
- Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.A., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2701-2713.
- Jordan, E.G., Kaufman, D.D., Kayser, A.J., 1982. The effects of soil temperature on the degradation of cis, trans-permethrin in soil. *J. Environ. Sci. Health B* 17, 1-17.
- Juergensen, L., Busnarda, J., Caux, P.Y., Kent, R., 2000. Fate, behavior, and aquatic toxicity of the fungicide IPBC in the Canadian environment. *Environ. Toxicol.* 15, 201-213.
- Junghans, M., Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., 2006. Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticide mixtures. *Aquat. Toxicol.* 76, 93-110.
- Juntunen, M.L., Kitunen, V., 2003. Leaching of propiconazole and chlorothalonil during protection of *Pinus sylvestris* seedlings in containers. *Scandinav. J. Forest Res.* 18, 45-53.
- Karaman, G.S., Pinkster, S., 1977. Freshwater *Gammarus* species from Europe, north Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda). *Bijdr. Dierk.* 47, 1-97.
- Kast-Hutcheson, K., Rider, C.V., Leblanc, G.A., 2001. The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 502-509.
- Kaufman, D.D., Russell, B.A., Helling, C.S., Kayser, A.J., 1981. Movement of cypermethrin, decamethrin, permethrin, and their degradation products in soil. *J. Agric. Food Chem.* 29, 239-245.
- Kelly, D.W., Dick, J.T.A., Montgomery, W.I., 2002. The functional role of *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): shredders, predators, or both? *Hydrobiologia* 485, 199-203.

- Kim, I.S., Beaudette, L.A., Han Shim, J., Trevors, J.T., Tack Suh, Y., 2002. Environmental fate of the triazole fungicide propiconazole in a rice-paddy-soil lysimeter. *Plant and soil* 239, 321-331.
- Kingsbury, P.D., Kreutzweiser, D.P., 1987. Permethrin treatments in Canadian forests. Part 1: impact on stream fish. *Pestic. Sci.* 19, 35-48.
- Kinne, O., 1953. Zür Biologie und Physiologie von *Gammarus duebeni* Lillj.. I.-Z. wiss. Zool. 157, 427-491.
- Kolding, S., Fenchel, T., 1979. Coexistence and life cycle characteristics of five species of the amphipod genus *Gammarus*. *Oikos* 33, 323-327.
- Kolding, S., Fenchel, T., 1981. Patterns of reproduction in different populations of five species of the amphipod genus *Gammarus*. *Oikos* 37, 167-172.
- Kovac, D., Maschwitz, U., 2000. Protection of hydrofuge respiratory structures against detrimental microbiotic growth by terrestrial grooming in water beetles. *Entomol. Gener.* 24, 277-292.
- Kreuger, J., 1998. Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990-1996. *Sci. Total Environ.* 216, 227-251.
- Kreutzweiser, D.P., Kingsbury, P.D., 1987. Permethrin treatments in Canadian forests. Part 2: impact on stream invertebrates. *Pestic. Sci.* 19, 49-60.
- Kreutzweiser, D.P., Kingsbury, P.D., Feng, J.C., 1989. Drift response of stream invertebrates to aerial applications of glyphosphate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 331-338.
- Kreutzweiser, D.P., Sibley, P.K., 1991. Invertebrate drift in a headwater stream treated with permethrin. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 330-336.
- Krogh, K.A., Halling-Sorensen, B., Mogensen, B.B., Vejrup, K.V., 2003. Environmental properties and effects on nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere* 50, 871-901.
- Kronvang, B., Laubel, A., Larsen, S.E., Friberg, N., 2003. Pesticides and heavy metals in Danish streambed sediment. *Hydrobiologia* 494, 93-101.
- Kronvang, B., Strøm, H.L., Hoffmann, C.C., Laubel, A., Friberg, N., 2004. Subsurface tile drainage loss of modern pesticides: field experiment results. *Wat. Sci. Tech.* 49, 139-148.
- Kumaraguru, A.K., Beamish, F.W.H., 1981. Lethal toxicity of permethrin (NRDC-143) to rainbow trout, *Salmo gairdneri*, in relation to body weight and water temperature. *Wat. Res.* 15, 503-505.
- Ladewig, V., Jungmann, D., Köhler, H.-R., Schirling, M., Tribskorn, R., Nagel, R., 2006. Population structure and dynamics of *Gammarus fossarum* (Amphipoda) upstream and downstream from effluents of sewage treatment plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 370-383.
- Lafont, M., 1984. Oligochaete communities as biological descriptors of pollution in the fine sediments of rivers. *Hydrobiologia* 115, 127-129.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade F. (Eds), 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie – Aspects fondamentaux. Editions Masson, Paris, 419 p.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade F. (Eds), 1998. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier Tec & Doc, Paris.
