



Essais inter-laboratoire pour évaluer le standard ISO 11063 ‘Qualité du sol – méthode pour l’extraction directe des acides nucléiques du sol’

Ines Petric, Laurent Philippot, Cristina Abbate, Antonio Bispo, Thierry Chesnot, Sara Hallin, Karine Laval, Thierry Lebeau, Philippe P. Lemanceau, Corinne Leyval, et al.

► To cite this version:

Ines Petric, Laurent Philippot, Cristina Abbate, Antonio Bispo, Thierry Chesnot, et al.. Essais inter-laboratoire pour évaluer le standard ISO 11063 ‘Qualité du sol – méthode pour l’extraction directe des acides nucléiques du sol’. 4. séminaire d’Ecotoxicologie, Institut National de Recherche Agronomique (INRA). UMR Agroécologie (1347)., Nov 2011, Saint Lager, France. 133 p. hal-01191131

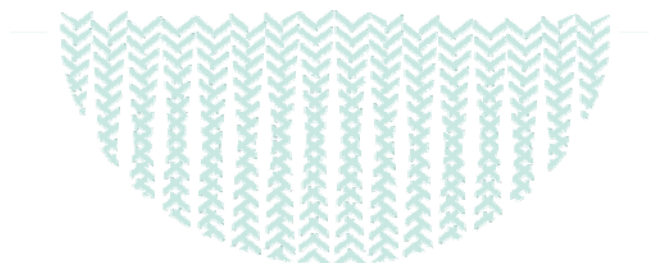
HAL Id: hal-01191131

<https://hal.science/hal-01191131>

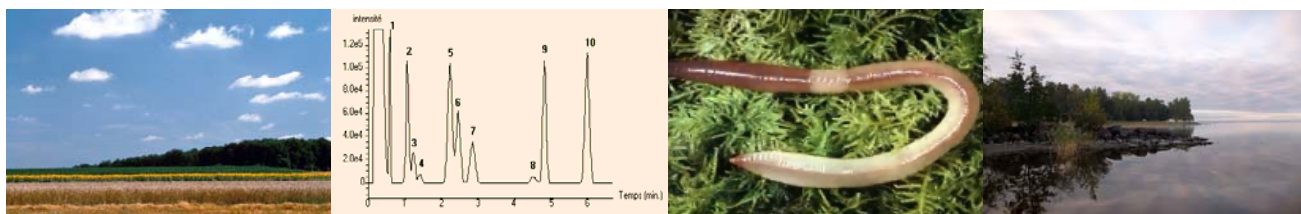
Submitted on 3 Jun 2020

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.



4^{ème} Séminaire d'Ecotoxicologie de l'INRA



Saint Lager, 7-9 novembre 2011

Réseau des Ecotoxicologues de l'INRA
Réseau Ecodynamique des Micropolluants





Institut National de la Recherche Agronomique

4^{ème} Séminaire d'Ecotoxicologie

7-9 novembre 2011

Château des Ravatys – Saint Lager

Comité d'organisation

Pierre Benoit (Versailles-Grignon)
Thierry Caquet (Rennes)
Laurence Denaix (Bordeaux)
Laurent Lagadic (Rennes)
Fabrice Martin Laurent (Dijon)
Christian Mougin (Versailles-Grignon)

*Réseau des Ecotoxicologues de l'INRA
Réseau Ecodynamique des Micropolluants*

Secrétariat

Annita Barazer (Versailles-Grignon)
Céline Duisit (Versailles-Grignon)

Portail internet

Cécile Héraud (Dijon)

Remerciements

Ce séminaire a bénéficié du soutien financier des départements *Santé des Plantes et Environnement, Environnement et Agronomie, Ecologie des Forêts, Prairies et Milieux Aquatiques*



4^{ème} Séminaire d'Ecotoxicologie
7-9 novembre 2011 – St Lager

Programme

Programme

Lundi 7 novembre

11h30-13h00 : Accueil des participants

12h00-13h30 : **Déjeuner**

13h45-13h55 : **Ouverture du séminaire, Comité d'organisation**

13h55-14h05 : Hommage à Jean-Baptiste Bergé (*Laurent Lagadic, UMR ESE, Rennes*)

14h05-14h35 : L'écotoxicologie : contexte national et attentes de l'INRA, *Laurent Lapchin (Directeur Scientifique Adjoint Environnement)*

14h35-15h00 : L'écotoxicologie dans les Schémas Stratégiques de Départements et les attentes formulées, *Nathalie Munier-Jolain (Département EA), Thierry Caquet (Département EFPA), Olivier le Gall (Département SPE)*

15h00-15h45 : Conférence introductive : La toxicité des substances en co-exposition : de nombreuses questions ... et peu de réponses? *Pierre-Marie Badot (UMR Chrono-Environnement, Besançon)*

15h45-16h00 : **Pause**

Session 1 : Biodisponibilité et dynamique des contaminants

Animateurs : Laurence Denaix et Pierre benoit

16h00-16h20 : Typologie des contaminants organiques : vers un outil opérationnel permettant d'aboutir à la définition et au choix de micropolluants représentatifs « modèles » pour les études en écotoxicologie, *Pierre Benoit (UMR EGC, Grignon)*

