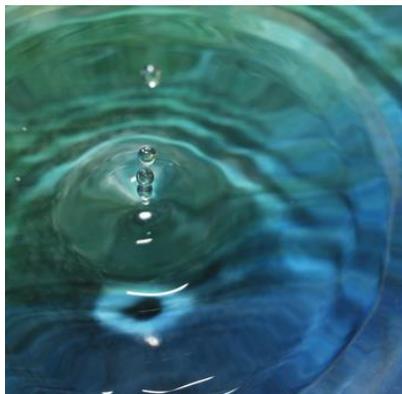


vigiCell

santé & environnement



IUT La Courtaisière,
18 boulevard Gaston Defferre
85035 La Roche sur Yon

vigicell@vigicell.fr
<http://www.vigicell.fr>



AGENCE DE L'EAU
ADOUR-GARONNE

ÉTABLISSEMENT PUBLIC DE L'ÉTAT

Rapport d'étude
Version diffusable

Évaluation de la qualité de l'eau de 15 stations du bassin Adour-Garonne par un panel de bio-essais

24 juin 2014

Commanditaire : Jean-Pierre REBILLARD, Chef du Service "Connaissance et Valorisation" de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne

Responsable de l'étude : Laurent PAULIC, Chargé de Développement

Référence du contrat client : PE-AEAG-11VE12c

Référence du rapport : RE-AEAG-11VE12h

Document non confidentiel

Copyright VigiCell

SOMMAIRE

<u>1</u>	<u>CONTEXTE, OBJECTIFS ET PROGRAMME DE L'ETUDE</u>	<u>3</u>
1.1	CONTEXTE	3
1.2	OBJECTIFS	3
1.3	PROGRAMME	3
<u>2</u>	<u>L'EVALUATION DE LA QUALITE DE L'EAU PAR DES BIO-ESSAIS</u>	<u>4</u>
2.1	STRATEGIE GENERALE	4
2.2	PRINCIPE D'UN BIO-ESSAI EN LABORATOIRE ET CHOIX DE VIGICELL	5
2.3	PRINCIPE GENERAL D'UNE EXPERIENCE	6
2.4	LES QUATRE PANELS DE BIO-ESSAIS DE VIGIWATER™	7
2.5	INTERPRETATION DES RESULTATS	8
2.6	PRESENTATION DES RESULTATS VIGIWATER™	9
2.7	COMPARAISON DES RESULTATS	10
<u>3</u>	<u>PROTOCOLE DE L'ETUDE</u>	<u>12</u>
3.1	PRINCIPE GENERAL DE L'ETUDE	12
3.2	PRELEVEMENTS ET CONDITIONNEMENT DES ECHANTILLONS	12
3.3	ENVOI DES ECHANTILLONS	13
3.4	TRAITEMENT DES ECHANTILLONS	13
3.5	BIO-ESSAIS	13
3.6	ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES	13
3.7	ETAT ECOLOGIQUE	13
3.8	ÉTUDE EN SIMPLE AVEUGLE	13
<u>4</u>	<u>RESULTATS</u>	<u>14</u>
4.1	ECHANTILLONS ETUDIES	14
4.2	VALIDATION DES OPERATIONS DU PROGRAMME	15
4.3	TRAITEMENT DES DONNEES	16
4.4	LA JORDANNE (AMONT ET AVAL)	16
4.5	LE LOT (AMONT /AVAL DU RIOU MORT) ET LE RIOU MORT	20
4.6	LA GARONNE (AMONT ET AVAL DE TOULOUSE)	25
4.7	LE LUZOU / LE RETJON / LA MIDOUZE	29
4.8	LES EAUX CLAIRES (AMONT / AVAL)	36
4.9	LA LEGERE - POUFFONDS	39
<u>5</u>	<u>CONCLUSION GENERALE</u>	<u>42</u>
5.1	PERTINENCE DES BIO-ESSAIS	42
5.2	INTERET PRATIQUE DES BIO-ESSAIS	42
5.3	COMPLEMENTARITE DES BIO-ESSAIS AVEC LES AUTRES APPROCHES	42
5.4	APPRECIATION DES BIO-ESSAIS	43
<u>6</u>	<u>PERSPECTIVES</u>	<u>43</u>

1 Contexte, objectifs et programme de l'étude

1.1 Contexte

Cette étude a été réalisée à la demande de Jean-Pierre Rebillard, Chef du Service "Connaissance et Valorisation" de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne,

En 2012, l'Agence a travaillé à acquérir, dans le cadre de son marché «réseau eaux superficielles», des données concernant les substances prioritaires et non prioritaires sur plus de 400 stations à des fréquences différentes selon la matrice échantillonnée (12/an sur eau et 1/an sur les sédiments). Ces données serviront à établir l'état chimique des masses d'eau au sens de la DCE.

Ces masses d'eau font par ailleurs l'objet d'autres évaluations pour établir leur état écologique, notamment par la réalisation d'indices biologiques. Il est cependant à noter que ces données sont parcellaires (indice biologique diatomées) et datent de 2007. Ces données sont disponibles sur le site Internet de l'Agence.

En complément à ces deux approches, l'Agence a souhaité tester des outils d'évaluation du potentiel toxique sur un nombre limité de stations, choisies sur la base des connaissances déjà acquises et des objectifs de l'Agence.

L'Agence et VigiCell ont ainsi collaboré dans le cadre d'un programme d'étude et de recherche, afin de mettre en œuvre le panel de bio-essais VIGIWATER™ au sein des actions menées par l'Agence. L'évaluation de la qualité de l'eau par des bio-essais et la stratégie expérimentale de VigiCell sont présentées de manière détaillée ci-après (cf. chap. 2, page 6).

À terme, si les outils sont jugés pertinents vis-à-vis des objectifs de l'Agence, ils pourront venir compléter ses outils de surveillance et permettront une meilleure connaissance et une meilleure gestion des milieux naturels.

1.2 Objectifs

Cette étude consiste à mettre en œuvre un panel de bio-essais sur les eaux de surface provenant de différentes masses d'eau du bassin Adour-Garonne, afin :

1. d'apprécier la pertinence des outils proposés (sensibilité, reproductibilité, etc.),
2. de disposer des premières données de ce type sur des sites déjà connus pour leurs caractéristiques (états chimiques et écologiques) et voir en quelles mesures elles permettent de mieux appréhender leur état,
3. de définir si cette approche doit être renouvelée puis étendue aux autres sites du bassin comme moyen d'évaluation et/ou de surveillance à part entière.

1.3 Programme

Des prélèvements ponctuels d'eau de surface ont été réalisés sur 15 sites répartis sur l'ensemble du bassin, durant 4 semaines consécutives afin de combiner un monitoring spatial et temporel de la qualité des eaux.

L'état des milieux naturels a ainsi été évalué au travers de trois types d'informations :

1. Analyses chimiques (150 paramètres – DCE, sur prélèvements),
2. Potentiel toxique par un panel de bio-essais (sur prélèvements),
3. États chimique et écologique (données historiques).

Ces 15 sites sont répartis sur 6 zones du bassin :

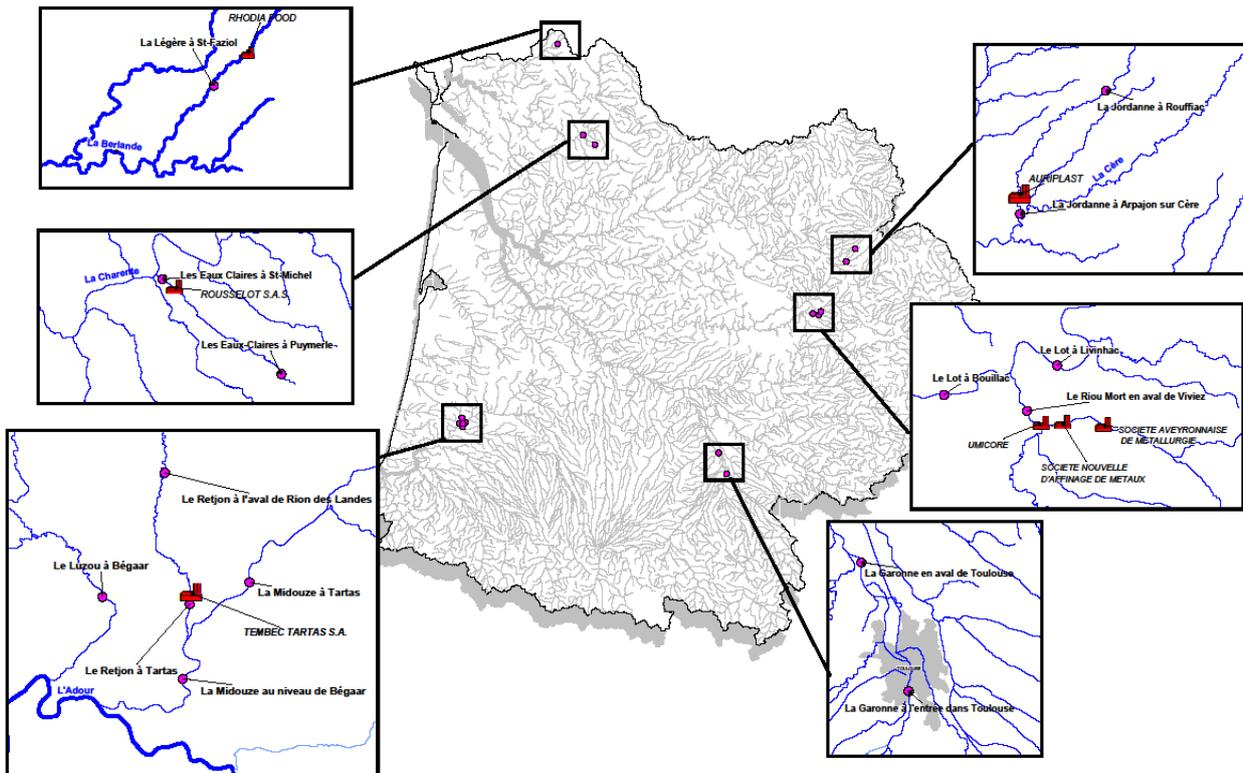


Figure 1 : Carte générale et détail des points d'échantillonnage

2 L'évaluation de la qualité de l'eau par des bio-essais

2.1 Stratégie générale

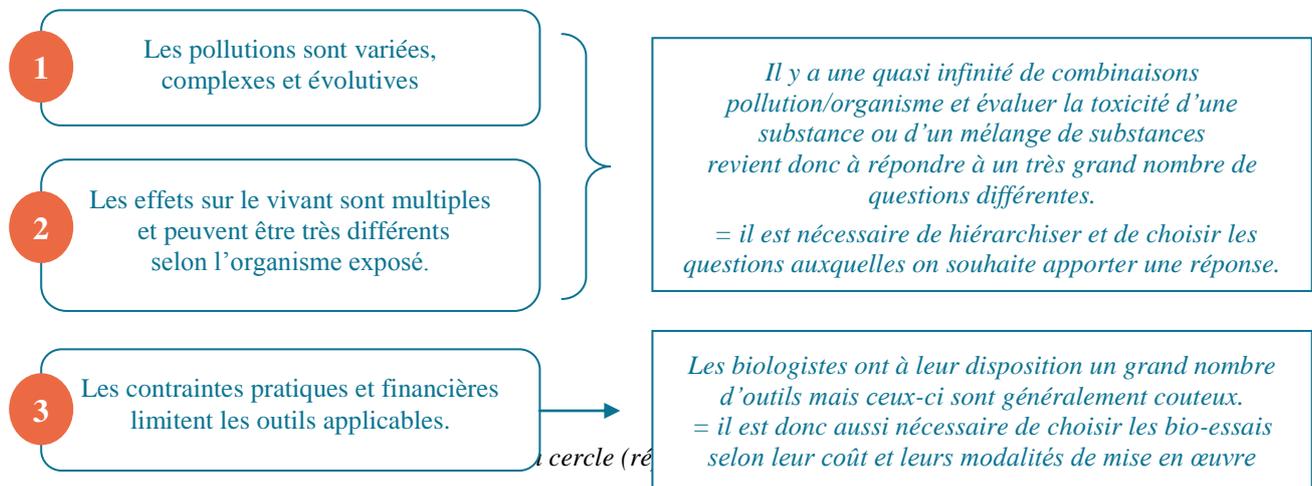
L'évaluation de la qualité d'une eau (rejets, milieux naturels, ressources et eau potable) par des analyses physico-chimiques est insuffisante, car :

- ✓ seules les substances sélectionnées sont identifiées et quantifiées (: on ne mesure que ce que l'on cherche),
- ✓ les effets biologiques des substances identifiées sont mal connus : seules des données de toxicité ou d'écotoxicité aiguë sont généralement disponibles,
- ✓ même si ces données existent, il n'est pas possible de prévoir les effets biologiques du mélange de substances présentes,
- ✓ les analyses physico-chimiques ne permettent pas d'apprécier la biodisponibilité des substances.

Les analyses physico-chimiques restent donc indispensables, car elles seules permettent de déterminer précisément la présence de substances recherchées, mais sont insuffisantes pour évaluer la qualité d'une eau, car elles n'en donnent qu'une vision parcellaire. Il est donc nécessaire de compléter cette approche par des observations réalisées sur des organismes vivants (ex. : observation des espèces du milieu naturel ou sur des organismes modèles, dans le cadre de bio-essais). L'intérêt de cette approche est qu'elle est intégrative (le vivant réagit à l'ensemble de son environnement) et qu'elle indique directement l'effet biologique final (prenant donc en compte la

notion d'effet cocktail et de biodisponibilité). Par contre, si elle peut dans certains cas donner des indications sur la typologie des substances ayant pu induire ces effets, elle ne permet pas de les déterminer et de les quantifier.

L'évaluation de la qualité de l'eau par des bio-essais permet de réaliser un grand nombre d'observations dans des conditions standardisées et mais présente cependant des défis particuliers car elle combine trois difficultés majeures :



Pour répondre à ce difficile cahier des charges, la stratégie proposée par VigiCell est, en résumé, basée sur les principes suivants :

- ✓ **Perturber le moins possible l'échantillon** (ex. : peu ou pas de pré-traitement de l'échantillon, délai le plus court possible entre prélèvement et test, etc.), pour limiter au maximum les différences entre l'eau prélevée et l'eau testée,
- ✓ Mettre en œuvre un **ensemble de bio-essais complémentaires**, répondant chacun à une question précise, en lien avec les effets actuellement les plus recherchés dans le cas de la pollution de l'eau.
- ✓ Mettre en œuvre des tests simples, afin de limiter les coûts de l'évaluation et être ainsi en mesure non seulement de les rendre accessibles au secteur de l'eau, mais de plus de les utiliser régulièrement, ce qui paraît indispensable compte tenu des variations importantes potentielles (ex. : activité humaines, cycles naturels, etc.).