- Lauridsen, R.B., Friberg, N., 2005. Stream macroinvertebrate drift response to pulsed exposure of the synthetic pyrethroid lambda-cyhalothrin. *Environ. Toxicol.* 20, 513-521.
- Lawrence, A.J., Poulter, C., 1998. Development of a sub-lethal pollution bioassay using the estuarine amphipod *Gammarus duebeni*. *Wat. Res.* 32, 569-578.

- Lebkowska, M., Zaleska-Radziwill, M., Rutkowska-Narozniak, A., Kobiela, S., 2003. Toxicity assessment of wood preservatives. *Environ. Int.* 28, 801-802.
- Levine, S.L., Oris, J.T., Denison, M.S., 1999. Modulation of Cyp1A expression in rainbow trout by a technical grade formulation of propiconazole. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2565-2573.
- Lieb, D.A., Carline, R.F., 2000. Effects of urban runoff from a detention pond on water quality, temperature and caged *Gammarus minus* (Say) (Amphipoda) in a headwater stream. *Hydrobiologia* 441, 107-116.
- Liess, M., Schulz, R., Liess, M.H.D., Rother, B., Kreuzig, R., 1999. Determination of insecticide contamination in agricultural headwater streams. *Wat. Res.* 33, 239-247.
- Liess, M., Von Der Ohe, P.C., 2005. Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 954-965.
- Linthurst, R.A., 1995. Methods to study chemical effects. In *Methods to assess effects of chemicals on ecosystems*. Ed. Wiley, Linthurst, Bourdeau and Tardiff, 416p.
- Liu, W., Gan, J., Lee, S., Werner, I., 2005. Isomer selectivity in aquatic toxicity and biodegradation of bifenthrin and permethrin. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1861-1866.
- Lode, O., Eklo, O.M., Holen, B., Svensen, A., Johnsen, A.M., 1995. Pesticides in precipitation in Norway. *The Science of the Total Environment* 160/161, 421-431.
- Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Über kombinationswirkungen. 1. Mitteilung: hilfsmittel der fragestellung. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 114, 313-326.
- Long, J.L.A., House, W.A., Parker, A., Rae, J.E., 1998. Micro-organic compounds associated with sediments in the Humber rivers. *Sci. Tot. Environ.* 200/211, 229-253.
- Lopes, C., Pery, A.R.R., Chaumont, A., Charles, S., 2005. Ecotoxicology and population dynamics: using DEBtox models in a Leslie modelling approach. *Ecological Modelling* 188, 30-40.
- Lutnicka, H., Bogacka, T., Wolska, L., 1999. Degradation of pyrethroids in an aquatic ecosystem model. *Wat. Res.* 33, 3441-3446.
- Lyytikäinen, M., Sormunen, A., Peraniemi, S., Kukkonen, J.V.K., 2001. Environmental fate and bioavailability of wood preservatives in freshwater sediments near an old sawmill site. *Chemosphere* 44, 341-350.
- McCahon, C.P., Pascoe, D., 1988a. Use of *Gammarus pulex* (L.) in safety evaluation tests: culture and selection of a sensitive life stage. *Ecotox Environ Saf* 15, 245-252.
- McCahon, C.P., Pascoe, D., 1988b. Culture techniques for three freshwater macroinvertebrate species and their use in toxicity tests. *Chemosphere* 17, 2471-2480.
- McLoughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R.M., Yu, H., 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2085-2092.
- McNeil, C., Dick, J.T.A., Elwood, R.W., 1997. The trophic ecology of freshwater *Gammarus* (Crustacea : Amphipoda) ; problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biol. Rev* 72, 349-364.
- McNeill, A., 1989. The effects of a timber preservative spillage on the ecology of the river Losie. *J. IWEM* 3, 496-504.
- Maitland, P.S., 1966. Notes on the biology of *Gammarus pulex* in the river Endrick. *Hydrobiologia* 28, 142-152.

- Malbouisson, J.F.C., Young, T.W.K., Bark, A.W., 1995. Use of feeding rate and re-pairing of precopulatory *Gammarus pulex* to assess toxicity of a gamma-hexachlorocyclohexane (lindane). *Chemosphere* 30, 1573-1583.
- Malmqvist, B., Sjöström, P., 1985. The microdistribution of three beetle species inhabiting a south Swedish stream riffle. *Acta Hydrobiol.* 25-26, 409-414.
- Maloney, S.E., Maule, A., Smith, A.R., 1988. Microbial transformation of the pyrethroid insecticides: permethrin, deltamethrin, fastac, fenvalerate, and fluvalinate. *Appl. Envir. Microbiol.* 54, 2874-2876.
- Maltby, L., 1995. Sensitivity of the crustaceans *Gammarus pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.) to short-term exposure to hypoxia and unionised ammonia: observations and possible mechanisms. *Wat. Res.* 29, 781-787.
- Maltby, L., Clayton, S.A., Yu, H., McLoughlin, N., Wood, R.M., Yin, D., 2000. Using single-species toxicity tests, community-level responses, and toxicity identification evaluations to investigate effluent impacts. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 151-157.