16h20-16h40 : Photodégradation du chlorotoluron induite par les constituants du sol, *Sylvie Nélieu (UMR PESSAC, Versailles)*

16h40-17h00 : Transfert de la chlordecone dans les végétaux, *Clarisse Létondor (UMR Ecolab, Toulouse)*

17h00-17h20 : Utilisation de capteurs passifs pour prédire le prélèvement de cadmium et de plomb par les végétaux, *Laurence Denaix (UMR TCEM, Bordeaux)*

17h20-17h40 : Impact du changement d'occupation des sols sur la biodisponibilité des métaux dans les sols contaminés : cas des cultures annuelles vs cultures pérennes à vocation énergétique, *Isabelle Lamy (UR PESSAC, Versailles)*

17h40-18h00 : Fractionnement et biodisponibilité du mercure dans les sols d'une friche industrielle, *Frédéric Gimbert (UMR Chrono-Environnement, Besançon)*

18h00-18h20 : La bioindication active par l'escargot: un outil d'évaluation du risque de transfert de métaux intégrateur de leur biodisponibilité, *Benjamin Pauget (UMR Chrono-Environnement, Besançon)*

18h20-18h40 : Quel impact à long terme des antibiotiques persistants apportés au sol lors de l'épandage de lisiers? *Christian Mougin (UR PESSAC, Versailles)*

Session2 : Altérations physiologiques et comportementales

Animateurs : Laurent Lagadic et Christian Mougin

18h40-19h00 : Effets non-intentionnels des toxines de *Bacillus thuringiensis* (ENIBt), Marcel Amichot (UMR IBSV, Sophia-Antipolis)

19h00-19h20 : Mesures des effets non-intentionnels du thiamethoxam chez l'abeille domestique par l'enregistrement automatique des comportements, Axel Decourtye (UMT PRADE, Avignon)

19h20-19h40 : Effets des insecticides sur le développement des glandes hypopharyngiennes chez l'abeille domestique adulte après une exposition au stade larvaire, Pierrick Aupinel (UE Entomologie, le Magneraud)

19h40-20h00 : Evaluation des impacts phytosanitaires chez l'auxiliaire *Forficula auricularia* L., Magali Rault (UMR Abeille et Environnement, Avignon)

20h00 : **Diner**

21h00-21h30 : Session poster

Mardi 8 novembre

Session2 : Altérations physiologiques et comportementales (suite)

Animateurs : Laurent Lagadic et Christian Mougin

8h45-9h05 : Essais inter-laboratoire pour évaluer le standard ISO 11063 Qualité du sol – méthode pour l'extraction directe des acides nucléiques du sol, Fabrice Martin-Laurent (UMR MSE, Dijon)

9h05-9h25 : Adaptation des modèles de distribution de sensibilité des espèces aux diatomées benthiques pour l'évaluation du risque des herbicides, Floriane Larras (UMR CARTELL, Thonon)

9h25-9h45 : Illustration des approches utilisées en écotoxicologie aquatique dans les Antilles françaises : bilan et perspectives des études sur les effets biologiques de la chlordécone sur les crustacés des rivières de Guadeloupe, Laurent Lagadic (UMR ESE, Rennes)

9h45-10h05 : Intérêt des lignées cellulaires de poisson et évaluation écogénotoxicologique, Sylvie Bony (UMR LEHNA, Vaulx en Vélain)

10h05-10h25 : Conséquences écotoxicologiques d'un impact génotoxique sur les gamètes des organismes aquatiques, Alain Devaux (UMR LEHNA, Vaulx en Vélain)

10h25-10h45 : Apport de la génétique quantitative pour estimer l'impact évolutif des contaminants : exemple chez *Lymnaea stagnalis* exposée à des pesticides, Marie-Agnès Coutellec (UMR ESE, Rennes)

10h45-11h05 : Intérêt des modèles mécanistes en écotoxicologie pour l'estimation des effets toxiques, de l'individu à la population, Virginie Ducrot (UMR ESE, Rennes)

11h05-11h30 : **Pause et session posters**

Session 3 : Altérations de la dynamique des populations et des communautés

Animateurs : Thierry Caquet et Fabrice Martin-Laurent

11h30-11h50 : Application des techniques de microrespirométrie pour la caractérisation écotoxique microbienne (traits physiologiques et PICT) de sols contaminés par des métaux lourds, *Annette Bérard (UMR EMMAH, Avignon)*

11h50-12h10 : ECOFUN-MICROBIODIV : un programme européen pour développer et évaluer des outils pour mesurer l'impact de pesticides sur les microorganismes des sols, *Fabrice Martin-Laurent (UMR MSE, Dijon)*

12h10-12h30 : Effet d'apports répétés de produits résiduels organiques sur la réponse de bioindicateurs ; intérêt de dispositifs de longue durée, *Sabine Houot (UMR EGC, Grignon)*

12h30-12h50 : Nécessité d'essais à long terme pour évaluer l'impact des pesticides et du travail du sol sur les vers de terre, *Céline Pelosi (UR PESSAC, Versailles)*