Il est important de noter que l'approche expérimentale proposée par VigiCell vise à réaliser des **diagnostics simples et rapides de la qualité d'une eau**, pour répondre à des besoins opérationnels. Cette approche est complémentaire aux analyses physico-chimiques, aux tests d'écotoxicologie réglementaires et aux observations de terrain.

2.2 Principe d'un bio-essai en laboratoire et choix de VigiCell

Un bio-essai en laboratoire consiste à mettre en contact, dans des conditions standardisées, l'échantillon d'eau prélevé avec une population d'organismes vivants (ex. : algues, champignons) ou une culture de cellules (ex. : cellules humaines) puis à observer les modifications de leurs fonctions biologiques, au niveau global (ex. : croissance, respiration, niveau des réserves énergétiques, etc.) ou particulier (ex. : interaction avec un récepteur hormonal, atteinte à la membrane, atteinte mitochondriale, blocage du système photosynthétique, etc.).

L'efficacité du vivant, utilisé comme « détecteur de toxicité », est cependant très variable, car dépendante du type d'organisme choisi et des conditions dans lesquelles il est mis en œuvre (ex. : protocole de culture, conditions physiologiques). Ainsi, c'est en fonction de la question à laquelle le bio-essai doit répondre que seront choisis les organismes et les protocoles expérimentaux qui lui seront associés (dont notamment les conditions de culture, les temps d'exposition, les

techniques d'observations, etc.). **Pour augmenter la qualité de la réponse à chaque question posée, VigiCell a choisi la stratégie « une question = un outil ».**

Compte tenu du nombre de questions posées, cela revient à réaliser un nombre équivalent de bio-essais, qui seront mis en œuvre en même temps, le jour de la réception des échantillons. Ce qui constitue une contrainte pratique importante. En effet, culture et conditionnement des organismes vivants sont différents et peuvent parfois nécessiter un travail préparatoire étalé sur une semaine, afin de disposer le jour J du nombre de cellules suffisantes ou pour mettre les organismes dans un état physiologique défini pour le bio-essai. Lors d'une expérience, les bio-essais sont lancés plusieurs jours avant le jour de réception des échantillons. Afin de bénéficier d'une efficacité optimale des bio-essais, ces échantillons doivent donc arriver à la date prévue.

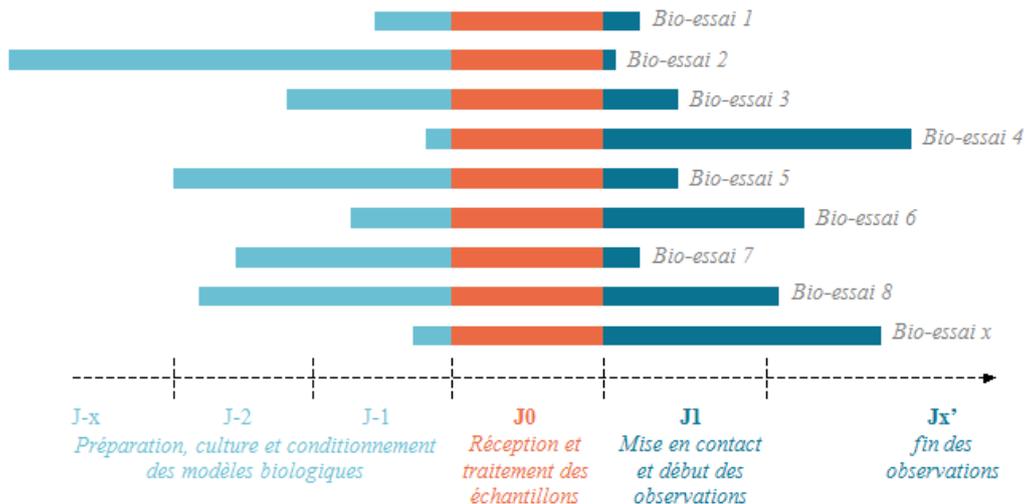


Figure 3 : illustration schématique d'un plan de travail pour la réalisation d'un panel de bio-essais : tous les protocoles sont calés sur le jour de réception des échantillons, qu'il ne faut donc pas rater.

2.3 Principe général d'une expérience

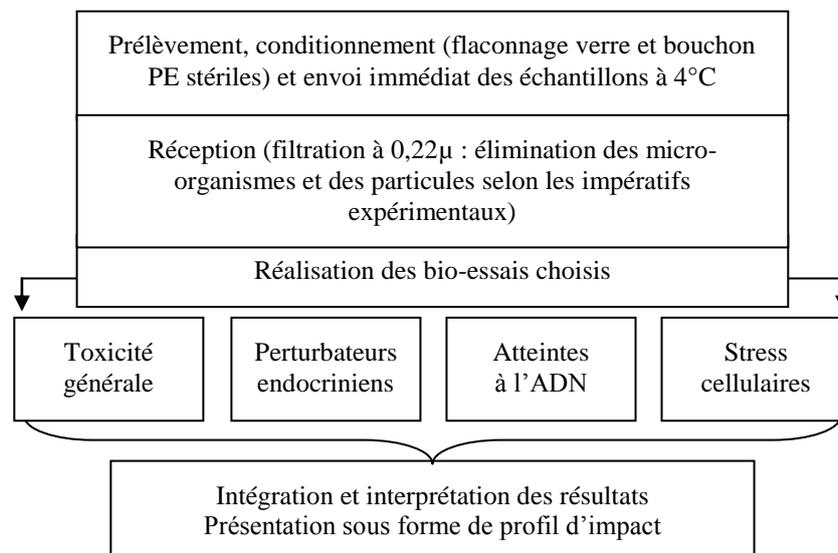


Figure 4 : Principe général d'une expérience

Il est à noter que les échantillons sont filtrés à 0,22µ pour éliminer les micro-organismes et des particules. Les bio-essais n'évaluent donc que la fraction dissoute des polluants.

2.4 Les quatre panels de bio-essais de VIGIWATER™

VIGIWATER™ est structurée par quatre panels de bio-essais, constitué eux-mêmes par plusieurs tests permettant de produire un faisceau d'information correspondant au type d'impact concerné. Une présentation synthétique de ces panels est donnée ci-après et une présentation détaillée, incluant leurs références scientifiques, est donnée en annexe (cf. chap. **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, page **Erreur ! Signet non défini.**).

2.4.1 Panel « toxicité générale »

Ces tests consistent à suivre la croissance d'organismes (bactéries, champignons, algues) et le niveau énergétique de cellules de nature différentes, présentant donc une diversité de mécanismes cellulaires, cibles potentielles des substances. C'est en quelque sorte une combinaison de détecteurs sensibles à des polluants différents, afin d'avoir le spectre de détection le plus large possible. Les organismes et cellules ont de plus été choisis en fonction de leur réactivité et leur sensibilité vis-à-vis des principaux polluants de l'eau, lorsque cela est possible.

Le paramètre observé est un effet final : la croissance ou le niveau énergétique, afin d'avoir une détection la plus globale possible des effets biologiques. Ces bio-essais n'indiquent pas l'origine de la toxicité, ce qui est recherché avec les autres panels « atteinte à l'ADN » et « perturbateurs endocriniens » et « stress cellulaires ».

Toxicité générale sur panel d'organismes		
Modèles biologiques	Effets observés (technique)	Nombre de tests
Bactéries (2 souches <i>Escherichia coli</i>)	Croissance (DO)	2
Algue (1 souche <i>Chlamydomonas rhenartii</i>)	Croissance (DO)	1
Cryptogames eucaryotes (1 Oomycète et 1 Ascomycète)	Croissance (DO)	2
Cellules humaines (2 lignées avec / sans métabolisation)	Niveau énergétique (ATPmétrie)	2
Nombre total d'informations		7

Figure 5 : Bio-essais du panel « toxicité générale »

2.4.2 Panel « perturbateurs endocriniens »

Ces tests consistent à suivre, sur des cellules humaines équipées de gène rapporteur, les interactions des substances avec les récepteurs hormonaux œstrogéniques, androgéniques et thyroïdiens. Ces interactions sont évaluées de deux manières :

- Suivi de l'activation du récepteur directement par les substances présentes dans l'eau (cas des substances mimétiques, effet agoniste),
- Suivi des perturbations du bon fonctionnement récepteur, activé par une hormone connue préalablement rajouté dans l'eau à tester (effet antagoniste).

Perturbateurs endocriniens (suivi des effets agonistes et antagonistes)		
Modèles biologiques	Effets observés (technique)	Nombre de tests
Lignée cellulaire humaine modifiée (récepteur œstrogène)	Interaction avec le récepteur (luminescence)	2
Lignée cellulaire humaine modifiée (récepteur androgène)	Interaction avec le récepteur (luminescence)	2
Lignée cellulaire humaine modifiée (récepteur thyroïdien)	Interaction avec le récepteur (luminescence)	2
Nombre total d'informations		6

Figure 6 : Bio-essais du panel « Perturbateurs endocriniens »

2.4.3 Panel « atteintes à l'ADN »

Ces tests consistent à suivre les systèmes de surveillance et de réparation de l'ADN. La sollicitation de ces systèmes indiquent une atteinte à l'ADN (: génotoxicité).

Les cellules et organismes utilisées sont représentatifs des deux modes d'organisation de l'ADN : procaryote (sans noyau, ex. : bactéries) et eucaryotes (avec noyau, ex. : cellules humaines) afin de disposer d'une diversité de situation cellulaires.

Par ailleurs, UmuC, un biotest standard historique du domaine, impliquant des bactéries, à été mis en œuvre afin de disposer d'une référence.

De plus, deux types de cellules humaines sont utilisés : l'un est équipé d'un important système de métabolisation, l'autre non. Ceci permet de mettre également en évidence les effets génotoxiques des métabolites, car il a été observé que la dégradation par le vivant de substances non génotoxiques pouvaient générer des sous-produits génotoxiques.

Génotoxicité (atteintes à l'ADN)		
Modèles biologiques	Effets observés (technique)	Nombre de tests
Lignées cellulaires humaines (2 lignées cellulaires : avec / sans métabolisation)	phosphorylation de l'histone H2AX (fluorescence)	2
Bactérie (<i>Salmonella typhimurium</i>)	Induction du gène UmuC (luminescence)	1
Bactérie (<i>Escherichia coli</i> modifiée)	Induction du gène RecA (luminescence)	1
Nombre total d'informations		4

Figure 7 : Bio-essais du panel « Génotoxicité (atteintes à l'ADN)»

2.4.4 Panel « stress cellulaires »

Ce panel de test vise à suivre les effets des substances sur certaines fonctions cellulaires générales (stress oxydant, atteintes à la membrane, stress général, ...) ainsi que certaines cibles des polluants de l'eau fréquents (herbicides, HAP, etc.).

Indicateurs de stress cellulaires		
Modèles biologiques	Effets observés (technique)	Nombre de tests
Bactérie (<i>Escherichia coli</i> modifiées - gène rapporteur)	Stress oxydant (2) ; Stress général (2) ; réaction aux Métaux ; atteintes à la membrane (luminescence)	6
Bactérie (2 souches <i>Escherichia coli</i>)	Décalage de croissance détoxification (DO)	1
Algue (1 souche <i>Chlamydomonas rhenartii</i>)	Photosynthèse (fluorescence)	1
Lignée cellulaire humaine modifiée : réactions aux hydrocarbures aromatiques (HAP, dioxines, ...)	Interaction avec le récepteur Ahr (luminescence)	1
Nombre total d'informations		9

Figure 8 : Bio-essais du panel « Indicateurs de stress cellulaires »

2.5 Interprétation des résultats

En plus des échantillons d'eau testés, chaque bio-essai comprend des contrôles internes :

- ✓ une « référence » (ex. : eau pure, qui indiquera le niveau jugé normal de la fonction biologique suivie) et
- ✓ un « contrôle positif » (: une substance connue pour déclencher l'effet biologique observé, avec une dose choisie pour induire une forte réaction).

Ces deux données permettent d'une part de s'assurer que le bio-essai a fonctionné correctement et d'autre part de situer la réponse induite par les échantillons d'eau à tester.

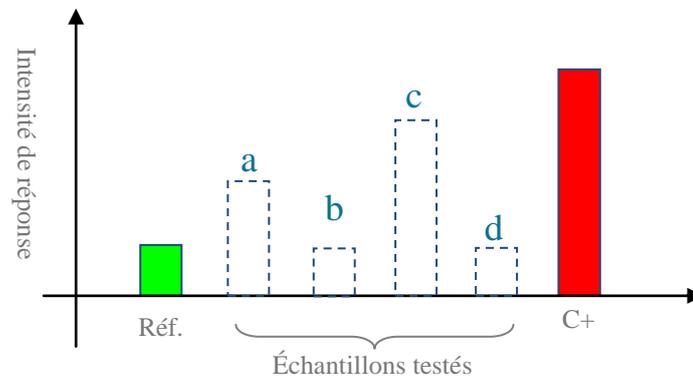


Figure 9 : représentation schématique de résultat d'un bio-essai (Réf. : eau référence ; a à d : échantillons d'eau testés ; C+ : contrôle positif). Dans cet exemple, les échantillons b et d seront considérés comme n'engendrant pas l'effet biologique observé, alors que les échantillons a et c seront considérés comme biologiquement actifs (avec $c > a$).

2.6 Présentation des résultats VIGIWATER™

La réalisation des quatre panels de bio-essais permet de recueillir 24 informations, dessinant ainsi un **profil d'impact** assez complet et ciblé sur les principales questions liées aux pollutions de l'eau.

Afin de faciliter la lecture des nombreux résultats générés et de permettre des comparaisons faciles entre échantillons (ex. : amont vs. aval ; entrée vs. sortie de procédé ; évolution dans le temps ; ...), le profil d'impact de chaque échantillon testé peut être présenté sous trois formes complémentaires :

1. **résultats élaborés (%)** : chaque résultat brut est exprimé en pourcentage relatif à la référence et au contrôle positif, intégrés dans chaque expérience ;
2. **présentation visuelle détaillée** : les résultats sont présentés en code couleur et en indice de réponse, allant de 0 : aucun effet observé (= comparable à l'eau référence) à 4 : effet très important (= comparable au contrôle positif du test) dans le cas d'une réduction de l'indicateur et de 0 à 3 dans le cas d'une augmentation de l'indicateur.