- Maltby, L., Clayton, S.A., Wood, R.M., McLoughlin, N., 2002. Evaluation of the *Gammarus pulex in situ* feeding assay as a biomonitor of water quality: robustness, responsiveness, and relevance. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 361-368.
- Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G., 2003. Chapter 1 Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. In *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*, Volume 6, 3-39.
- Matthiessen, P., Sheahan, D., Harrison, R., Kirby, M., Rycroft, R., Turnbull, A., Volkner, C., Williams, R., 1995. Use of a *Gammarus pulex* Bioassay to Measure the Effects of Transient Carbofuran Runoff from Farmland" *Ecotox. Environ. Saf.* 30, 111-119.
- Mattson, J.S., Mark, H.B., Malbin, M.D., Weber, W.J., Critten, J.C., 1969. Surface chemistry of active carbon: specific adsorption of phenol. *J. Colloid Int. Sci.* 3, 116-130.
- Maund, S.J., Taylor, E.J., Pascoe, D., 1992. Population responses of the freshwater amphipod crustacean *Gammarus pulex* (L.) to copper. *Freshwater Biol.* 28, 29-36.
- Maund, S.J., Hamer, M.J., Lane, M.C.G., Farrelly, E., Rapley, J.H., Goggin, U.M., Gentle, W.E., 2002. Partitioning, bioavailability, and toxicity of the pyrethroid insecticide cypermethrin in sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 9-15.
- Meijering, M.P.D., 1991. Lack of oxygen and low pH as limiting factors for *Gammarus* in Hessian brooks and rivers. *Hydrobiologia* 223, 159-169.
- Meliyan, R.I., 1991. Effect of pesticides on reproductive function of the freshwater amphipod *Gammarus kischineffensis*. *Hydrobiol. J.* 27, 33-36.
- Meyran, J.C., Gielly, L.; Taberley, P., 1998. Environmental calcium and mitochondrial DNA polymorphism among local populations of *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). *Molec. Ecol.* 7, 1391-1400.
- Mian, L.S., Mulla, M.S., 1992. Effects of pyrethroid insecticides on nontarget invertebrates in aquatic ecosystems. *J. Agric. Entomol.* 9, 73-98.
- Minshall, G.W., Minshall, J.N., 1978. Further evidence on the role of chemical factors in determining the distribution of benthic invertebrates in the River Duddon. *Arch. Hydrobiol.* 83, 324-355.

- Moreno-Castilla, C., Ferro-Garcia, M.A., Joly, J.P., Bautista-Toledo, I., Carrasco-Marin, F., Rivera-Utrilla, J., 1995. Activated carbon surface modifications by nitric acid, hydrogen peroxide, and ammonium peroxydisulfate treatments. *Langmuir* 11, 4386-4392.
- Mortensen, S.R., Johnson, K.A., Weisskopf, C.P., Hooper, M.J., Lacher, T.E., Kendall, R.J., 1998. Avian exposure to pesticides in Costa Rican banana plantations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 562-568.
- Motomura, H., Narashashi, T., 2000. Temperature dependence of pyrethroid modification of single sodium channels in rat hippocampal neurons. *J. Membrane Biol.* 177, 23-39.
- Mottram, J.C., 1933. Some observations on the life history of the freshwater shrimp. *Trans. Newbury Distr. Fld Club* 7, 2-4.
- Muirhead-Thomson, R.C., 1978. Lethal and behavioural impact of permethrin (NRDC 143) on selected stream macroinvertebrates. *Mosq. News* 38, 185-190.
- Müller, J., Patsch, E., Link, A., 2000. Differentiation in morphology and habitat partitioning of genetically characterized *Gammarus fossarum* forms (Amphipoda) across a contact zone. *Biol. J. Limn. Soc.* 69, 41-53.
- Mulliss, R.M., Revitt, D.M., Shutes, R.B.E., 1996a. A statistical approach for the assessment of the toxic influences on *Gammarus pulex* (Amphipoda) and *Asellus aquaticus* (Isopoda) exposed to urban aquatic discharges. *Wat. Res.* 30, 1237-1243.
- Mulliss, R.M., Revitt, D.M., Shutes, R.B.E., 1996b. The determination of the toxic influences to *Gammarus pulex* (amphipoda) caged in urban receiving waters. *Ecotoxicology* 5, 209-215.
- Munier-Lamy C., Borde, O., 2000. Effect of a triazole fungicide on the cellulose decomposition by the soil microflora. *Chemosphere* 41, 1029-1035.
- Naylor, C., Maltby, L., Calow, P., 1989. Scope for growth in *Gammarus pulex*, a freshwater benthic detritivore. *Hydrobiologia* 188/189, 517-523.