12h50-14h00 : **Déjeuner**

Tables rondes

14h00-15h00 : Introduction aux tables rondes

- Faibles doses, pollutions multiples, *Nicolas Mazella (Cemagref, Cestas)*
- Comment établir les liens entre exposition et effets biologiques en milieu contaminé ? *Stéphane Pesce (UR MALY, Cemagref, Lyon)*
- Modèles d'exposition et modèles d'impacts : quels apports et quelles limites? *Igor Dubus (Footways, Orléans).*

15h00-17h00 : Déroulement des tables rondes en parallèle

17h00-17h45 : Préparation des restitutions par les rapporteurs et session poster

18h00-20h00 : **Visite des chais et cocktail dinatoire**

20h00-21h30 : Restitution des tables rondes

Mercredi 9 novembre

Session 3 : Altérations de la dynamique des populations et communautés (suite)

Animateurs : Thierry Caquet et Fabrice Martin-Laurent

8h45-9h05 : Utilisation de modèles d'exposition aux pesticides pour la reconstitution et la mise en œuvre de scénarios réalistes de contamination de mésocosmes permettant d'étudier les impacts d'itinéraires techniques de phytoprotection sur les organismes aquatiques, *Laurent Lagadic (UMR ESE, Rennes)*

9h05-9h25 : Analyse expérimentale de la réponse de descripteurs structurels et fonctionnels des communautés de macro-invertébrés aquatiques à une exposition à un fongicide, *Yannick Bayona (UMR ESE, Rennes)*

9h25-9h45 : Adaptation de l'indice SPEAR aux mésocosmes lenticques pour caractériser l'exposition des communautés d'invertébrés aquatiques aux pesticides, *Marc Roucaute (UMR ESE, Rennes)*

9h45-10h05 : Des bioindicateurs pour évaluer l'impact des pesticides sur les milieux aquatiques, *Thierry Caquet (UMR ESE, Rennes)*

10h05-10h25 : **Pause**

10h25-10h45 : BETSI : développements conceptuels et utilisations du concept de trait fonctionnel en écotoxicologie des sols, *Mickaël Hedde (UR PESSAC, Versailles)*

10h45-11h05 : Intérêts et limites des organismes sentinelles : cas des escargots *Xeropicta derbentina* dans les vergers de pommiers en Provence, *Yvan Capowiez (UMR PSH, Avignon)*

11h05-11h25 : Le paysage module le transfert et les effets de polluants métalliques chez les micromammifères, *Clémentine Fritsch (UMR Chrono-Environnement, Besançon)*

11h25-12h00 : **Synthèse et conclusion du séminaire**

12h00-13h30 : **Déjeuner**

13h30 : **Clôture du séminaire, départ vers la gare TGV**



4^{ème} Séminaire d'Ecotoxicologie
7-9 novembre 2011 – St Lager

Résumés



4^{ème} Séminaire d'Ecotoxicologie
7-9 novembre 2011 – St Lager

Conférence introductive

Mixture toxicity: many questions ... and still few responses?

Pierre-Marie BADOT

CNRS-University of Franche-Comte, UMR 6249 Chrono-environment USC INRA
Place Leclerc, F-25030 BESANCON CEDEX
pierre-marie.badot@univ-fcomte.fr

Introduction

Living organisms are almost constantly exposed to many stressors. Among them, chemical pollutants play a major role. A wide range of chemical substances may act as pollutants, ranging from simple inorganic ions to complex organic molecules. Some of these chemicals are of concern because of their human toxicity. Other chemicals may cause damages to non-human biota but are not believed to be harmful to humans. To describe the consequences of pollutants' exposure, numerous toxicological and ecotoxicological studies have been performed and a considerable corpus of knowledge have been produced about the deleterious effects of chemicals on human health and environment. This knowledge has been used to draw rules and regulations for managing chemicals of concern.

Nevertheless, one has to notice that most toxicological and ecotoxicological studies focus on exposure and effects of single compounds. In the real world the living organisms are permanently exposed to multiple substances acting in a concomitant way. Organisms are generally submitted to many pollutants acting at the same time. However, most of the methods used for the management of chemical compounds are based on single-substance risk evaluations. When risk assessment of multiple chemicals are required, single-substance toxicity data are used to derive mixture toxicity using a limited number of methods and models. After giving some basic concepts and terminology, the state-of-the-art will be reviewed through a brief overview of the methods currently available to assess combined exposure toxicity or more simply mixture toxicity. Then, several case-studies (wood preservative mixture, multicontaminated industrial effluents) will be used to highlight some of the difficulties and gaps of the current methodologies.

Basic concepts and terminology.

A quick survey of the scientific literature may convince anybody that there is a very rich terminology in the field of mixture toxicity. Many definitions have been used about chemical mixtures and mixture toxicity. Very often, this terminology remains unclear and sometimes contradictory. The main concepts and definitions need to be summarized and clarified.

Following the U.S. Environmental Protection Agency (1986, 1987), a **mixture** will be defined as any combination of two or more chemical substances, regardless of source or of spatial or temporal proximity, that can influence the risk of chemical toxicity in the target population. Mixtures may be highly complex originating for a single source or process as by-products (diesel exhaust, municipal incinerator, etc.). In other instances, chemical mixtures are man-made commercial products (e.g. pesticide formulations, PCBs, gasoline). In some other cases, environmental releases, waste disposals, or storages of various chemical compounds cause combined exposures. Multichemical exposures are ubiquitous, including air, water, soil and food contaminations from various sources.