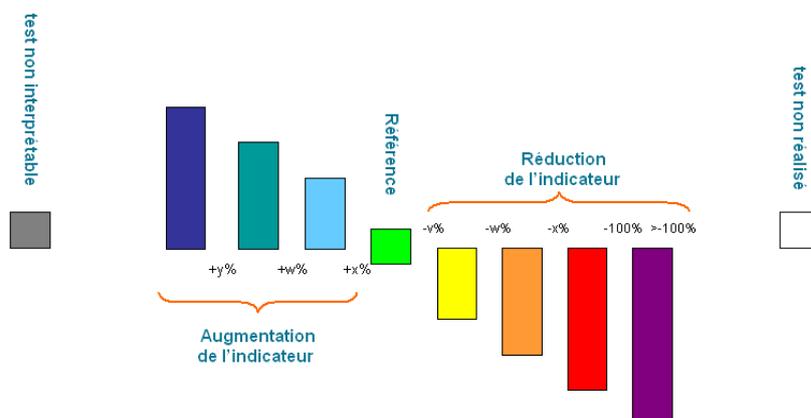


Figure 10 : principe de présentation visuelle des résultats

Toxicité générale	Diminution de la croissance	Bactéries	0 à 15 %	15 à 30 %	30 à 100 %	
		Algues	0 à 30 %	30 à 60 %	60 à 100 %	
		Champignons	0 à 30 %	30 à 60 %	60 à 100 %	
	Augmentation de la croissance	Tout type cellulaire	15 à 30 %	30 à 60 %	Au delà de 60 %	
	Cytotoxicité	Cellules humaines	0 à 30 %	30 à 60 %	60 à 100 %	
Génotoxicité	Génotoxicité	Bactéries	0 à 15 %	15 à 30 %	30 à 100 %	Cytotoxicité
		Cellules humaines	0 à 20 %	20 à 40 %	40 à 100 %	Cytotoxicité
Perturbateurs endocriniens	Interaction avec les récepteurs	Cellules humaines	0 à 20 %	20 à 60 %	60 à 100 %	Cytotoxicité
Stress cellulaires	Photosynthèse	Algues	0 à 5 %	5 à 10 %	10 à 100 %	Cytotoxicité
	Aryl récepteur	Cellules humaines	0 à 15 %	15 à 30 %	30 à 100 %	Cytotoxicité
	Stress oxydant	Bactéries	0 à 15 %	15 à 30 %	30 à 100 %	Cytotoxicité
	Membrane	Bactéries	0 à 15 %	15 à 30 %	30 à 100 %	Cytotoxicité
	Stress général	Bactéries	0 à 15 %	15 à 30 %	30 à 100 %	Cytotoxicité
	Viabilité	Bactéries	0 à 15 %	15 à 30 %	30 à 100 %	Cytotoxicité

Figure 11 : seuils de coupure selon les tests

3. **présentation visuelle intégrée**, en attribuant une appréciation globale pour chaque panel de test du profil, pour simplifier les présentations, lorsque le nombre de données devient trop important.

Les résultats de chaque échantillon peuvent donc être présentés sous la forme suivante :

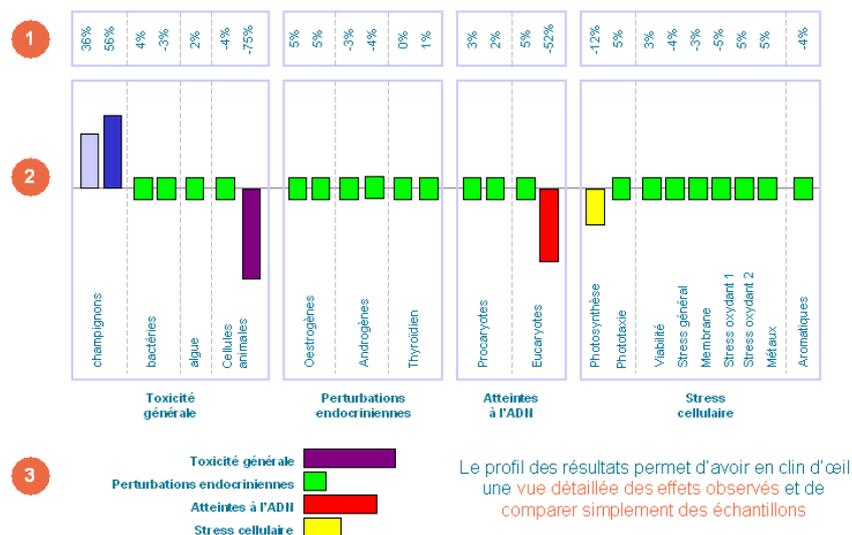


Figure 12 : exemple (fictif) de présentation de résultats d'un profil d'impact complet (présentant les trois niveaux d'information : résultats élaborés (1), présentations visuelles détaillée (2) et intégrée (3).

2.7 Comparaison des résultats

La présentation visuelle, détaillée ou intégrée, des résultats permet d'établir des comparaisons rapides entre plusieurs échantillons (ex. : entrée/sortie de procédé) ou encore sous forme de cartographie :

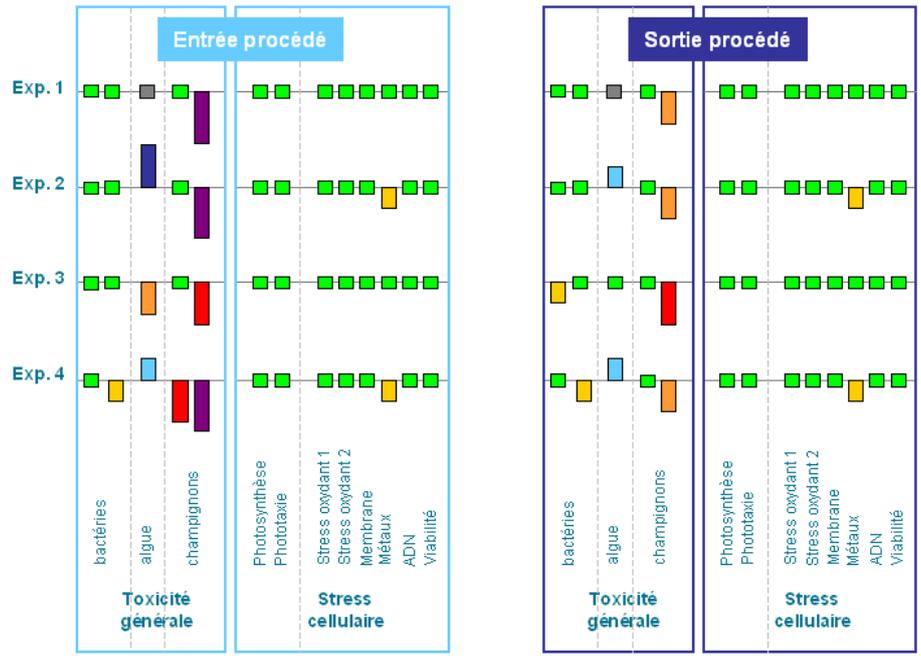


Figure 13 : exemple (fictif) de comparaisons de résultats avec présentation de résultats visuels détaillés

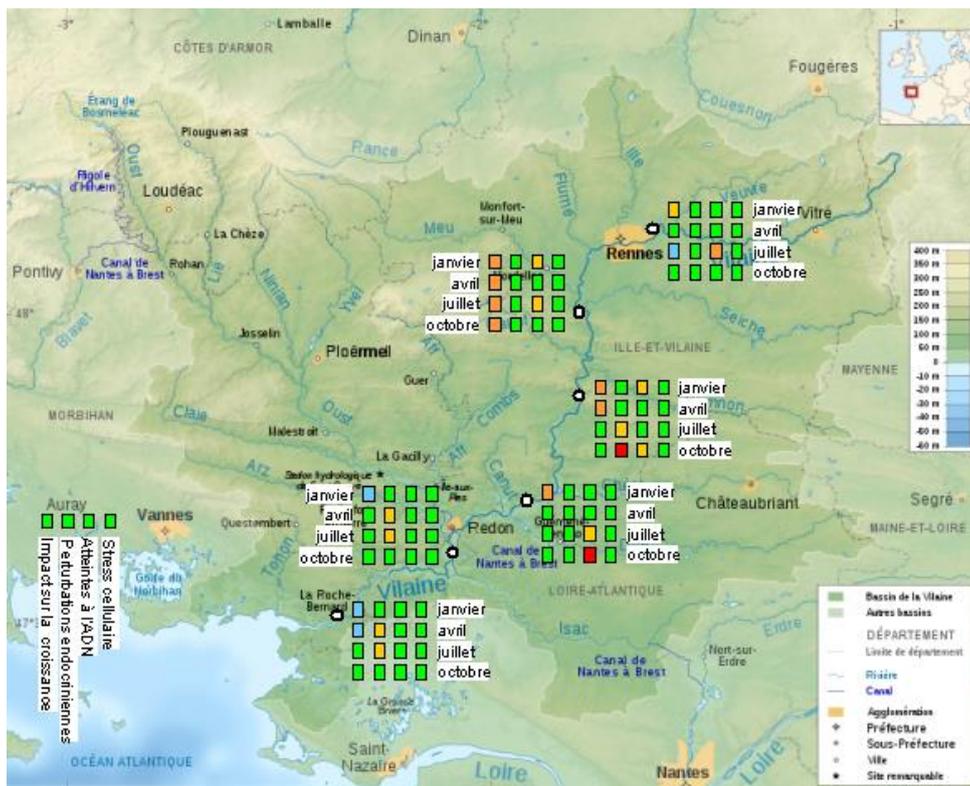


Figure 14 : exemple (fictif) de présentation des résultats visuels intégrés sous forme de cartographie

3 Protocole de l'étude

3.1 Principe général de l'étude

Les eaux de surface ont été prélevées de manière hebdomadaire, durant 4 semaines.

Chaque échantillon a été étudié par :

1. des **analyses physico-chimiques**, comme source d'information mais aussi comme validation des conditions nécessaire à la mise en oeuvre des outils biologiques,
2. les **panels de bio-essais** suivants :

Panel de tests	Modèle biologique	Effet biologique	n
Toxicité Générale	Bactéries	<i>Croissance</i>	2
	Algue	<i>Croissance</i>	1
	Champignons	<i>Croissance</i>	2
	Cellules eucaryotes humaines	<i>Réserve énergétique (ATP)</i>	2
Perturbateurs endocriniens	Cellules humaines avec gène rapporteur (effets agoniste et antagoniste sur récepteurs nucléaires hormonaux)	<i>Œstrogène</i>	2
		<i>Androgène</i>	2
		<i>Thyroïdien</i>	2
Génotoxicité	Bactérie avec gène rapporteur	<i>Atteintes à l'ADN</i>	1
	Bactérie	<i>Atteintes à l'ADN</i>	1
	Cellules humaines (avec et sans métabolisation)	<i>Atteintes à l'ADN</i>	2
Indicateurs de stress cellulaire	Bactéries avec gène rapporteur	<i>Stress général 1</i>	1
		<i>Stress général 2</i>	1
		<i>Stress oxydant 1</i>	1
		<i>Stress oxydant 2</i>	1
		<i>Stress membranaire</i>	1
	Cellules humaines avec gène rapporteur (récepteur AhR)	<i>substances aromatiques : dioxine, HAP, ...</i>	1
	Algues	<i>Photosynthèse</i>	1
		Total	24

Figure 15 : Présentation des panels de bio-essais réalisés dans le cadre de cette étude

3.2 Prélèvements et conditionnement des échantillons

Le choix des sites, les prélèvements et le conditionnement des échantillons ont été pris en charge par l'Agence.

Après prélèvement, les échantillons ont été immédiatement conditionnés en bouteille en verre (bouchon PE, verre brun ou blanc, stériles), placés à +4°C puis emmenés (transport à +4°C) sous 24h au laboratoire.

3.3 Envoi des échantillons

Chaque échantillon a été envoyé :

- d'une part au laboratoire Toxalim (INRA Toulouse), pour la réalisation du bio-essai H2AX (génotoxicité sur cellules humaines),
- et d'autre part au laboratoire de VigiCell, pour tout les autres bio-essais.

3.4 Traitement des échantillons

À réception, les échantillons ont été filtrés à 0,8 puis à 0,22 μ pour éliminer les micro-organismes et des particules. Les bio-essais n'évaluent donc que la fraction dissoute des polluants.

Chaque échantillon filtré a été utilisé pour fabriquer les milieux de culture nécessaires aux bio-essais, selon les modalités adaptées à chaque bio-essai. Les volumes d'échantillon éventuellement restant ont été conservés à -20°C , comme échantillon de secours en cas de problème durant les bio-essais ou pour être en mesure de renouveler une expérience (bio-essais ou analyse physico-chimiques). Ces échantillons congelés sont conservés un mois après la fin de l'étude.

Des contrôles internes servant à la validation et à l'interprétation des résultats sont fabriqués pour chaque bio-essais en utilisant les mêmes procédures, d'une part avec de l'eau ultra-pure (référence eau) et d'autre part avec des substances induisant l'effet attendu pour chaque bio-essai (contrôle positif) avec une dose choisie pour induire une forte réaction (cf. chap. Figure 8 : , page 8).

Ces différents milieux de culture (échantillons et contrôles) sont ensuite mis en contact avec les organismes et cellules des bio-essais mis en œuvre.

3.5 Bio-essais

Une présentation détaillée des bio-essais est donnée en annexe paragraphe 7.

3.6 Analyses physico-chimiques

Dans le cadre de cette étude, les analyses physico-chimiques ont été prises en charge par l'Agence. VigiCell a de son coté réalisé une mesure de pH à réception des échantillons et noté les observations visuelles sur l'état des échantillons.

3.7 Etat écologique

Les données des états écologiques sont issus directement de la base de donnée en ligne de l'Agence. (cf. : <http://adour-garonne.eaufrance.fr/index.php?option=accesData&task=recherche&theme=STQ>).

Il est important de noter que ces données datent de 2007 et ne sont pas toutes les mêmes (indice poisson, diatomées, etc.) selon les sites, y compris sur la même zone (ex. : amont / aval).

3.8 Étude en simple aveugle

Les données chimiques et les informations sur la nature des sites nous ont été communiquées après le dépouillement des résultats des bio-essais. Nos premiers commentaires ont été présentés lors de la réunion du 06 novembre 2012, à l'Agence.

4 Résultats

4.1 Echantillons étudiés

Numéro Flacons				Code Hydrographique	Fleuve	Commune
Sem. 36	Sem. 37	Sem. 38	Sem. 39			
1	21	31	46	05224000	la Midouze	Bégaar (40)
2	20	32	48	05225100	la Midouze	Tartas (40)
3	29	33	58	05224100	le Retjons	Tartas (40)
4	19	34	59	05093300	Le Lot	Bouillac (12)
5	30	35	60	05163290	La Garonne	Entrée de Toulouse (31), Pont Empalot
6	23	36	54	05015300	Les Eaux Claires	Saint Michel (16)
7	28	37	53	05223210	Le Luzou	Bégaar (40)
8	16	38	55	05093550	Le Riou Mort	En aval de Viviez (12)
9	27	39	57	05015320	Les Eaux Claires	Torsac (16)
10	17	40	47	05161000	La Garonne	En aval de Toulouse, Gagnac sur Garonne (31)
11	22	42	49	05005610	La Legère	Saint Faziol, à Pouffonds (79)
12	18	43	51	05065000	La Jordanne	Rouffiac, à Saint Simon (15)
13	26	44	50	05064120	La Jordanne	Pont du Bousquet, Arpajon sur Cère (19)
14	25	45	52	05225000	le Retjons	Carcen-Ponson (40), en aval de Rion des Landes
15	24	41	56	05094810	Le Lot	Livinhac, Decazeville (12)

Figure 16 : Table de correspondance des n° des échantillons.