- Neumann, M., Schulz, R., Scafer, K., Muller, W., Mannheler, W., Liess, M., 2002. The significance of entry routes as point and non-point sources of pesticides in small streams. *Wat. Res.* 36, 835-842.
- Neumann, M., Liess, M., Schulz, R., 2003a. A qualitative sampling method for monitoring water quality in temporary channels or point sources and its application to pesticide contamination. *Chemosphere* 51, 509-513.
- Neumann, M.; Baumeister, J., Liess, M., Schulz, R., 2003b. An expert system to estimate the pesticide contamination of small streams using benthic macroinvertebrates as bioindicators I. The database of LIMPACT. *Ecol. Indic.* 2, 379-389.
- Newman, M.C., 2001. Population ecotoxicology. Hierarchical ecotoxicology series, Edition John Wiley and sons, 228 p.
- Nilsson, L.M., 1977. Incubation time, growth and mortality of the amphipod *Gammarus pulex* under laboratory conditions. *Oikos* 29, 93-98.
- Noh, J.S., Schwarz, J.A., 1989. Estimation of the point of zero charge of simple oxides by mass titration. *J. Colloid Int. Sci.* 130, 157-164 .
- Nouri, S., Haghseresht, F., Max Lu, G.Q., 2002. Comparison of adsorption capacity of p-cresol & p-nitrophenol by activated carbon in single and double solute. *Adsorption* 8, 215-223.

- Obrdlik, P., 1972. A population of *Rivulogammarus fossarum* Koch (Amphipoda) in a small fishless stream. *Hydrobiologia* 40, 279-295.
- Olima, C., Pablo, F., Lim, R.P., 1997. Comparative tolerance of three populations of the freshwater shrimp (*Paratya australiensis*) to the organophosphate pesticide, chlorpyrifos. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 321-328.
- Olmi, M., 1976. *Coleoptera Dryopidae, Elminthidae*. Fauna d'Italia 13. Calderini, Bologna, Italia, 280 p.
- Ostiz, S.B., Khan, S.U., 1994. Nonextractable (bound) residues of cypermethrin in soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 907-912.
- Oudou, H.C., Hansen, H.C.B., 2002. Sorption of lambda-cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin and fenvalerate to quartz, corundum, kaolinite and montmorillonite. *Chemosphere* 49, 1285-1294.
- Overmyer, J.P., Noblet, R., Armbrust, K.L., 2005. Impacts of lawn-care pesticides on aquatic ecosystems in relation to property value. *Environ. Pollut.* 137, 263-272.
- Papaefthimiou, C., Theophilidis, G., 2001. The Cardiotoxic Action of the Pyrethroid Insecticide Deltamethrin, the Azole Fungicide Prochloraz, and their Synergy on the Semi-Isolated Heart of the Bee *Apis mellifera macedonica*. *Pest. Biochem. Physio.* 69, 77-91.
- Paul, E.A., Simonin, H.A., Tomajer, T.M., 2005. A comparison of the toxicity of synergized and technical formulations of permethrin, sumithrin, and resmethrin to trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 251-259.
- Pereira, M.F.R., Soares, S.F., Orfao, J.J.M., Figueiredo, J.L., 2002. Adsorption of dyes on activated carbons: influence of surface chemical groups. *Carbon* 41, 811-821.
- Picado, A., Chankova, S., Fernandes, A., Simoes, F., Leverett, D., Johnson, I., Hernan, R., Pires, A.M., Matos, J., 2007. Genetic variability in *Daphnia magna* and ecotoxicological evaluation. *Ecotox. Environ. Saf.* 67, 406-410.
- Pilling, E.D., Bromleychallenor, K.A.C., Walker, C.H., Jepson, P.C., 1995. Mechanism of Synergism between the Pyrethroid Insecticide λ -Cyhalothrin and the Imidazole Fungicide Prochloraz, in the Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pestic. Biochem. Physio.* 51, 1-11.
- Pinkster, S., Smith, H., Brande-de Jong, N., 1977. The introduction of the alien amphipod *Gammarus tigrinus* Sexton, 1939, in the Netherlands and its competition with indigenous species. *Crustaceana Suppl.* 4, 91-105.
- Pöckl, M., Humpesch, H., 1990. Intra- and inter-specific variations in egg survival and brood development time for Australian populations of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda). *Freshwater Biol.* 23, 441-455.
- Pollard, S.J.T., Fowler, G.D., Sollars, C.J., Perry, R., 1992. Low-cost adsorbents for waste and waste water treatment: a review. *Sci. Total Environ.* 116, 31-52.
- Poulton, M., Pascoe, D., 1990. Disruption of precopula in *Gammarus pulex* (L.) – Development of a behavioural bioassay for evaluating pollutant and parasite induced stress. *Chemosphere* 20, 403-415.
- Prygiel, J., Rosso-Darmet, A., Lafont, M., Lesniak, C., Durbec, A., Ouddane, B., 1999. Use of oligochaete communities for assessment of ecotoxicological risk in fine sediment of rivers and canals of the Artois-Picardie water basin (France). *Hydrobiologia* 410, 25-37.