Table 1 gives a summary of the most commonly used definitions. A **chemical mixture** corresponds to any set of multiple chemical substances regardless of their sources that may jointly cause toxicity in the target population. The **components** of the mixture may or may not be identifiable. **Similar components** are components with the same or similar biological activities. Literature often refers to this chemical mixture as **whole mixture** or **mixture of concern**. A mixture can be simple or complex. A **simple mixture** is considered as any mixture that toxicity can be adequately characterized with the help of the combination of the single toxicities and interactions of its components. Usually, such simple mixture contains a small number of identifiable single chemicals. Unfortunately, real world case

studies most often involve **complex mixtures**. One has to consider as a complex mixture any mixture containing so many components that it is not possible to properly characterize its toxicity from data based on components' toxicities and interactions. Risk assessment of complex mixture is based on toxicity and exposure data on the whole mixture. Mixtures that displayed similar characteristics for transport, fate, physiological processes, and toxicity are known as **similar mixtures**. Very often, they only differs by a small number of features. Moreover, similar mixtures frequently contain groups of components that are similar in chemical structure and biological activity and also originate together from the same kind of sources (e.g. diesel exhaust, municipal incinerator). Such similar components belong to the same *chemical class*.

component	single chemical that may enter in the composition of a chemical mixture
similar component	single chemicals with the same or similar biological activities.
chemical mixture	any set of multiple chemical substances regardless of their sources that may jointly cause toxicity in the target population.
simple mixture	any mixture containing two or more identifiable single chemicals, but few enough that the mixture toxicity can be adequately characterized.
complex mixture	any mixture containing so many components that any estimation of its toxicity contains too much uncertainties and errors to be useful.
similar mixtures	mixtures that are expected to have comparable characteristics for toxicity.
chemical class	any group of components displaying similar chemical structure and biological activity.

Table 1. Definitions and key concepts widely used in assessment of mixture toxicity. Components and mixtures (from U.S. EPA, 1987)

Dealing with the biological activities of chemicals, the literature frequently refers to the **mode of action** as a series of events and processes starting with interaction of an agent with a cell, causing disturbances and damages (Table 2). The sequence of events has to be supported by experimental evidences and a clear link must be identified between the adverse effect and the chemical. The reference to the **mechanism of action** implies a more detailed understanding and a deeper description of the cascade of events.

One has also to clearly distinguish between aggregate and cumulative exposures. **Aggregate exposure** refers to single chemical toxicity. It is the whole exposure to a single chemical whatever the **exposure pathways** (food, water, air, residential uses, occupational) and the **exposure routes** (oral, dermal, inhalatory, external). The associated risk is the **aggregate risk**. **Cumulative exposure** and corresponding **cumulative risk** refer to multiple chemicals, whatever the pathways and routes. One has to emphasize that temporality of exposure/effects plays a key role in aggregate and cumulative exposure assessments.

mode of action	series of events or processes resulting in an adverse effect.
mechanism of action	detailed description and understanding of the molecular events explaining biological activity
aggregate exposure	demographic, spatial and temporal characteristics of exposure to a single chemical through all relevant pathways and routes.
aggregate risk	risk associated with aggregate exposure.
cumulative exposure	aggregate exposure to multiple chemicals.
cumulative risk	risk associated with cumulative exposure
exposure pathway	any physical way that contributes to a physical interaction between chemicals and living organisms
exposure route	any process that permits the entry of a chemical into an organism or the interaction between the toxicant and the organism

Table 2. Definitions and key concepts widely used in assessment of mixture toxicity. Biological action, exposures, risks. (U.S. EPA, 1987; WHO ICPS, 2009)

Interactive and non interactive chemicals. Currents methods for assessing mixture toxicity.

Very early, Plackett & Hewlett (1952) have identified four possible types of joint action for mixtures (Table 3).

<i>Types</i>	<i>Similar joint action</i>	<i>Dissimilar joint action</i>
<i>Non interactive</i>	Simple similar action (concentration addition)	Independent joint action (response addition)
<i>Interactive</i>	Complex similar action	Dependent joint action.

Table 3. The four possible types of joint action for mixtures (Plackett & Hewlett, 1952).

These four types essentially refer to binary mixtures. However, real chemical mixtures often contain numerous substances. Moreover, interactions are thought at the molecular level in terms of mode of action. Other interactions between chemicals may occur at other biological levels. Nevertheless, these authors have clearly distinguished two key points of joint action: (i) the similarity or dissimilarity of the modes of action and (ii) the dependence or independence of chemical actions. Indeed, mixture components exert their toxicity independently or not. They may also have toxicological interactions or not. These properties have been used to define different ways of assessing mixture toxicity.

Revisiting the concepts from Plackett & Hewlett, Ashford (1981) have distinguished six possible combination mechanisms for the joint action of mixtures or drugs (Table 4).