Les caractéristiques les échantillons étudiés ont été les suivants :

Prélèvement	Lot 1 Semaine 36	Lot 2 Semaine 37	Lot 3 Semaine 38	Lot 4 Semaine 39
Livraison	04/09/12	11/09/12	18/09/12	25/09/12
Conditionnement de livraison	Verre brun +4°C	Verre blanc +4°C	Verre blanc +4°C	Verre blanc +4°C
Filtration à 0,22µm sur GV PVDF	oui	oui	oui	oui

Figure 17 : liste des lots réceptionnés, conditions de traitement.

Code Hydrographique	Fleuve	Commune		Semaine 36	Semaine 37	Semaine 38	Semaine 39
05224000	la Midouze	Bégaar (40)	pH	6,7	6,4	6,7	6,7
			aspect	Hétérogène Jaune	Jaune Dépôt	mi-opaque mousse	Jaune clair; Dépôt
05225100	la Midouze	Tartas (40)	pH	6,7	6,7	6,4	6,7
			aspect	Hétérogène légèrement opaque	Jaune clair, Dépôt léger	Transparent morceaux	Translucide
05224100	le Rejçons	Tartas (40)	pH	6,4	6,4	6,4	6,4
			aspect	Hétérogène Jaune foncé	Jaune sombre; Dépôt	Brun morceaux	Brun, Dépôt
05093300	Le Lot	Bouillac (12)	pH	6,7	6,4	6,4	6,4
			aspect	Homogène	Translucide	Hétérogène	Translucide
05163290	La Garonne	Entrée de Toulouse (31), Pont Empalot	pH	6,7	6,7	6,7	6,4
			aspect	Hétérogène	Translucide	Hétérogène	Translucide Dépôt
05015300	Les Eaux Claires	Saint Michel (16)	pH	7,3	7	7,2	7,3
			aspect	Hétérogène, morceaux noirs	Translucide	Sable morceaux	Translucide
05223210	Le Luzou	Bégaar (40)	pH	6,4	6,4	6,4	7,3
			aspect	Homogène	Translucide	Hétérogène	Translucide
05093550	Le Riou Mort	En aval de Viviez (12)	pH	7,3	7	7	6,7
			aspect	Hétérogène	Translucide	Hétérogène	Translucide
05015320	Les Eaux Claires	Torsac (16)	pH	7,3	7	7	7,3
			aspect	Hétérogène	Translucide Dépôt léger noir marron	Hétérogène	Translucide
05161000	La Garonne	En aval de Toulouse, Gagnac sur Garonne (31)	pH	6,7	6,7	6,4	6,7
			aspect	Hétérogène	Translucide	Hétérogène	Translucide
05005610	La Légère	Saint Faziol, à Pouffonds (79)	pH	7,5	7,8	6,4	7,6
			aspect	Hétérogène Jaune clair	Translucide	Jaune Morceaux	Vert; Dépôt
05065000	La Jordanne	Rouffiac, à Saint Simon (15)	pH	6,4	6,7	6,5	6,4
			aspect	Hétérogène	Translucide, Dépôt léger	Hétérogène	Marron clair, Dépôt
05064120	La Jordanne	Pont du Bousquet, Arpajon sur Cère (19)	pH	6,7	6,7	6,4	6,4
			aspect	Homogène	Translucide	Jaune	Translucide
05225000	le Rejçons	Carcen-Ponson (40), en aval de Rion des Land	pH	6,4	6,4	6,4	6,4
			aspect	Hétérogène	Translucide	Hétérogène	Translucide
05094810	Le Lot	Livinhac, Decazeville (12)	pH	6,7	6,4	6,4	6,4
			aspect	Hétérogène	Translucide	opaque morceaux	Translucide

Figure 18 : liste des échantillons étudiés, pH et observations visuelles

Remarques :

- certains pH sont légèrement en dehors des zones optimales de pH d'un des bio-essais (croissance cellulaire des bactéries NR : $6,2 < \text{pH optimal} < 7,2$). Ceci ne remet pas en cause les résultats obtenus, mais réduit les performances (détection, discrimination) de ce bio-essai. Les échantillons concernés sont les suivants : Jordanne Rouffiac (semaine 1), Légère Saint Faziol (semaines 1, 2 et 4), Eaux Claires Torsac et Saint Michel (semaines 1 et 4), Riou Mort (semaine 1), Luzou Bégaar (semaine 4).
- il a globalement été noté une qualité visuelle différente lorsque de la quatrième semaine de prélèvement. Ceci est probablement dû à ces conditions météorologiques différentes durant cette semaine.

4.2 Validation des opérations du programme

Les observations concernant les différentes opérations du programme sont les suivantes :

- ✓ **Logistique** : les échantillons ont été réceptionnés sans casse, au jour dit et à la température attendue.
- ✓ **Échantillons** : un échantillon du lot 2 (la Garonne Pont Empalot) a été reçu vide au laboratoire Toxalim. Un échantillon de secours congelé provenant de celui reçu par VigiCell a été utilisé en remplacement. Ceci a généré un décalage d'une semaine entre le prélèvement et la réalisation du bio-essai atteinte à l'ADN sur cellules humaines.
- ✓ **Traitement à réception** : comme prévu, tous les échantillons ont été filtrés à $0,22 \mu\text{m}$ et des échantillons de secours ont été conservés à -20°C .
- ✓ **Réalisation des bio-essais** : sur les 24 bio-essais prévus, nous avons rencontré des problèmes dans deux cas :
 - Le bio-essai perturbateur endocrinien de type androgène n'a pu être réalisé sur le modèle biologique initialement prévu du fait d'un problème lié directement au modèle cellulaire (notre partenaire INSERM a les mêmes problèmes et met en place un nouveau modèle cellulaire). Une alternative à ce modèle cellulaire, en cours d'évaluation, a été mise en place sur les échantillons du lot 4.

2. Le modèle Ahr est temporairement non cultivable et non disponible chez notre partenaire Inserm.
- ✓ **Validation des bio-essais réalisés :**
1. Les travaux réalisés montrent que les protocoles sont adaptés aux échantillons d'eaux de surface prélevées. Aucun phénomène (ex. : cristallisation, observée dans d'autres études) empêchant la réalisation des tests n'a été observé.
 2. Les références et contrôles positifs des bio-essais sont corrects et les résultats expérimentaux sont donc validés.
 3. Les résultats de cette étude ainsi que ceux issus d'autres travaux (sur milieux naturels ou non) nous laissent à penser que les bio-essais réalisés sur champignons montrent une réaction généralement surestimée. Ces bio-essais restent reproductibles et discriminants (ils permettent de différencier des échantillons), mais nous émettons l'hypothèse d'une sensibilité aux caractéristiques physico-chimique de l'eau. Nous travaillons actuellement sur le sujet, en testant différentes conditions, notamment selon la minéralisation de l'eau, et allons inclure d'autres types de champignons pour mieux définir le domaine d'utilisation de ces deux bio-essais.

4.3 Traitement des données

4.3.1 Analyses chimiques

Un nombre très important de résultats chimiques a été produit lors de l'étude (150 substances * 60 échantillons = 9000 données). Il s'avère que, tous échantillons confondus, seules douze substances ont été détectées à des concentrations supérieures aux limites de quantification. Afin d'alléger la présentation des résultats seules ces douze substances sont présentées ci-après.

NB : seuls les résultats des semaines 36 à 38 sont à ce jour disponibles.

4.3.2 Bio-essais

Les résultats des bio-essais sont présentés selon le mode visuel détaillé (cf. chap. 2.6, page 9).

4.4 La Jordanne (amont et aval)

4.4.1 Géographie et localisation des prélèvements



Figure 19 : Situation géographique des prélèvements

La Jordanne est un affluent du Cère, principal affluent de la Dordogne. Elle fournit l'essentiel de l'eau potable du bassin d'Aurillac. Entre les points amont ((Rouffiac) et aval (Arpajon sur Cère) se situent entre autres la ville d'Aurillac et l'industriel AURIPLAST (plasturgie).

4.4.2 Analyses chimiques

03-sept	La Jordanne (am)	La Jordanne (av)
DéséthylAtrazine (MET)	0.020	0.020
Chloroforme (°) (THM)	0.2	0.2
Bore dissous	10	20
Antimoine Dissous	0.1	0.2
Cobalt Dissous	0.2	0.2
Plomb Dissous	1	1
Zinc dissous	10	8
Vanadium Dissous	1.0	1.5
Nickel Dissous	1	2
Cadmium Dissous	0.05	0.05
Phtalate Di (2-Ethyl Hexyl)	0.25	0.25
Nonylphenols (SANDRE 1957)	0.10	0.10
10-sept	La Jordanne (am)	La Jordanne (av)
DéséthylAtrazine (MET)	0.020	0.020
Chloroforme (°) (THM)	0.2	0.2
Bore dissous	10	60
Antimoine Dissous	0.1	0.2
Cobalt Dissous	0.2	0.2
Plomb Dissous	1	1
Zinc dissous	4	9
Vanadium Dissous	1.0	1.5
Nickel Dissous	1	3
Cadmium Dissous	0.05	0.05
Baryum Dissous	20	40
Phtalate Di (2-Ethyl Hexyl)	0.25	0.410
17-sept	La Jordanne (am)	La Jordanne (av)
DéséthylAtrazine (MET)	0.020	0.020
Chloroforme (°) (THM)	0.2	0.2
Bore dissous	10	60
Antimoine Dissous	0.1	0.2
Zinc dissous	4	5
Vanadium Dissous	0.9	1.4
Nickel Dissous	1	2
Cadmium Dissous	0.05	0.05
Baryum Dissous	20	30
4-ter-octylphenol (SANDRE 1959)	0.020	0.020
Thallium Dissous	0.1	0.1

Figure 20 : Résultats des analyses chimiques (µg/L)

Hormis le Bore et le Baryum, aucune substance n'est décelée et il n'y a aucune différence entre amont et aval.

4.4.3 Etat écologique



Figure 21 : Données écologiques 2007- La Jordanne (amont)



Figure 22 : Données écologiques 2007- La Jordanne (aval)

La présence d'ammonium et de nitrites, ainsi que l'indice biologique diatomées montrent une dégradation notable de la qualité de l'eau entre amont et aval de la Jordanne.

4.4.4 Bio-essais

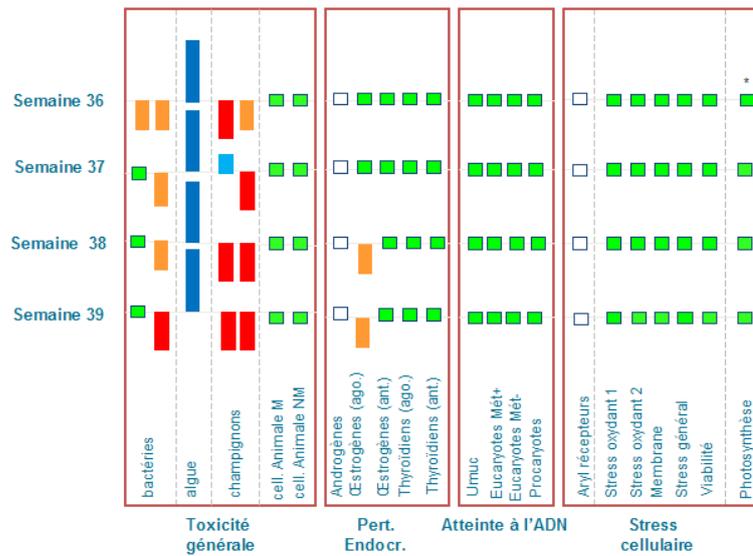


Figure 23 : bio-essais - La Jordanne – Rouffiac (St Simon) amont (* : résultat à la limite du seuil de coupure)

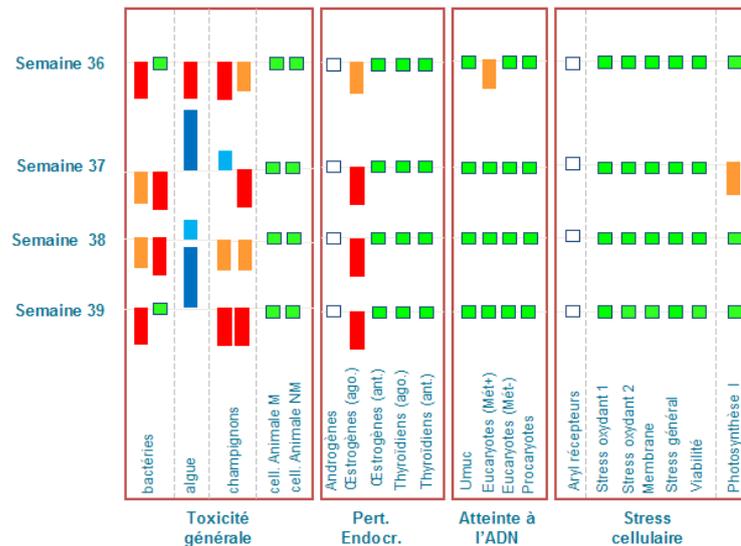


Figure 24 : bio-essais - La Jordanne – Arpajon s/ Cère (aval)

Remarques :

- Les profils d'un même site sont globalement comparables d'une semaine à l'autre, même si les intensités de certaines réponses peuvent varier. Seul le bio-essai sur algue (croissance) montre des variations notables (retournement d'effet) d'une semaine à l'autre, dans le cas du site aval.
- On observe en amont une très forte stimulation de la croissance des cellules algales, possiblement imputable à la présence de nutriments. En aval, cet effet n'est pas toujours conservé, ce qui pourrait indiquer la présence d'une toxicité contrecarrant les effets des nutriments (qui n'ont probablement pas disparu entre amont et aval).
- Des effets perturbateurs endocriniens (œstrogène, agoniste) légers en amont et forts en aval,
- Un effet génotoxique léger en aval (sem. 36).

- Blocage du système photosynthétique : des effets légers sont observés en aval et éventuellement en amont (sem. 36)

4.4.5 Conclusion

Globalement, les différents effets cellulaires permettent d'observer une dégradation de la qualité de l'eau, ce qui recoupe les données de l'état écologique (indice diatomées - 2007). Les données chimiques ne donnent pas d'indication.