- R development Core Team, 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Radovic, L.R., Moreno-Castilla, C., Rivera-Utrilla, J., 2000. Carbon materials as adsorbents in aqueous solutions. In: Radovic, L.R., ed. Chemistry and physics of carbon, vol. 27, New-York: Marcel Dekker, p. 227-405.
- Radovic, L.R., Silva, I.F., Ume, J.I., Menendez J.A., Leon y Leon, C.A., Scaroni, A.W., 1997. An experimental and theoretical study of the adsorption of aromatics possessing electron-withdrawing and electron-donating functional groups by chemically modified activated carbons. Carbon 35, 1339-1348.
- Ramade, F., 1995. Estimation of damage to ecosystems. In *Methods to assess effects of chemicals on ecosystems*, Ed. Wiley, Linthurst, Bourdeau and Tardiff, 416 p.
- Ramade, F., 2007. Introduction à l'écotoxicologie – Fondements et applications. Editions Tech & Doc, Paris, 618 p.
- Rawer-Jost, C., Blank, J., Rahmann, H., 2000. Macroinvertebrate functional feeding group methods in ecological assessment. Hydrobiologia 422/423, 225-232.
- Rawn, G.P., Webster, G.R., Muir, D.C., 1982. Fate and permethrin in model outdoor ponds. J. Environ. Sci. Health B 17, 463-486.
- Rayzal, M., 1998. Guide de la préservation du bois. CTBA Edition, Paris, 128 p.
- Reinert, K.H., Giddings, J.M., Judd, L., 2002. Effects analysis of time-varying or repeated exposures in aquatic ecological risk assessment of agrochemicals. Environ. Toxicol. Chem. 21, 1977-1992.
- Reynaldi, S., Liess, M., 2005. Influence of duration of exposure to the pyrethroid fenvalerate on sublethal responses and recovery of *Daphnia magna* Straus. Environ. Toxicol. Chem. 24, 1160-1164.
- Riise, G., Krogstad, T., Pettersen, M.N., 2001. Association of the fungicide propiconazole with size fractionated material from a silty clay soil – S.E. Norway. Wat. Air Soil Pollut. 129, 245-257.
- Riise, G., Wu, Q., Lundekvam, H., Haugen, L.E., Mulder, J., 2006. Suspended sediments as carriers for the fungicide propiconazole in agricultural runoff. Verh. Internat. Verein. Limnol. 29, 1296-1300.
- Roberts, T.R., Standen, M.E., 1981. Further studies of the degradation of the pyrethroid insecticide cypermethrin in soils. Pestic. Sci. 12, 285-296.
- Roddie, B., Kedwards, T., Crane, M., 1992. Potential impact of watercress farm discharges on the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 48, 63-69.
- Roessink, I., Arts, G.H.P., Belgers, J.D.M., Bransen, F.F.J., Maund, S.J., Brock, T.C.M., 2005. Effects of lambda-cyhalothrin in two ditch microcosm systems of different trophic status. Environ. Toxicol. Chem. 24, 1684-1696.
- Rosillon, D., 1985. Seasonal variations in the benthos of a chalk trout stream, the river Samson, Belgium. Hydrobiologia 126, 253-262.
- Roussel UCLAF, 1982. Deltamethrin – Monograph. Roussel-Uclaf, 413 p.
- Roux, A.L., 1970. Les gammarès du groupe pulex. Essai de systématique biologique – 1. Etude morphologique et morphodynamique. PhD Thesis. Université de Lyon, 1-172.
- Sakata, S., Mikami, N., Matsuda, T., Miyamoto, J., 1986. Degradation and leaching behaviour of the pyrethroid insecticide cypermethrin in soils. J. Pestic. Sci. 11, 71-79.

- Samsonov, Y.N., Pokrovskii, L.M., 2001. Sensitized photodecomposition of high disperse pesticide chemicals exposed to sunlight and irradiation from halogen or mercury lamp. *Atmosph. Environ.* 35, 2133-2141.
- Sanchez-Fortun, S., Barahona, M.V., 2005. Comparative study on the environmental risk induced by several pyrethroids in estuarine and freshwater invertebrate organisms. *Chemosphere* 59, 553-559.
- Sarma, S.S.S., Nandini, S., 2006. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. *J. Environ. Sci. Health B* 41, 1417-1430.
- Savage, A.A., 2000. Community structure during a 27-year study of the macroinvertebrate fauna of a chemically unstable lake. *Hydrobiologia* 421, 115-127.
- Scherer, E., 1965. Analytisch-ökologische Untersuchungen zur Verteilung tierischer Bachbesiedler. Dissertation, Univ. Giessen, 1-66.
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R., Triebkorn, R., Köhler, H.R., 2005. Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): influence of wastewater effluents, temporal variability, and spatial aspects on natural populations. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* (49), pp. 53-61, 2005.