<i>Correspondence between compounds in the mixture</i>	None	Some	All
<i>Common sites of action (similarity)</i>	Dissimilar (and noninteractive)	Partially similar	Fully similar
<i>Common subsystems (dependence)</i>	Independent (and noninteractive)	Partially dependent	Fully dependent

Table 4. The six possible combination mechanisms for the joint action of toxicants (Ashford, 1981)

A key concept in understanding mixture risk assessment is ***toxicological similarity***. In this case, one assumes a similar mode of action across mixture components. Sometimes, the mode of action is not the same and components only act on the same target organ.

Two basic concepts have been generally used for predicting multiple mixture toxicity: ***concentration addition*** (CA model, Loewe and Muischnek, 1926) and ***independent action*** (IA model, Bliss, 1939). Independence of action is defined as mixture components that cause different kinds of toxicity, or effects in different target organs. ***Concentration addition*** or ***dose additivity*** is used when the toxicity of the combination of chemicals can be estimated directly for the sum of the exposure levels. ***Response additivity*** corresponds to the cases when the mixture toxicity can be estimated by the sum of the responses.

It has been proved that the CA 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; 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 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).

Two main difficulties still remain. First, chemicals with and without the same mode of action are very often found in the same mixture. Second, components may toxicologically interact. Furthermore, interspecific differences and possible interactions at the ecological levels are not satisfactorily addressed by the available models.

Recently, De Zwart and Posthuma (2005) proposed a mixed two-step approach for ***mixed-model*** (MM) calculations. 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. We have used these models to assess toxicity of a mixture of wood preservatives. The experimentals, the results and the main conclusions are given in section 5 (see below).

In conclusion, one has to remember that the predicting values of the available models are still an opened question (Backhaus et al., 2003; De Zwart and Posthuma, 2005; Junghans et al., 2006).

<i>index chemical</i>	The chemical selected as the basis for standardization of toxicity of components in a mixture. The index chemical must have a clearly defined dose-response relationship.
<i>dose additivity concentration addition</i>	When each component of the mixture behaves as a concentration or dilution of every other chemical in the mixture, the response of the combination is the response expected from the equivalent dose of an index chemical. The equivalent dose is the sum of component doses scaled by their toxic potency relative to the index chemical.
<i>response additivity independence of action</i>	The toxic response from the combination of chemicals is equal to the conditional sum of components responses as defined by the formula for the sum of independent event probabilities.
<i>RPF</i>	Relative Potency Factor The response of the combination is the response expected from the equivalent dose of an index chemical. This index chemical is selected as the basis for standardization of toxicity of components in a mixture. The index chemical must have a clearly defined dose-response relationship. The equivalent dose is the sum of component doses scaled by their toxic potency relative to the index chemical. $C_m = \sum_{k=1}^n C_k \times RPF_k \quad (\text{Equation 1})$ where C_m is the mixture concentration expressed as an equivalent of the index chemical, C_1 is the concentration of the index chemical, C_k is the concentration of the k component, RPF_k is the relative potency factor relative to the index chemical ($RPF_1 = 1$).
<i>TEF, TEQ</i>	Toxic Equivalency Factor, Toxic Equivalency Quantity These methods have been developed to assess cumulative risk related to dioxins and dioxin-like compounds thanks to the World Health Organization. $TEQ = \sum_{i=1}^n C_i \times TEF_i \quad (\text{Equation 2})$ where TEQ, toxic equivalency quantity is expressed in toxic equivalents of the 2,3,7,8-TCDD, i.e. the index chemical, C_1 is the concentration of the 2,3,7,8-TCDD, C_i is the concentration of the i component, TEF_i is the toxic equivalency factor, that is the relative potency factor relative to the index chemical ($TEF_1 = 1$).

HQ	The hazard quotient is based on the estimation of exposure and its comparison with a reference level supposed to be acceptable. $HQ_i = \frac{E_i}{RfD_i} \quad (\text{Equation 3})$ where HQ_i is hazard quotient for the substance i, E_i is the exposure to the substance i, RfD_i is the reference dose (acceptable level) for the substance i.
HI	The hazard index method is a simple addition method: the hazard index is the sum of hazard quotients for substances that affect the same target organ. $HI = \sum_{i=1}^n HQ_i \quad (\text{Equation 4})$ where HI is the hazard index for the chemical mixture.
PDI	The point of departure index is the simple addition of the ratios between the exposure level and the no observed adverse effect levels (NOAEL) or benchmark doses (BMD). $PDI = \sum_{i=1}^n \frac{EL_i}{PD_i} \quad (\text{Equation 5})$
MOE	The margin of exposure is the sum of the ratios of the no-observed adverse effect level to the estimated exposure dose. $MOE = \sum_{i=1}^n \frac{PD_i}{EL_i} \quad (\text{Equation 6})$

Table 5. Definitions and key concepts used for mixture toxicity assessment when components of the mixture do not interact. Additivity. Independence of action. (U.S. EPA, 2000 & WHO ICPS, 2009)

Basic concepts supporting dose additivity or response additivity are briefly summarized in Table 5.

Different types of toxicological interactions between chemicals

A common concern for evaluating chemical mixtures is the potential for toxicological interactions to occur from co-exposures. Usually, one considers that toxicological interactions occur when the responses observed deviate from those expected under additivity.