4.5 Le Lot (amont /aval du Riou mort) et le Riou mort

4.5.1 Géographie et localisation des prélèvements

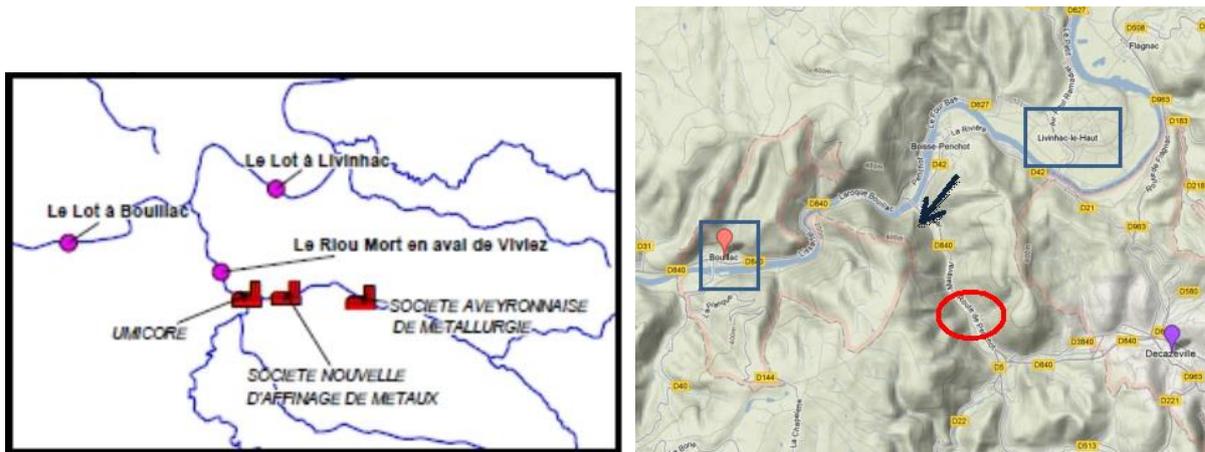


Figure 25 : Situation géographique des prélèvements

Le Lot est un affluent rive droite de la Garonne qui conflue à Aiguillon, en aval de Toulouse.

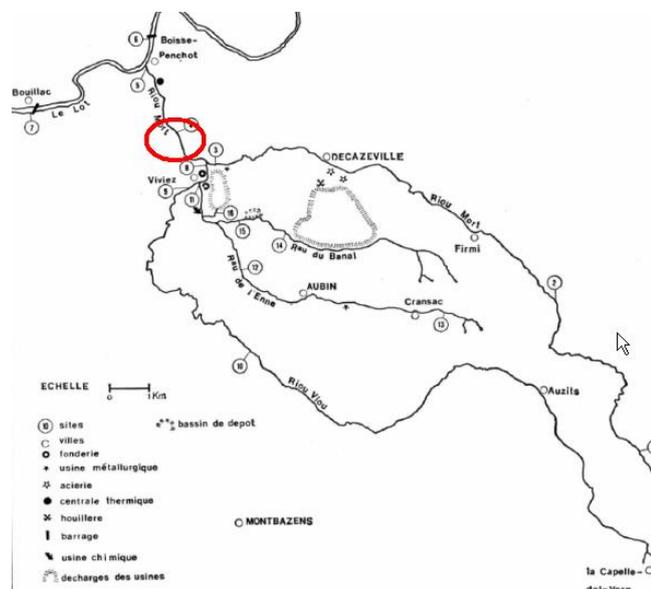


Figure 26 : contexte minier de la région de Decazeville

Le Riou Mort est un affluent du Lot (sous affluent de la Garonne) qui conflue à Viviez. Il traverse la région industrielle de Decazeville (activité minière et de raffinage de minerais de Zinc depuis 1840) et draine les rejets miniers de l'usine de Vieille Montagne. Les eaux du Riou Mort s'y chargent en éléments métalliques, et plus particulièrement en zinc et en Cadmium.

4.5.2 Analyses chimiques

03-sept	Le Lot (am)	Le Riou mort	Le Lot (av)
DéséthylAtrazine (MET)	0.020	0.020	0.020
Chloroforme (*) (THM)	0.2	0.2	0.2
Bore dissous	10	660	10
Antimoine Dissous	0.2	0.8	0.2
Cobalt Dissous	0.2	0.7	0.2
Plomb Dissous	1	2	1
Zinc dissous	8	1892	12
Vanadium Dissous	0.5	0.5	0.5
Nickel Dissous	1	6	1
Cadmium Dissous	0.05	44.40	0.22
Phtalate Di (2-Ethyl Hexyl)	0.25	0.430	0.25
Nonylphenols (SANDRE 1957)	0.10	0.11	0.10
10-sept	Le Lot (am)	Le Riou mort	Le Lot (av)
DéséthylAtrazine (MET)	0.020	0.020	0.020
Chloroforme (*) (THM)	0.2	0.2	0.2
Bore dissous	10	340	10
Antimoine Dissous	0.3	1.1	0.1
Cobalt Dissous	0.2	0.6	0.2
Plomb Dissous	1	2	1
Zinc dissous	10	2137	11
Vanadium Dissous	0.5	0.5	0.5
Nickel Dissous	1	11	1
Cadmium Dissous	0.05	56.00	0.07
Baryum Dissous	20	50	20
Phtalate Di (2-Ethyl Hexyl)	0.260	0.870	0.460
17-sept	Le Lot (am)	Le Riou mort	Le Lot (av)
DéséthylAtrazine (MET)	0.020	0.020	0.020
Chloroforme (*) (THM)	0.2	0.2	0.2
Bore dissous	10	600	20
Antimoine Dissous	0.1	0.8	0.1
Zinc dissous	4	2012	8
Vanadium Dissous	0.5	0.5	0.5
Nickel Dissous	1	12	1
Cadmium Dissous	0.05	45.00	0.08
Baryum Dissous	20	50	10
4-ter-octylphenol (SANDRE 1959)	0.020	0.036	0.020
Thallium Dissous	0.1	0.6	0.1

Figure 27 : Résultats des analyses chimiques ($\mu\text{g/L}$)

Comme le contexte géologique et historique peut le laisser penser, le Riou mort est particulièrement chargé en métaux et notamment en zinc (~2mg/L).

Il est aussi à noter une pollution en Phtalate Di (2-Ethyl Hexyl) (sem. 36 et 37) et en 4-ter-octylphenol (sem. 38).

Par contre, aucune substance n'est observée dans le Lot, en amont ou en aval du Riou mort, ce qui montre l'effet de forte dilution du Lot (environ 200 fois, selon les données du zinc).

4.5.3 Etat écologique



Figure 28 : état écologique 2007 - Le Lot – Livinhac (amont)



Figure 29 : état écologique 2007 - Le Lot – Bouillac (aval)

Selon les données existantes (indices diatomées - 2007), la qualité de l'eau du Lot est bonne et l'état écologique est même meilleur en aval qu'en amont du Riou mort.

La qualité de l'eau du Riou mort est par contre mauvaise, avec notamment un indice diatomée mauvais.



Figure 30 : état écologique 2007- Le Riou Mort

4.5.4 Bio-essais

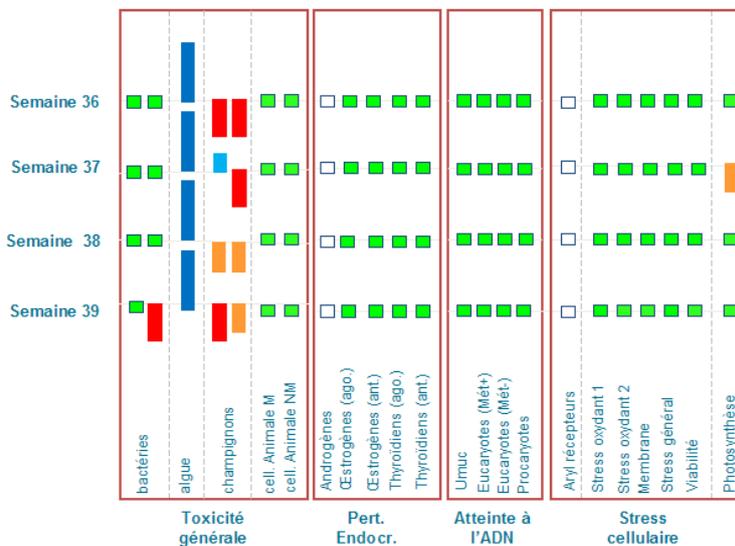


Figure 31 : bio-essais - Le Lot – Livinhac (amont)

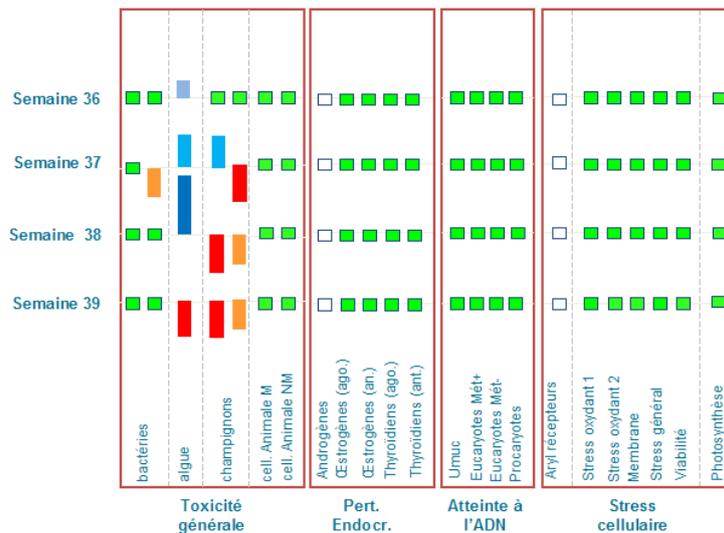


Figure 32 : bio-essais - Le Lot – Bouillac (aval)

Remarques :

- Les profils sont globalement cohérents entre chaque semaine en amont et montrent des variations importantes en aval (algues et champignon).
- On observe en amont une très forte stimulation de la croissance des cellules, ce qui indique la présence de nutriments. En aval, cet effet n'est pas toujours conservé, ce qui pourrait indiquer la présence d'une toxicité contrecarrant les effets des nutriments (qui n'ont probablement pas disparu entre amont et aval).
- L'ensemble des profils indique une qualité de l'eau meilleure en aval.

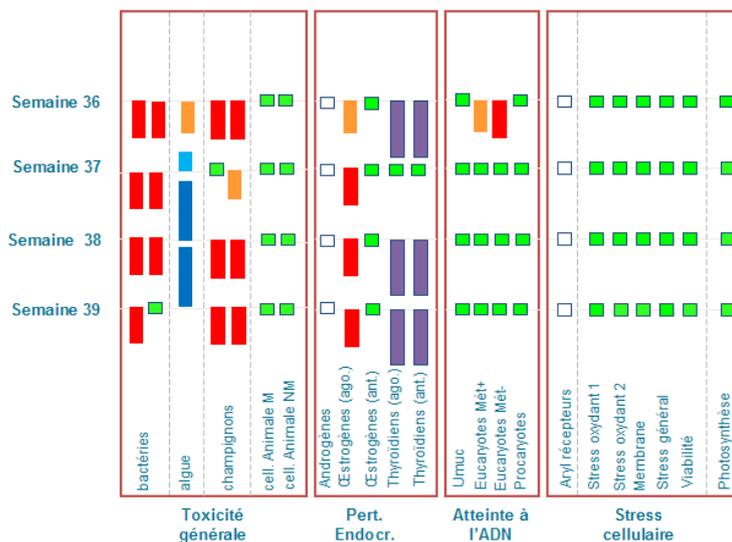


Figure 33 : bio-essais - Le Riou Mort Viviez

Remarques :

- Pour ce qui concerne le Riou mort, les profils sont globalement cohérents entre chaque semaine mais présentent plus de variation : le test sur algue évolue d'une faible toxicité à une importante stimulation ; la semaine 36 se distingue par des effets génotoxiques importants (avec métabolisation faible et forte) et la semaine 37 avec

une absence totale d'effet sur les cellules humaines utilisées pour le bio-essai « perturbateurs endocriniens ».

- La qualité de l'eau se distingue nettement de celle du Lot (amont ou aval) et montre un profil dégradé, avec des réactions fortes sur plusieurs bio-essais et même une toxicité directe sur les cellules humaines empêchant la lecture du bio-essai « perturbateur endocrinien thyroïdien » (hormis en semaine 37).
- Il est à noter des effets importants et réguliers de type perturbateur endocrinien de type œstrogène (effet agoniste).

4.5.5 Conclusion

Globalement, le profil de bio-essais montre une bonne qualité de l'eau dans le Lot (amont comme aval) et une eau de mauvaise qualité dans le Riou mort. Ces résultats recoupent ceux des indices biologiques et des analyses chimiques. Des effets de toxicité directe, de génotoxicité et de perturbation endocrinienne (agoniste œstrogénique) sont observés dans le Riou mort.

4.6 La Garonne (amont et aval de Toulouse)

4.6.1 Géographie et localisation des prélèvements

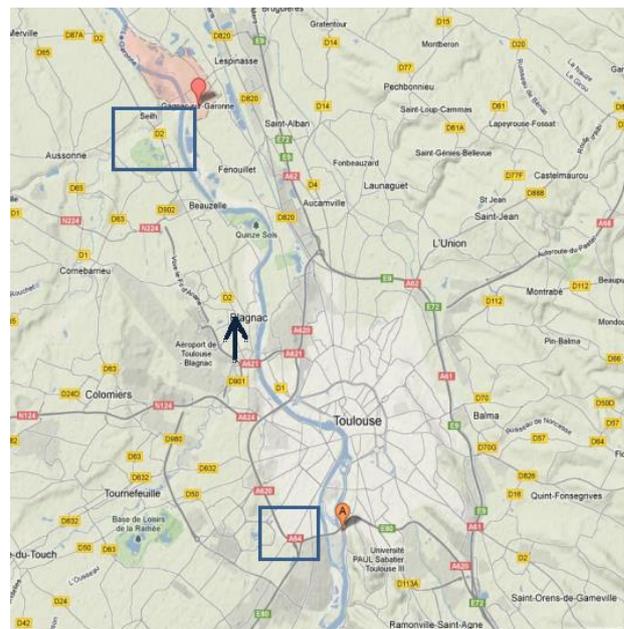
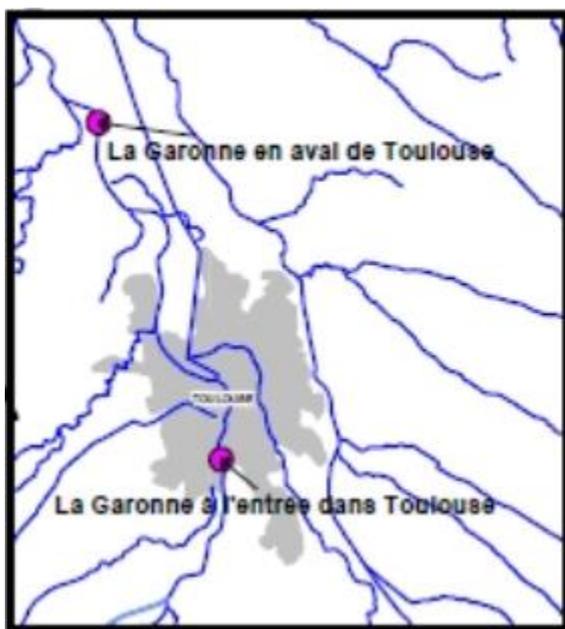


Figure 34 : Situation géographique des prélèvements

Les points de prélèvements sont en amont de Toulouse « Pont Empalot » et en aval « Gagnac sur Garonne ».