- Schleiter, I.M., Borchardt, D., Wagner, R., Dapper, T., Schmidt, K.-D., Schmidt, H.-H., Werner, H., 1999. Modelling water quality, bioindication and population dynamics in lotic ecosystems using neural networks. *Ecol. Model.* 120, 271-286.
- Scholze, M., Boedeker, W., Faust, M., Backhaus, T., Altenburger, R., Grimme, L.H., 2001. A general best-fit method for concentration-response curves and the estimation of low-effect concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 448-457.
- Schrimppff, E., Foeckler, F., 1985. Gammarids in streams of northeastern Bavaria, F.R.G. I. Prediction of their general occurrence by selected hydrochemical variables. *Arch. Hydrobiol.* 103, 479-495.
- Schulz, R., Liess, M., 1999a. Validity and ecological relevance of an active in situ bioassay using *Gammarus pulex* and *Limnephilus lunatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2243-2250.
- Schulz, R., Liess, M., 1999b. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. *Aquat. Toxicol.* 46, 155-176.
- Schulz, R., Liess, M., 2001a. Runoff simulation with particle-bound fenvalerate in multispecies stream microcosms : importance of biological interactions. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 757-762.
- Schulz, R., Liess, M., 2001b. Acute and chronic effects of particle-associated fenvalerate on stream macroinvertebrates : a runoff simulation study using outdoor microcosms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 481-488.
- Schulz, R., 2003. Using a freshwater amphipod *in situ* bioassay as a sensitive tool to detect pesticide effects in the field. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1172-1176.
- Schultz, E., Joutti, A., Räisänen, M. L., Lintinen, P., Martikainen, E., Lehto, O., 2004. Extractability of metals and ecotoxicity of soils from two old wood impregnation sites in Finland. *Sci. Tot. Environ.* 326, 71-84.
- Schumann, F., 1928. Experimentelle Untersuchungen über die Bedeutung einiger Salze, insbesondere des kohlensauren Kalkes, für Gammariden und ihren Einfluss auf deren Häutungsphysiologie und Lebensmöglichkeit. *Zool. Jb.* 44, 623-704.
- Sexton, E.W., 1924. The moulting and growth stages of *Gammarus*, with descriptions of the normals and intersexes of *G. chevreuxi*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 13, 340-401.

- Sherratt, T.N., Roberts, G., Williams, P., Whitfield, M., Biggs, J., Shillabeer, N., Maund, S.J., 1999. A life-history approach to predicting the recovery of aquatic invertebrate populations after exposure to xenobiotic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 2512-2518.
- Shim, J.W., Park, S.J., Ryu, S.K., 2001. Effect of modification with HNO₃ and NaOH on metal adsorption by pitch(based activated carbon fibers. *Carbon* 39, 1635-1642.
- Shires, S.W., 1983. The use of small enclosures to assess the toxic effects of cypermethrin on fish under field conditions. *Pestic. Sci.* 14, 475-480.
- Sibley, P.K., Kaushik, N.K., Kreutzweiser, D.P., 1991. Impact of a pulse application of permethrin on the macroinvertebrate community of a headwater stream. *Environ. Pollut.* 70, 35-55.
- Smith, H., Wood, P.J., Gunn, J., 2003. The influence of habitat structure and flow permanence on invertebrate communities in karst spring systems. *Hydrobiologia* 510, 53-66.
- Soetaert, A., Moens, L.N., Van der Ven, K., Van Leemput, K., Blust, R., De Coen, W.M., 2005. Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.*, 142, 66-76.
- Solomon, K.R., Giddins, J.M., Maund, S.J., 2001. Probabilistic risk assessment of cotton pyrethroids: I. Distributional analyses of laboratory aquatic toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 652-659.
- Spicer, J.I., Dando, C.L., Maltby, L., 2002. Anaerobic capacity of a crustacean sensitive to low environmental oxygen tensions, the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Hydrobiologia* 477, 189-194.
- Sprague, J.B., 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Wat. Res.* 4, 3-32.
- Stephenson, R.R., 1982. Aquatic toxicology of cypermethrin. I. Acute toxicity to some freshwater fish and invertebrates in laboratory tests. *Aquat. Toxicol.* 2, 175-185.
- Stephenson, R.R., 1983. Effects of water hardness, water temperature, and size of the test organism on the susceptibility of the freshwater shrimp *Gammarus pulex* (L.) to toxicants. *Bull Environ Contam Toxicol* 31, 459-466.
- Stratton, G.W., 1985. The influence of solvent type on solvent-pesticide interactions in bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 14, 651-658.
- Sundaram, K.M.S., 1991. Fate and short-term persistence of permethrin insecticide injected in a northern Ontario (Canada) headwater stream. *Pestic. Sci.* 31, 281-294.