When two or more chemicals are combined, they may interact in different ways. The most simple toxicological interactions are **synergism** and **antagonism**. Other interactions, such **potentiation**, **inhibition** or **masking** may also modulate possible adverse effects. Different types of toxicological interactions between chemicals are briefly summarized in Table 6.

The relations between additivity, similarity of the modes of action, and interactions are listed in Table 7, which gives a theoretical overview of the relations between toxicological interactions and similar or dissimilar joint actions.

<i>synergism</i>	The combined effect of several chemicals is greater than expected on the basis of the simple summation of the toxicity of each of the individual substances
<i>potentiation</i>	When one substance does not have a toxic effect on a system, but when added to a toxic chemical, it makes the latter more toxic
<i>antagonism</i>	The combined effect of several chemicals is smaller than the solitary effect of any one of those chemicals
<i>inhibition</i>	When one substance does not have a toxic effect on a system, but when added to a toxic chemical, it makes the latter less toxic
<i>masking</i>	When the compounds produce opposite or functionally competing effects at the same site or sites, so that the effects produced by the combination are less than suggested by the component toxic effects.
<i>no influence</i>	When one substance does not have a toxic effect on a system, and but when added to a toxic chemical, it has no influence on the toxicity of the latter chemical.

Table 6. Types of toxicological interactions (Duffus et al., 2009; US EPA, 2000; ATSDR, 2004)

	<i>Toxicological interaction</i>	<i>Joint action</i>
<i>No interaction</i>	Dose additivity	Simple similar action
	Response additivity	Simple dissimilar action Independent action
<i>Interaction</i>	Synergism	Complex similar action Effect > additivity
	Potentiation	Complex dissimilar action Effect > additivity
	Antagonism	Complex similar action Effect < additivity
	Inhibition	Complex dissimilar action Effect < additivity

Table 7. Relations between toxicological interactions and similar or dissimilar joint actions

Interactions between chemicals and newly developed methods for assessment of mixture toxicity

Besides additivity models, there are very few available methods to take into account the toxicological interactions possibly occurring between the components of a mixture (WHO IPCS, 2009). Among these methods, one has to cite qualitative ***binary weight of evidence (BINWOE)*** proposed from ATSDR (2007). BINWOE evaluates strength of interactions data, mechanism of action, influence of exposure duration and route, and sequence of exposure for each pair of chemicals. For instance, a method has been developed to quantitatively modify the hazard index (HI), using factors that account for interaction weight of evidence, interaction magnitude, fraction of toxic hazard of each interacting chemical pair and relative proportions of the chemicals (Teuschler, 2009; USEPA, 2000). Among the methods currently in development, one has to list Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) models. Such methods have been used (Haddad et al., 2001) to compare an interaction-based HI for central nervous system effects with an additive HI for different exposure to mixtures of several hydrocarbons showing greater than additive effects at the higher total dose levels of the mixture.

The ***Whole Mixture Approach*** (Mumtaz et al., 1993) uses effects data from exposure to the mixture of concern. These data are treated as if the mixture behaves like a single substance.

The ***Threshold of Toxicological Concern (TTC)*** has been proposed for use with complex mixtures where no effects data are available (Kroes et al., 2005). This method is based on structure–activity relationships and assigns exposure thresholds for comparison with the potential exposure level.

Species differ in their sensitivity toward a single chemical as a result of differences in biological traits (De Zwart & Posthuma, 2005). At the ecosystem level, the risk of chemical exposure to a single

compound may be characterized by the proportion of species from a generic species pool that is likely affected by a toxicant at a certain concentration. The ***potentially affected fraction*** of species (PAF) is used to quantify the risk for species assemblages. Using this concept together with the mixture toxicity models (CA and IA models), De Zwart & Posthuma (2005) have proposed a method to address the risk on direct effects on the composition of species assemblages and biodiversity. This method has still to be validated.

Lessons learnt from the case-study of wood preservative mixture toxicity

Previous results (Adam et al., 2009) show that interactions between active substances depend on the ratio between chemicals displaying acute toxicity. Consequently, in real world, relevant environmental risk assessment of chemical 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. Then, aquatic organisms are expected to be exposed to fluctuating ratios of pesticides displaying different toxic interactions. Thus, relevant risk assessment should also consider such possible patterns of exposure.

In the case-study of mixture of wood preservatives (Adam et al., 2009), we have shown that a 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 concentrations of active compounds in the mixture are accurately known. 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.

These results give evidence that toxicity assessment of wood preservative mixtures should be necessarily based on toxicity experiments performed with real commercial solutions and not be derived from single chemical toxicity data. Furthermore, the data strongly suggest that the environmental impacts of wood preservative mixtures might be frequently underestimated.

Concluding remarks

During the last ten years, mixture toxicology has undergone a remarkable and productive development (University of London, 2009). However, because of resource and time limitations, direct toxicological information will never be available on all the possible mixtures to which humans or living organisms are exposed.

Single chemical risk assessment has proven to be efficient at its own scale, but fails for the multiple combination of pollutants and various stressors existing in real life. The current methods available to assess mixture toxicity from single chemical toxicity data suffer from severe limitations, except in cases where additivity stands. In other cases, there does not exist any turn-key solution. The responses to health and environmental concerns cannot be only given by laboratory-based approaches and paradigms.