4.6.2 Analyses chimiques

03-sept	La Garonne (am)	La Garonne (av)
DéséthylAtrazine (MET)	0.020	0.020
Chloroforme (*) (THM)	0.2	0.2
Bore dissous	10	10
Antimoine Dissous	0.2	0.3
Cobalt Dissous	0.2	0.2
Plomb Dissous	2	1
Zinc dissous	10	9
Vanadium Dissous	0.9	1.0
Nickel Dissous	1	1
Cadmium Dissous	0.05	0.05
Phtalate Di (2-Ethyl Hexyl)	0.25	0.25
Nonylphenols (SANDRE 1957)	0.10	0.10
10-sept	La Garonne (am)	La Garonne (av)
DéséthylAtrazine (MET)	0.020	0.020
Chloroforme (*) (THM)	0.2	0.2
Bore dissous	10	20
Antimoine Dissous	0.2	0.2
Cobalt Dissous	0.2	0.2
Plomb Dissous	1	1
Zinc dissous	4	6
Vanadium Dissous	0.9	0.9
Nickel Dissous	1	1
Cadmium Dissous	0.05	0.05
Baryum Dissous	20	20
Phtalate Di (2-Ethyl Hexyl)	0.25	0.350
17-sept	La Garonne (am)	La Garonne (av)
DéséthylAtrazine (MET)	0.020	0.020
Chloroforme (*) (THM)	0.2	0.2
Bore dissous	10	10
Antimoine Dissous	0.2	0.2
Zinc dissous	4	6
Vanadium Dissous	0.8	0.9
Nickel Dissous	1	1
Cadmium Dissous	0.05	0.05
Baryum Dissous	10	10
4-ter-octylphenol (SANDRE 1959)	0.020	0.020
Thallium Dissous	0.1	0.1

Figure 35 : Résultats des analyses chimiques ($\mu\text{g/L}$)

Aucune substance (sur les 150 mesurées) n'est observée en dessus des seuils de quantification. Il n'y a aucune différence amont/aval.

4.6.3 Etat écologique



Figure 36 : La Garonne amont

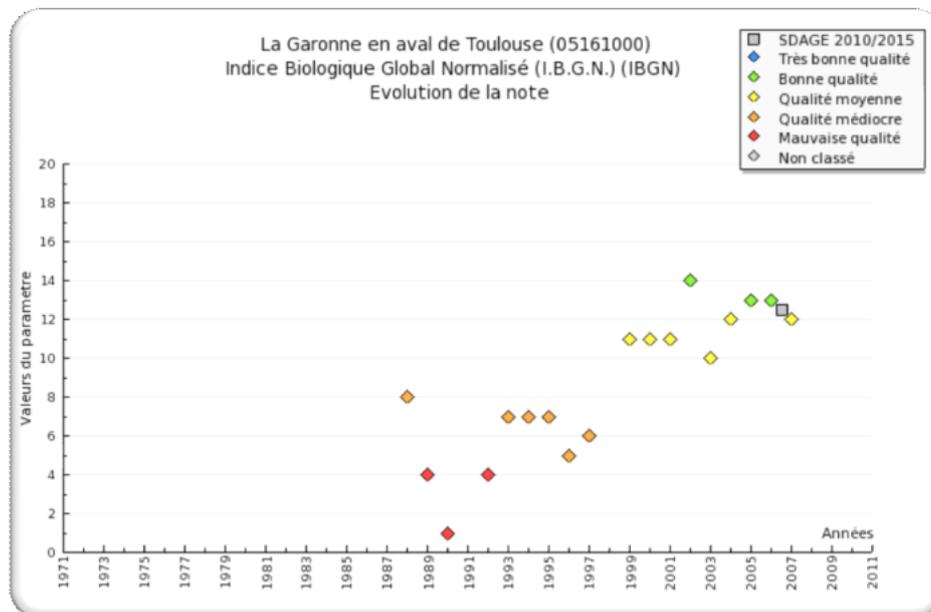


Figure 37 : La Garonne aval

Si historiquement la qualité de l'eau en aval de Toulouse a pu être de mauvaise qualité, les indices biologiques utilisés ne montrent plus de différences entre amont et aval de l'agglomération toulousaine.

4.6.4 Bio-essais

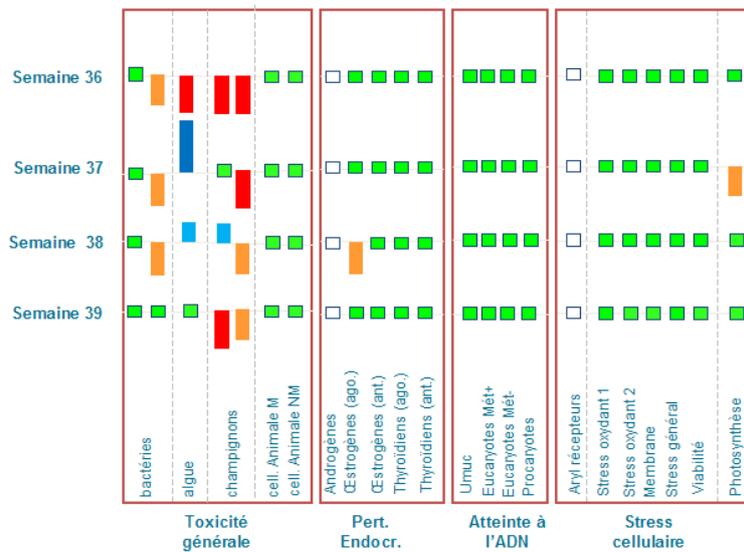


Figure 38 : bio-essais - La Garonne Pont Empalot (amont de Toulouse)

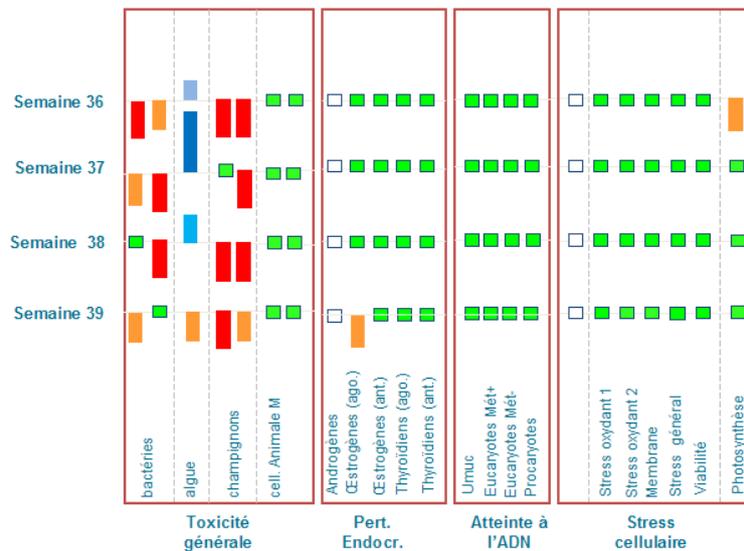


Figure 39 : bio-essais - La Garonne Gagnac (aval de Toulouse)

Remarques :

- Les profils montrent des variations notables entre chaque semaine, notamment en amont de Toulouse (bio-essais sur algue et champignon).
- La comparaison globale amont / aval montre une dégradation de la qualité de l'eau : de manière générale, les intensités des réactions sont plus importantes en aval.
- Des effets spécifiques apparaissent sur quelques échantillons, en amont comme en aval : blocage du système photosynthétique et effet oestrogénique (agoniste), tant en amont qu'en aval. Ces effets restent légers.

4.6.5 Conclusion

Globalement, le profil de bio-essais montre une bonne qualité de l'eau dans en amont et une dégradation légère en aval de l'agglomération toulousaine.

4.7 Le Luzou / Le Retjon / La Midouze

4.7.1 Géographie et localisation des prélèvements



Figure 40 : Situation géographique des prélèvements

Le Luzou est un affluent droit de l'Adour. Depuis 1999, les résultats sont relativement stables. La dégradation de la qualité de l'eau observée est essentiellement liée à la présence en excès de matières organiques et azotées dans le milieu. Les déclassements constatés s'expliquent le plus souvent par des pics en ammonium et en azote Kjeldahl (somme de l'azote organique et de l'azote ammoniacal).

Le Retjons est un affluent droit de la Midouze qui traverse d'amont en aval : Rion des Landes (Source), Carcen-ponson, Tartas, Bégaar (confluence avec la Midouze). La qualité hydrobiologique du Retjons est suivie à Tartas depuis 2007 par le biais de deux indices biologiques (IBGN et IBD) : les notes obtenues sont globalement mauvaises et font état d'un cours d'eau extrêmement perturbé où la vie aquatique est très limitée, à l'image des résultats enregistrés sur le plan physico-chimique. L'usine TEMBEC est une bioraffinerie qui extrait la cellulose contenue dans le pin maritime et fabrique différents produits : épaississants et gélifiants pour l'alimentaire, pelliculage de comprimés pour la pharmacie, fluidité des crèmes pour les cosmétiques, vernis, peintures...

La Midouze est un affluent droit de l'Adour. Les eaux sablonneuses de la Douze et limoneuses du Midou se mêlent au confluent pour former la Midouze.

4.7.2 Analyses chimiques

03-sept	Le Luzou	le Retjon (am)	le Retjon (av)	la Midouze (am)	la Midouze (av)
DéséthylAtrazine (MET)	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020
Chloroforme (*) (THM)	0.2	0.2	2.1	0.2	0.2
Bore dissous	10	40	700	10	80
Antimoine Dissous	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1
Cobalt Dissous	0.3	0.3	0.7	0.3	0.4
Plomb Dissous	1	1	2	1	1
Zinc dissous	19	9	30	4	6
Vanadium Dissous	0.5	1.0	4.5	0.5	1.0
Nickel Dissous	1	1	7	1	1
Cadmium Dissous	0.05	0.05	0.32	0.05	0.05
Phtalate Di (2-Ethyl Hexyl)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Nonylphenols (SANDRE 1957)	0.10	0.14	0.10	0.10	0.10
10-sept	Le Luzou	le Retjon (am)	le Retjon (av)	la Midouze (am)	la Midouze (av)
DéséthylAtrazine (MET)	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020
Chloroforme (*) (THM)	0.2	0.2	1.8	0.2	0.2
Bore dissous	20	50	950	20	110
Antimoine Dissous	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1
Cobalt Dissous	0.3	0.2	0.6	0.3	0.4
Plomb Dissous	1	1	2	1	1
Zinc dissous	14	4	22	4	5
Vanadium Dissous	0.5	0.5	4.5	0.5	0.9
Nickel Dissous	1	1	6	1	1
Cadmium Dissous	0.05	0.05	0.30	0.05	0.05
Baryum Dissous	40	30	50	40	40
Phtalate Di (2-Ethyl Hexyl)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
17-sept	Le Luzou	le Retjon (am)	le Retjon (av)	la Midouze (am)	la Midouze (av)
DéséthylAtrazine (MET)	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020
Chloroforme (*) (THM)	0.2	0.2	1.7	0.2	0.2
Bore dissous	10	50	1040	10	110
Antimoine Dissous	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1
Zinc dissous	15	4	46	15	13
Vanadium Dissous	0.5	0.5	4.6	0.5	0.8
Nickel Dissous	1	1	6	1	1
Cadmium Dissous	0.05	0.05	0.32	0.12	0.06
Baryum Dissous	40	30	40	40	40
4-ter-octylphenol (SANDRE 1959)	0.040	0.020	0.020	0.020	0.064
Thallium Dissous	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

Figure 41 : Résultats des analyses chimiques ($\mu\text{g/L}$)

La forte dégradation du Retjon est notable, mais les substances mesurées sont classiques : métaux, Bore et avec des teneurs faibles.

Hormis le Bore, aucune substance n'est observée dans la Midouze, en aval du Retjon, ce qui montre l'effet de forte dilution (environ 10 fois, selon les données du Bore).

4.7.3 Etat écologique



Figure 42 : Le Luzou – Bégaar

Les eaux du Luzou sont de bonne qualité (IBG très bon), hormis une forte teneur en ammonium et en nitrites, qui conduit à son classement médiocre.



Figure 43 : Le Retjon – Carcen-ponson (amont)

Les eaux du Retjon en amont sont de bonne qualité (IBG très bon), hormis une forte teneur en COD et taux de saturation en oxygène très bas, qui conduit à son classement mauvais.

ECOLOGIE		Mauvais	
Physico-chimie		Mauvais	
		Valeurs retenues *	Evolutions Voir toutes les courbes
Oxygène			
Carbone Organique (COD)	Mauvais	96 mg/l	Voir l'évolution
Demande Biochimique en oxygène en 5 jours (D.B.O.5) (DBO5)	Mauvais	31 mg O2/l	Voir l'évolution
Oxygène dissous (O2 Dissous)	Moyen	4,3 mg O2/l	Voir l'évolution
Taux de saturation en oxygène (Taux saturation O2)	Médiocre	42,7 %	Voir l'évolution
Nutriments			
Ammonium (NH4+)	Mauvais	38 mg/l	Voir l'évolution
Nitrites (NO2-)	Mauvais	3,5 mg/l	Voir l'évolution
Nitrates (NO3-)	Très bon	8,4 mg/l	Voir l'évolution
Phosphore total (Ptot)	Mauvais	5,6 mg/l	Voir l'évolution
Orthophosphates (PO4(3-))	Mauvais	16,6 mg/l	Voir l'évolution
Acidification			
Potentiel min en Hydrogène (pH) (pH min)	Bon	6,35 U pH	Voir l'évolution
Potentiel max en Hydrogène (pH) (pH max)	Très bon	7,2 U pH	Voir l'évolution
Température de l'Eau (T°C)			
	Moyen	24,3 °C	Voir l'évolution
Biologie		Mauvais	
		Notes	
Indice biologique diatomées 2007 (IBD 2007)	Mauvais	3,1 /20	Voir l'évolution

Figure 44 : Le Retjon – Tartas (aval)

Les eaux du Retjon en aval sont de mauvaise qualité, tant du point de vue de la biologie que de la physico-chimie.