- Sutcliffe, D.W., 1992. Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): basic processes. *Freshwater Forum* 2, 102-128.
- Thiere, G., Schulz, R., 2004. Runoff-related agricultural impact in relation to macroinvertebrate communities of the Lourens River, South Africa. *Wat. Res.* 38, 3092-3102.
- Thompson, H.M., 1996. Interactions between pesticides; a review of reported effects and their implications for wildlife risk assessment. *Ecotoxicology* 5, 59-81.
- Thortensen, C.W., Lode, O., 2001. Laboratory degradation studies of benazone, dichlorprop, MCPA, and propiconazole in Norwegian soils. *J. Environ. Qual.* 30, 947-953.
- Tierney, K.B., Taylor, A.L., Ross, P.S., Kennedy, C.L., 2006. The alarm reaction of coho salmon parr is impaired by the carbamate fungicide IPBC. *Aqua. Toxicol.* 79, 149-157.

- Topping, C.J., Odderskaer, P., 2004. Modeling the influence of temporal and spatial factors of the assessment of impacts of pesticides on skylarks. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 509-520.
- Triebeskorn, R., Adam, S., Casper, H., Honnen, W., Pawert, M., Schramm, M., Schwaiger, J., Köhler, H.-R., 2002. Biomarkers as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms. *Ecotoxicology* 11, 451-465.
- Tucker, K.A., Burton Jr., G.A., 1999. Assessment of nonpoint-source runoff in a stream using *in situ* and laboratory approaches. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2797-2803.
- UK (United Kingdom) Environment Agency, 2002. Environmental Quality Standards for cypermethrin and flumethrin. 127 p.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency), 1996. Ecological effects test guidelines - OPPTS 850.1020 Gammarid acute toxicity test. Public draft, 11 p.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency), 1997. Registration Eligibility Decision for 3-Iodo-2-propynylbutylcarbamate (IPBC). 141 p.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency), 1999. Federal Register Environmental Documents (Tebuconazole). 7 p.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency), 2006a. Registration Eligibility Decision for cypermethrin. 79 p.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency), 2006b. Registration Eligibility Decision for propiconazole. 153 p.
- Van Wijngaarden, R.P.A., Cuppen, J.G.M., Arts, G.H.P., Crum, S.J.H., Van den Hoorn, M.W., Van den Brink, P.J., Brock, T.C.M., 2004. Aquatic risk assessment of a realistic exposure to pesticides used in bulb crops: a microcosm study. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1479-1498.
- Van Wijngaarden, R.P.A., Brock, T.C.M., Van Den Brink, P.J., Gylstra, R., Maund, S.J., 2006. Ecological effects of spring and late summer applications of lambda-cyhalothrin microcosms. *Arch. Environ. Toxicol.* 5, 220-239.
- Vandame, R., Belzunces, L.P., 1998. Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation. *Neurosciences Letters* 251, 57-60.
- Veerasingham, M., Crane, M., 1992. Impact of farm waste on freshwater invertebrate abundance and the feeding rate of *Gammarus pulex* L.. *Chemosphere* 25, 869-874.
- Verneaux, J., 1973. Cours d'eau de Franche-Comté – Recherches écologiques sur le réseau hydrographique du Doubs – Essai de biotypologie. Thèse, N°Ordre 84, Université de Franche-Comté, 257 p.
- Verneaux, J., 1980. Fondements biologiques et écologiques de l'étude de la qualité des eaux continentales – Principales méthodes biologiques. Dans Pesson, P. *et al.*, 1980. La pollution des eaux continentales – Incidences sur les biocénoses aquatiques, Editions Bordas, Paris, 345 p.
- Vialaton, D., Pilichowski, J.F., Baglio, D., Paya-Perez, A., Larsen, B., Richard, C., 2001. Phototransformation of propiconazole in aqueous media. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5377-5382.
- Wallace, J.B., Lughart, G.J., Cuffney, T.T., Schurr, G.A., 1989. The impact of repeated insecticidal treatments on drift and benthos of a headwater stream. *Hydrobiologia* 179, 135-147.
- Walton Jr., O.E., 1980. Active entry of stream benthic macroinvertebrates into the water column. *Hydrobiologia* 74, 129-139.

- Ward, P.I., 1985. The breeding behaviour of *Gammarus duebeni*. *Hydrobiologia* 121, 45-50.
- Ward, P.I., 1986. A comparative field study of the breeding behaviour of a stream and pond population of *Gammarus pulex* (Amphipoda). *Oikos* 46, 29-36.
- Welton, J.S., 1979. Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream. *Freshwater Biol.* 9, 263-275.
- Welton, J.S., Clarke, R.T., 1980. Laboratory studies on the reproduction and growth of the amphipod *Gammarus pulex* L.. *J. Anim. Ecol.* 49, 581-592.
- White, G.B., 1999. Mise au point sur la toxicité des pyréthrinoïdes. Congrès de l'EAPCCT 22 – 25 juin 1999 – Dublin (Irlande).