The temporality of the exposures and related effects is insufficiently taken into account. Efforts should be made to better estimate exposures. This implies that models of exposure have to be developed. Biomarkers of effects, environmental monitoring, biomonitoring, surveillance and population surveys are also essential to an accurate exposure assessment.

The effects of low doses are probably insufficiently taken into account. The sensitivities of the various species must be apprehended better. Statistically based methods may usefully supplement mechanistic approaches. Uncertainties have to be better estimated and taken into account. Progress is still to be made to better understand the mechanisms and modes of action of toxicants. The potential of the omic-techniques must be investigated. Modelling approaches currently developed could also help to a better ecological risk assessment of mixture of chemicals.

Taking into account interactions between chemicals and between chemicals and the environment remains a very difficult, but compulsory and exciting challenge.

References

- Adam, O., Badot, P.M., Degiorgi, F. & Crini, G. (2009). Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the fresh water amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Ecotox. Environ. Saf.* Vol.72, pp. 441–449.
- Ashford, J.R. (1981). General models for the joint action of mixtures of drugs. *Biometrics* Vol.37, pp. 457–474.
- ATSDR (2004). *Guidance manual for the assessment of joint toxic action of chemical mixtures*. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta.
- ATSDR (2007) *Interaction profiles for toxic substances*. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, (<http://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/>).
- 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.* Vol.23, pp. 1757–1769.
- Bliss, C.I. (1939). The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology*, Vol.26, pp. 585–615.
- De Zwart, D., & Posthuma, L. (2005). Complex mixture toxicity for single and multiple species: proposed methodologies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol.24, No.10, pp. 2665–2676, ISSN 0730-7268/05.
- Duffus, J.H., Templeton, D.M., & Nordberg, M. (2009). *Concepts in Toxicology*, RSC Publishing, ISBN 978-0-85404-157-2, Cambridge.
- 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.* Vol.56, pp. 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.* Vol.63, pp. 43–63.
- Haddad, S., Béliveau, M., Tardif, R. & Krishnan K (2001). A PBPK modeling–based approach to account for interactions in the health risk assessment of chemical mixtures. *Toxicological Sciences*, Vol.63, pp. 125–131.
- 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.* Vol.76, pp. 93–110.
- Loewe, S. & Muischnek, H. (1926). Über kombinationswirkungen. 1. Mitteilung: Hilfsmittel der Fragestellung. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* Vol.11, pp. 313–326.
- Mumtaz, M.M., Sipes, I.G., Clewell, H.J. & Yang, R.S. (1993). Risk assessment of chemical mixtures: Biologic and toxicologic issues. *Fundamental and Applied Toxicology*, Vol.21, pp. 258–269.
- Plackett, R.L. & Hewlett, P.S. (1952.) Quantal responses to mixtures of poisons. *J. Royal Stat. Soc. B.* 14: 141–163.
- Teuschler, L. Combination toxicity: evaluating chemical mixtures when common mode of action assumptions do not apply. pp. 59–63. In World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (2009). *Assessment of combined exposures to multiple chemicals: Report of a WHO/IPCS international workshop on aggregate/cumulative risk assessment*. ISBN 978 92 4 156383 3.
- U.S. Environmental Protection Agency (1986). *Guidelines for health risk assessment of chemical mixtures*. Federal Register 51(185): 34014–34025.
- U.S. Environmental Protection Agency (1987). *The risk assessment guidelines of 1986*. EPA/600/8-87/045.
- U.S. Environmental Protection Agency (2000). *Supplementary guidance for conducting health risk assessment of chemical mixtures*. Washington DC. EPA/630/R-00/002.
- University of London, School of Pharmacy (2009). State of the art report on mixture toxicity. http://ec.europa.eu/environment/chemicals/pdf/report_Mixture%20toxicity.pdf
- World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (2009). *Assessment of combined exposures to multiple chemicals: Report of a WHO/IPCS international workshop on aggregate/cumulative risk assessment*. ISBN 978 92 4 156383 3.



4^{ème} Séminaire d'Ecotoxicologie
7-9 novembre 2011 – St Lager

Communications orales



4^{ème} Séminaire d'Ecotoxicologie
7-9 novembre 2011 – St Lager

Session 1

**Biodisponibilité et dynamique des contaminants dans
l'environnement et les chaînes alimentaires**

Typologie des contaminants organiques : vers un outil opérationnel permettant d'aboutir à la définition et au choix de micropolluants représentatifs « modèles » pour des études en écotoxicologie

Pierre BENOIT¹, Laure MAMY², Virginie ROSSARD³, Eric LATRILLE³, Fabienne BESSAC⁴, Dominique PATUREAU³, Enrique BARRIUSO¹, Carole BEDOS¹, Xavier LOUCHART⁵, Fabrice MARTIN-LAURENT⁶,
Cécile MIEGE⁷, François LAURENT⁸, Patrice CARPENTIER⁹

¹INRA-AgroParisTech UMR 1091 EGC, F-78850 Thiverval-Grignon

²INRA UR 251 PESSAC, route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles cedex