ECOLOGIE		Médiocre	
Physico-chimie		Moyen	
		Valeurs retenues *	Evolutions Voir toutes les courbes
Oxygène			
Carbone Organique (COD)	Moyen	7,3 mg/l	Voir l'évolution
Demande Biochimique en oxygène en 5 jours (D.B.O.5) (DBO5)	Très bon	2,7 mg O2/l	Voir l'évolution
Oxygène dissous (O2 Dissous)	Très bon	8 mg O2/l	Voir l'évolution
Taux de saturation en oxygène (Taux saturation O2)	Bon	81,5 %	Voir l'évolution
Nutriments			
Ammonium (NH4+)	Moyen	0,24 mg/l	Voir l'évolution
Nitrites (NO2-)	Bon	0,13 mg/l	Voir l'évolution
Nitrates (NO3-)	Bon	15 mg/l	Voir l'évolution
Phosphore total (Ptot)	Moyen	0,227 mg/l	Voir l'évolution
Orthophosphates (PO4(3-))	Bon	0,184 mg/l	Voir l'évolution
Acidification			
Potentiel min en Hydrogène (pH) (pH min)	Très bon	7,45 U pH	Voir l'évolution
Potentiel max en Hydrogène (pH) (pH max)	Très bon	7,8 U pH	Voir l'évolution
Température de l'Eau (T°C)			
	Très bon	17 °C	Voir l'évolution
Biologie		Médiocre	
		Notes	
Indice biologique diatomées 2007 (IBD 2007)	Médiocre	11,9 /20	Voir l'évolution

Figure 45 : La Midouze - Tartas (amont)

Les eaux de la Midouze en amont sont de qualité médiocre, et c'est l'indice biologique qui provoque cette qualification.

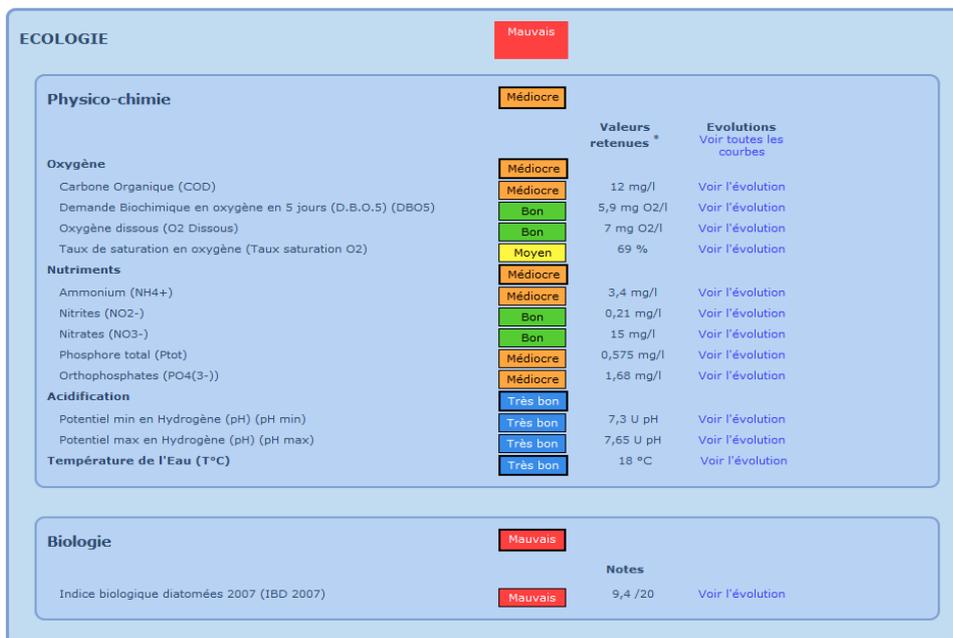


Figure 46 : La Midouze – Bégaar (aval)

Les eaux de la Midouze en aval sont de mauvaise qualité et c'est encore l'indice biologique qui est responsable de cette qualification.

4.7.4 Bio-essais

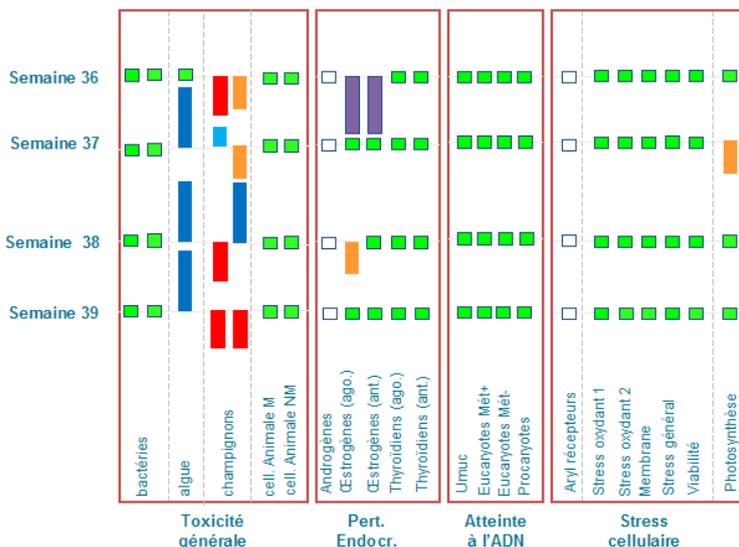


Figure 47 : Le Luzou Bégaar

Remarques :

- Les échantillons du Luzou présentent des profils relativement homogènes, avec peu d'effets, hormis l'échantillon de la semaine 36, qui présente un profil très différent des autres avec une toxicité directe sur les cellules humaines du tests PE de type thyroïdien et une absence de stimulation des algues (: toxicité contrecarrant les effets des nutriments ?).

- D'après les connaissances de l'Agence de ce site, cette différence de l'échantillon 36 pourrait s'expliquer par le fait qu'un site industriel situé en amont du point de prélèvement a pour habitude de stopper sa production durant les vacances. Le profil de ses rejets lors de la première semaine de rentrée (semaine 36) est donc probablement différent du reste du temps.

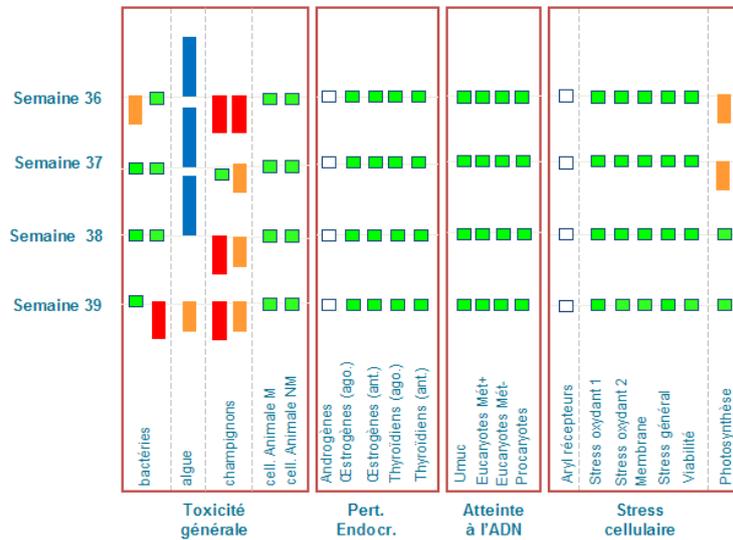


Figure 48 : Le Retjons – Carcen-ponson (amont)

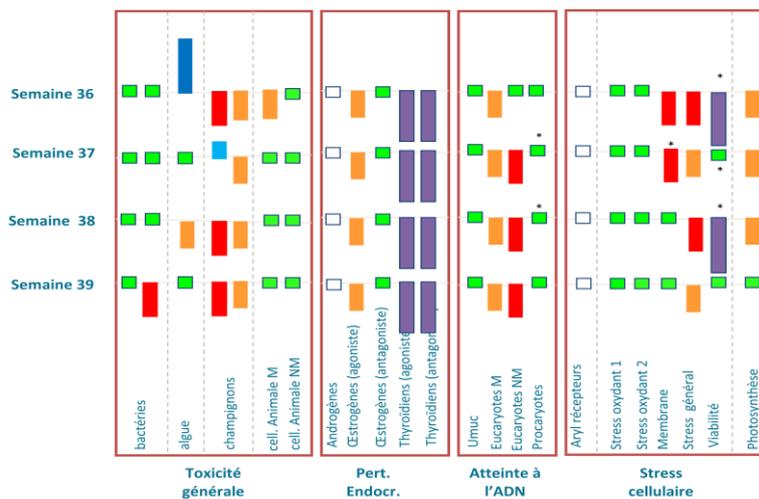


Figure 49 : Le Retjon – Tartas (aval)

Remarques :

- L'eau du Rejton, en amont, n'induit pas de réaction notable, hormis, et de manière légère, des blocages du système photosynthétique (semaine 36 et 37). Les eaux semblent de bonne qualité.
- La dégradation entre amont et aval est flagrante. L'eau en amont génère relativement peu d'effets biologiques alors que celle en amont induit la quasi totalité des bio-essais, avec notamment une toxicité directe sur les cellules humaines du test PE thyroïdien, une génotoxicité forte induite par les échantillons et des stress cellulaires très importants et de différents types, affectant les algues (blocages de la photosynthèse) et les bactéries (atteintes à la membrane, stress général et viabilité).

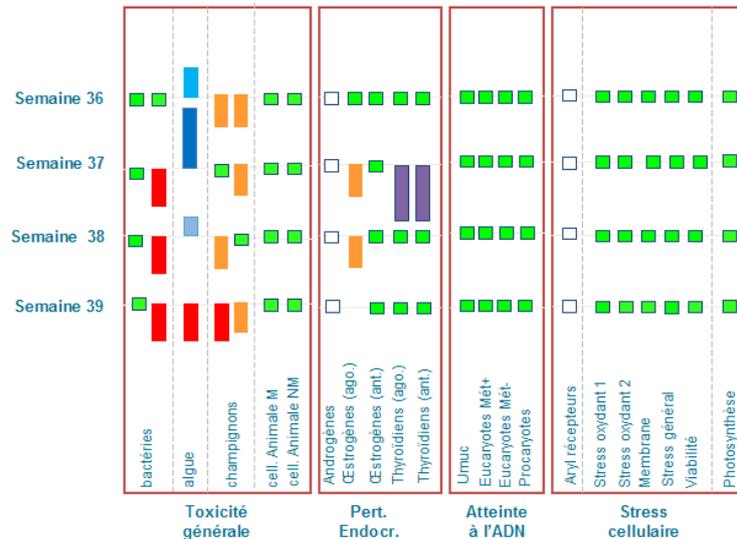


Figure 50 : La Midouze - Tartas (amont)

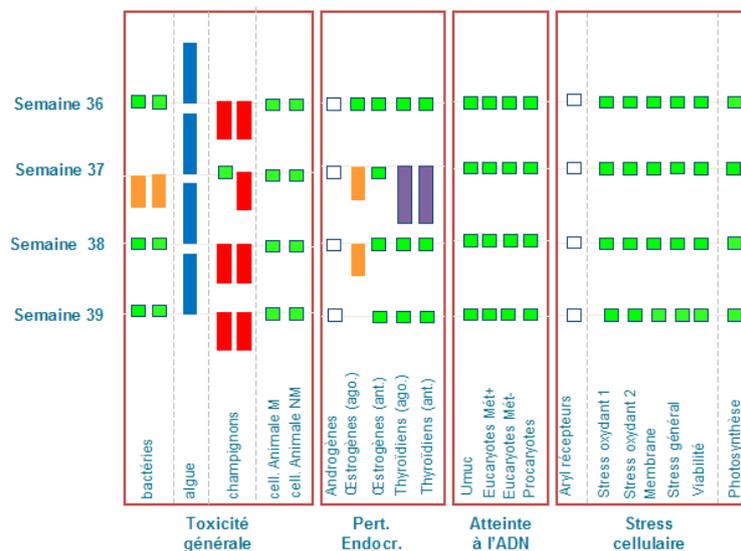


Figure 51 : La Midouze - Bégaar (aval)

Remarques :

- On note tant en amont qu'en aval, une dégradation de la qualité de l'eau en semaine 37 et 38 (avec des effets PE oestrogène et surtout une toxicité directe sur les cellules du test PE thyroïdien).
- Signe d'un changement notable de qualité de l'eau : les profils amont et aval diffèrent. Réduction de l'impact sur les bactéries mais augmentation de celui sur les champignons. En aval, la croissance des algues est très fortement stimulée, signe probable d'un enrichissement en nutriments.

4.7.5 Conclusion

Sur l'ensemble de cette zone, plusieurs effets biologiques sont observés, de manière régulière ou ponctuelle. Dans un cas (Retjon aval), le profil indique une très forte dégradation de la qualité de l'eau. In fine, toutes les eaux de cette zone semblent être soumises à des pressions chimiques ponctuelles ou continues notables.

4.8 Les Eaux Claires (amont / aval)

4.8.1 Géographie et localisation des prélèvements

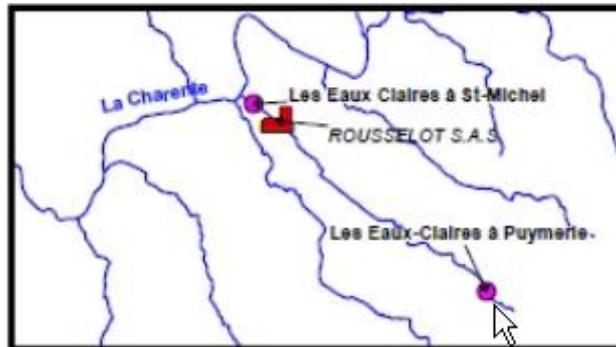


Figure 52 : Situation géographique des prélèvements

Les Eaux claires sont un affluent de la rive gauche de la Charente. Les points de prélèvements sont en amont : Torsac (Source) et en aval : St Michel (Confluence avec la Charente). ROUSSELOT SAS est un industriel des cuirs et peaux (tannerie).