- WHO (World Health Organization), 1989. Deltamethrin – Health and safety guide. World Health Organization, Geneva, 32 p.
- WHO (World Health Organization), 1990. International Program on Chemical Safety – Environmental Health Criteria 97 - Deltamethrin. World Health Organization, Geneva, 133 p.
- Wijnhoven, S.M.C., Van Riel, M.C., Van Der Velde, G., 2003. Exotic and indigenous freshwater gammarid species : physiological tolerance to water temperature in relation to ionic content of the water. *Aquat. Ecol.* 37, 151-158.
- Williams, D.D., Williams, N.E., 1993. The upstream/downstream movement paradox of lotic invertebrates: Quantitative evidence from a Welsh mountain stream. *Freshwater Biol.* 30, 199-218.
- Winkelman, C., Petzoldt, T., Koop, J.H.E., Matthaei, C.D., Benndorf J., 2008. Benthivorous fish reduce stream invertebrate drift in a large-scale field experiment. *Aquat. Ecol.*, in press.
- Wogram, J., Liess, M., 2001. Rank ordering of macroinvertebrate species sensitivity to toxic compounds by comparison with that of *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 360-367.
- Wu, A., Li, L., Liu, Y., 2003. Deltamethrin induces apoptotic cell death in cultured cerebral cortical neurons. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 187, 50-57.
- Xiu, R., Xu, Y., Gao, S., 1989. Toxicity of the new pyrethroid insecticide, deltamethrin, to *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* 188/189, 411-413.
- Yasin, M., Baugh, P. J., Hancock, P., Bonwick, G. A., Davies, D. H., Armitage, R., 1995. Synthetic pyrethroid insecticides analysis by gas chromatography/mass spectrometry operated in negative-ion chemical ionization mode in soil, moss and fish tissue. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 9, 1411-1417.
- Yang, W., Gan, J., Hunter, W., Spurlock, F., 2006a. Effect of suspended solids on bioavailability of pyrethroid insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1585-1591.
- Yang, W., Spurlock, F., Liu, W., Gan, J., 2006b. Inhibition of aquatic toxicity of pyrethroid insecticides by suspended sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1913-1919.
- Zhang, L.Z., Khan, S.U., Akhtar, M.H., Ivarson, K.C., 1984. Persistence, degradation, and distribution of deltamethrin in an organic soil under laboratory conditions. *J. Agric. Food Chem.* 32, 1207-1211.
- Zhao, Y., Newman, M.C., 2006. Effects of exposure duration and recovery time during pulsed exposures. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1298-1304.
- Zhou, J.L., Rowland, S.J., Mantoura, R.F.C., 1995a. Partition of synthetic pyrethroid insecticides between dissolved and particulate phases. *Wat. Res.* 29, 1023-1031.

- Zhou, J.L., Rowland, S.J., Mantoura, R.F.C., Harland, B.J., 1995b. Influence of the nature of particulate organic matter on the sorption of cypermethrin : implications on Koc correlations. *Environ. Int.* 21, 187-195.
- Zhou, J.L., Rowland, S.J., 1997. Evaluation of the interactions between hydrophobic organic pollutants and suspended particles in estuarine waters. 31, 1708-1718.
- Zhou, J.L., Rowland, S.J., Mantoura, R.F.C., Lane, M.C.G., 1997. Desorption of tefluthrin insecticide from soil in simulated rainfall runoff systems-kinetic studies and modelling. *Wat. Res.* 31, 75-84.
- Zhu, H., Selim, H.M., 2002a. Retention and mobility of deltamethrin in soils: 1. Adsorption-desorption. *Soil Science* 167, pp. 513-523.
- Zhu, H., Selim, H.M., 2002b. Retention and mobility of deltamethrin in soils: 2. Transport. *Soil Sci.* 167, 580-589.
- Zivic, I., Markovic, Z., 2007. Distribution of the species *Gammarus balcanicus* and *Gammarus fossarum* on the territory of Serbia (central part of the Balkan peninsula). *Crustaceana* 80, 67-76.
- Zwart, D., Posthuma, L., 2005. Complex mixture toxicity for single and multiple species: proposed methodologies. *Environ. Toxicol. Chem* 24, 2665-2676.

Sites Internet cités :

- AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 2007). Base de données écotoxicologiques Agritox. France. <http://www.dive.afssa.fr/agritox/index.php>
- Ministère de l'agriculture (2007). Le catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages des matières fertilisantes et des supports de culture homologués en France. <http://e-phy.agriculture.gouv.fr>
- Regtox (2007). Macro Excel[®] pour dose-réponse, source libre. <http://eric.vindimian.9online.fr/>
- US EPA (United States Environmental Protection Agency, 2007). Aquire Database.Electronic database; Washington DC, Etats-Unis. <http://www.epa.gov/ecotox>