4.8.2 Analyses chimiques

03-sept	Les Eaux Claires (am)	Les Eaux Claires (av)
DéséthylAtrazine (MET)	0.034	0.056
Chloroforme (°) (THM)	2.8	0.2
Bore dissous	10	10
Antimoine Dissous	0.2	0.1
Cobalt Dissous	0.3	0.2
Plomb Dissous	1	1
Zinc dissous	9	4
Vanadium Dissous	6.0	0.6
Nickel Dissous	3	1
Cadmium Dissous	0.05	0.05
Phtalate Di (2-Ethyl Hexyl)	0.25	0.25
Nonylphenols (SANDRE 1957)	0.10	0.10
10-sept	Les Eaux Claires (am)	Les Eaux Claires (av)
DéséthylAtrazine (MET)	0.045	0.063
Chloroforme (°) (THM)	0.2	0.2
Bore dissous	30	20
Antimoine Dissous	0.3	0.1
Cobalt Dissous	0.5	0.2
Plomb Dissous	1	1
Zinc dissous	9	4
Vanadium Dissous	9.3	0.7
Nickel Dissous	3	1
Cadmium Dissous	0.05	0.05
Baryum Dissous	20	20
Phtalate Di (2-Ethyl Hexyl)	0.25	0.25
17-sept	Les Eaux Claires (am)	Les Eaux Claires (av)
DéséthylAtrazine (MET)	0.067	0.046
Chloroforme (°) (THM)	0.2	0.2
Bore dissous	10	20
Antimoine Dissous	0.1	0.2
Zinc dissous	6	7
Vanadium Dissous	0.7	8.7
Nickel Dissous	1	3
Cadmium Dissous	0.05	0.05
Baryum Dissous	10	10
4-ter-octylphenol (SANDRE 1959)	0.026	0.020
Thallium Dissous	0.1	0.1

Figure 53 : Figure 1 : Situation géographique des prélèvements

- Les analyses chimiques ne montrent pas de dégradation entre amont et aval.

4.8.3 Etat écologique



Figure 54 : Les Eaux Claires – Torsac (amont)



Figure 55 : Les Eaux Claires – St Michel (aval)

- Contrairement aux analyses chimiques, l'état écologique montre une forte dégradation de l'eau entre amont et aval. L'indice diatomée est médiocre.

4.8.4 Bio-essais

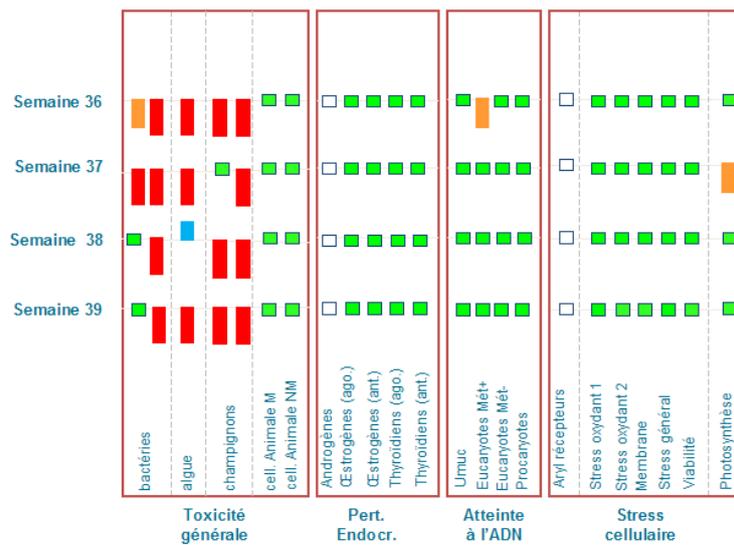


Figure 56 : Les Eaux Claires – Torsac (amont)



Figure 57 : Les Eaux Claires – St Michel (aval)

Remarques :

- Les impacts forts observés sur les bio-essais de croissance en amont sont réduits (signe d'un enrichissement en nutriment)
- On note une nette dégradation de la qualité de l'eau entre amont et aval avec des effets PE oestrogène et surtout une toxicité directe sur les cellules du test PE thyroïdien (semaine 38 et 39 uniquement, ce qui suggère une pollution momentanée).

4.8.5 Conclusion

Sur l'ensemble de cette zone, plusieurs effets biologiques sont observés, de manière régulière ou ponctuelle.

4.9 La Légère - Pouffonds

4.9.1 Géographie et localisation des prélèvements



Figure 58 : Situation géographique des prélèvements

La Légère, petit cours d'eau conflue dans la Berlande, affluent de la Béronne, affluent dans la Boutonne, affluent de la Charente.

Le point de prélèvement a été choisi en aval de Saint-Léger-de-la-Martinère, où se situent notamment le site de Rhodia (fabrication de divers produits chimiques) et de Danisco (sucrierie).

4.9.2 Analyses chimiques

03-sept	la légère
DéséthylAtrazine (MET)	0.024
Chloroforme (*) (THM)	0.2
Bore dissous	50
Antimoine Dissous	0.5
Cobalt Dissous	1.3
Plomb Dissous	19
Zinc dissous	8
Vanadium Dissous	4.0
Nickel Dissous	9
Cadmium Dissous	0.05
Phtalate Di (2-Ethyl Hexyl)	0.25
Nonylphenols (SANDRE 1957)	0.10

10-sept	la légère
DéséthylAtrazine (MET)	0.020
Chloroforme (*) (THM)	0.2
Bore dissous	80
Antimoine Dissous	0.7
Cobalt Dissous	1.9
Plomb Dissous	13
Zinc dissous	11
Vanadium Dissous	3.4
Nickel Dissous	11
Cadmium Dissous	0.05
Baryum Dissous	60
Phtalate Di (2-Ethyl Hexyl)	0.25

17-sept	la légère
DéséthylAtrazine (MET)	0.020
Chloroforme (*) (THM)	0.2
Bore dissous	60
Antimoine Dissous	0.4
Zinc dissous	6
Vanadium Dissous	4.2
Nickel Dissous	8
Cadmium Dissous	0.05
Baryum Dissous	40
4-ter-octylphenol (SANDRE 1959)	0.020
Thallium Dissous	0.1

Figure 59 : Situation géographique des prélèvements

Hormis le Bore et quelques métaux, aucune substance n'est décelée dans le cours d'eau.

4.9.3 Etat écologique

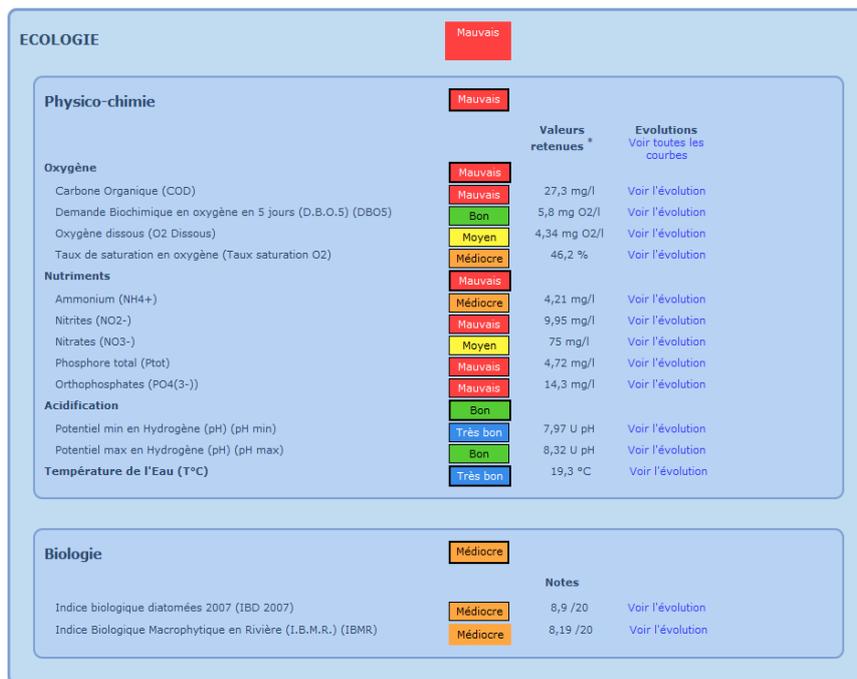


Figure 60 : Situation géographique des prélèvements

La Légère est classée en mauvais état écologique, avec un indice diatomée médiocre.

4.9.4 Bio-essais

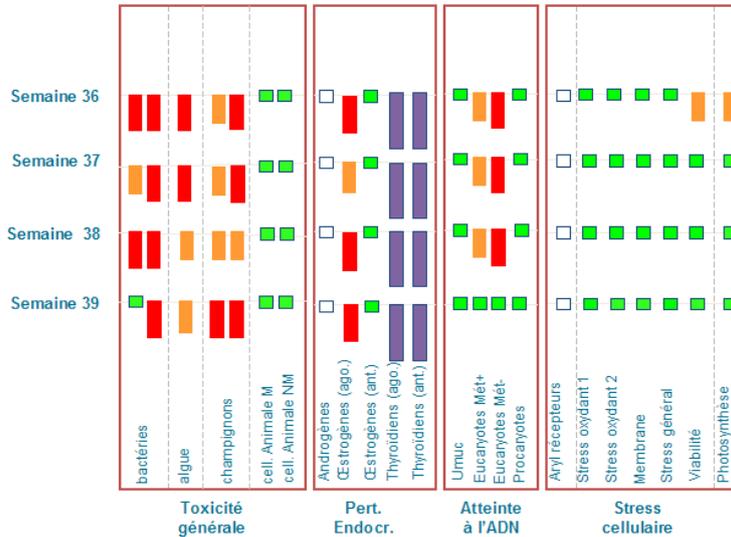


Figure 61 : La légère – Pouffonds

- Les profils sont similaires, avec des impacts importants observés par plusieurs bio-essais. On note des effets PE œstrogènes importants et surtout une toxicité directe sur les cellules du test PE thyroïdien.

4.9.5 Conclusion

Dans le cas de la Légère, les bio-essais montrent un impact sur le vivant important, alors que les analyses chimiques ne dévoilaient rien de cette mauvaise qualité.

5 Conclusion générale

Les objectifs de cette étude étaient :

1. d'apprécier la pertinence des outils proposés (sensibilité, reproductibilité, etc.),
2. de disposer des premières données de ce type sur des sites déjà connus pour leurs caractéristiques (états chimiques et écologiques) et voir en quelles mesures elles permettent de mieux appréhender leur état ;

ces informations, permettant à l'Agence de définir si cette approche doit être renouvelée puis étendue aux autres sites du bassin comme moyen d'évaluation et/ou de surveillance à part entière.

5.1 Pertinence des bio-essais

- Les bio-essais sont suffisamment sensibles pour être utilisés sur des eaux de surface de milieux naturels. Ils peuvent mettre en évidence des impacts sur le vivant de différentes nature, y compris là où les autres approches (états chimique et écologique) ne sont pas suffisamment sensibles et/ou discriminantes (ex. : Garonne),
- Les bio-essais présentent des réponses graduées, ce qui permet de différencier facilement des situations (ex. : comparaison amont/aval) ;
- Sans que l'on puisse parler de reproductibilité au sens strict (car les échantillons ne sont jamais les mêmes d'une semaine à une autre) les bio-essais présentent des résultats globalement homogènes : les profils des eaux sont souvent bien conservés entre les semaines et entre amont et aval.

5.2 Intérêt pratique des bio-essais

- Les modalités pratiques sont simples (prélèvement classique et de faible volume : quelques centaines de ml pour l'ensemble du profil),
- Les protocoles expérimentaux n'ont pas posé de problème et peuvent donc être déployés à plus grande échelle.
- Les résultats disponibles en quelques jours
- Le mode de présentation visuel des résultats permet d'avoir immédiatement une idée du potentiel toxique d'une eau, de comparer facilement des échantillons et de manipuler simplement un grand nombre de données (plus de 1200 résultats de bio-essais dans le cas présent).
- Les coûts des bio-essais restent encore élevés, mais pourront être réduits par une augmentation de la productivité et une programmation dans la durée (ce qui permet une organisation optimale des plans de travaux, cf. chap. 2.2, page 5).

5.3 Complémentarité des bio-essais avec les autres approches

- Les bio-essais fournissent un éclairage sur les effets dus aux pressions physico-chimiques et chimiques (pollution dissoute) ce qui est complémentaire aux indices biologiques, qui donnent le résultat de l'ensemble des pressions subies par l'écosystème (régime hydrologique, physico-chimie, chimie, réseau trophique, ...).
- De par la facilité de mise en œuvre, les bio-essais peuvent être utilisés pour réaliser des cartographies fines et/ou des suivis dans le temps avec un pas de temps choisi selon la problématique.
- L'état écologique est une observation de la réalité, alors que les bio-essais ne sont que des tests en laboratoire, mais la stratégie proposée d'un profil constitué de quatre

panels de bio-essais permet d'avoir une appréciation détaillée des effets biologiques suivis (alors que les IBG ne donne qu'une indication sur l'état final).

- Les bio-essais sont par nature complémentaires aux analyses chimiques. Il est à noter que, dans le cas de cette étude, les analyses chimiques n'ont que peu renseigné sur la qualité de l'eau (: la quasi totalité des mesures indiquent la limite de quantification).

De par leur sensibilité et leur angle d'observation, les bio-essais apportent donc des éléments complémentaires aux approches de la DCE (état chimique et écologique).

5.4 Appréciation des bio-essais

Cette étude a permis de montrer que :

- Les résultats de cette étude ainsi que ceux issus d'autres travaux (sur milieux naturels ou non) nous laissent à penser que les bio-essais réalisés sur ces deux souches de champignons montrent une réaction généralement surestimée. Ces bio-essais restent reproductibles et discriminant (ils permettent de différencier des échantillons), mais nous émettons l'hypothèse d'une sensibilité aux caractéristiques physico-chimiques de l'eau. Nous travaillons actuellement sur le sujet, en testant différentes conditions, notamment selon la minéralisation de l'eau, et allons inclure d'autres souches de champignons pour mieux compléter ces deux bio-essais.
- Le bio-essais de génotoxicité Umuc (considéré comme un test référence) est peu sensible : contrairement aux deux autres bio-essais sur bactérie ou cellules humaines, ce test n'a jamais détecté d'impact à l'ADN. Ces résultats recourent ceux réalisés par VigiCell sur des substances isolées (génotoxiques ou non). Ce bio-essai ne sera plus maintenu dans le panel.

6 Perspectives

En plus de leur complémentarité aux états chimique et écologique dans l'évaluation de la qualité des masses d'eau, les bio-essais pourraient avantageusement être utilisés dans le cas de démarches de type :

- EDA (analyse dirigée par les effets) afin de localiser les rejets de pollution toxiques et déterminer, sans avoir forcément identifié la nature des substances polluantes, les modalités (substitution, procédés) permettant de la réduire ou de l'éliminer,
- TIE (évaluation et identification de la toxicité) afin de déterminer les substances responsables des effets toxiques et donc permettre d'agir en amont, au niveau de son émission, par retrait, substitution ou traitement localisé.