³INRA UR050 LBE, avenue des étangs, F-11100 Narbonne

⁴Ecole d'Ingénieurs de PURPAN, 75 voie du TOEC, F-31076 Toulouse

⁵INRA UMR LISAH, 2 place Viala, F-34060 Montpellier

⁶INRA UMR 1229 MSE, 17 Rue Sully, F-21065 Dijon

⁷Cemagref, UR MAEP, 3 bis quai Chauveau, F-69336 Lyon

⁸INRA UMR 5245 ECOLAB, 180, chemin de Tournefeuille, F-31931 Toulouse

⁹ANSES, DPR, Unité Ecotoxicologie Environnement, 253 av. du Général Leclerc, F-94701 Maisons-Alfort

benoit@grignon.inra.fr

Le nombre et la diversité des contaminants organiques (pesticides, HAP, PCB, médicaments,...) potentiellement présents dans l'environnement est une réalité à laquelle sont confrontées les recherches portant sur le devenir et les impacts de ces substances. Selon les estimations, entre 30 000 et 100 000 substances sont concernées, il est donc impossible de les étudier au cas par cas. Cette difficulté se rencontre notamment dans le contexte de la Directive Européenne REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances) qui vise à mettre en place un système d'enregistrement de 30 000 substances chimiques pour lesquelles des informations précises sur la dispersion de ces substances dans l'environnement et leurs impacts écotoxicologiques sont exigées. Parallèlement à ces besoins en lien direct avec le travail d'évaluation des risques, notre communauté scientifique ressent fortement la nécessité de classer les contaminants organiques en fonction de leurs propriétés essentielles dans les mécanismes responsables de leur comportement dans l'environnement, de leur passage dans les organismes vivants et de leurs effets toxicologiques.

Nous avons récemment développé une méthodologie permettant de classer des contaminants organiques selon des propriétés directement liées aux processus d'intérêt environnementaux, par exemple leur rétention irréversible, leur dégradation biotique ou abiotique, leur transfert vers l'air ou les eaux, leur passage dans les organismes vivants ou encore leurs effets toxicologiques. Cet outil, appelé TYPOL, est basé à la fois sur une approche «in silico» calculant des descripteurs moléculaires et sur des méthodes de classification combinant descripteurs moléculaires et paramètres comportementaux. Les classes sont construites à partir d'une analyse statistique (type PLS) des propriétés déduites de la prise en compte des caractéristiques structurales des molécules considérées et des paramètres environnementaux. Le choix des relations entre paramètres et descripteurs est en grande partie basée sur des relations de type QSAR (structure-activité).

De par son mode de construction, l'outil est adaptable à différentes questions de recherche et concerne l'ensemble des contaminants organiques existants ou potentiels. Il vise à extrapoler des connaissances au sein d'une classe de composés à partir des résultats obtenus sur quelques molécules. Il est composé d'une base de données en MySQL

accessible sur un serveur commun. L'ajout de nouvelles données se fait soit par transfert d'un fichier tableur (type Excel), soit par modification de la base à l'aide d'un outil web (phpMyAdmin). Les interfaces d'interrogation de la base de données et des traitements statistiques sont programmées dans le langage R qui intègre de nombreuses bibliothèques de méthodes de traitements statistiques des données. Les sorties graphiques sont aussi réalisées par le logiciel R.

Des perspectives d'améliorations sont envisagées :

- Ajouts de paramètres environnementaux.

Un travail important sera à réaliser autour des données manquantes pour combler une partie des manques. Au sein de l'ANSES, des contacts dans les services BIOCIDE et REACH sont envisagés. Pour les pesticides, il sera possible d'insérer des données extraites de la base AGRITOX pour notamment pour des paramètres écotoxicologiques. Des possibilités non explorées existent auprès de l'INERIS. Des travaux en cours au Cemagref de Lyon pourraient potentiellement se raccrocher à ce travail.

- Ajouts de descripteurs moléculaires.

Pour d'autres pesticides ou des contaminants émergents, la phase d'obtention des descripteurs pourra être améliorée en réalisant l'analyse conformationnelle pour localiser le minimum global grâce à l'utilisation de méthodes comme la dynamique moléculaire ou des méthodes de type Monte Carlo.

- Travailler sur les liens entre molécules parent et métabolites

Il serait intéressant de les prévoir pour par exemple faire apparaître les filiations lors des changements de classes suite à des processus de biodégradation. Ce travail a démarré en 2011 dans le cadre du projet BIODECHLORD « Etudes exploratoires de la dégradation microbienne de la chlordécone » (financement AIP DEMICHLORD et coordination Fabrice Martin (INRA Dijon) où TYPOL sera utilisé pour tester des scénarios de biodégradation de la chlordécone et de cyclodiènes apparentés (approche *in silico*).

Mots-clés : Contaminants organiques, classification, QSAR, impacts environnementaux

Photodégradation du chlorotoluron induite par des constituants du sol

Julien MERNIER, Cédric REPINCAY et Sylvie NELIEU

UR 251 PESSAC, route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles cedex
sylvie.nelieu@versailles.inra.fr

Après épandage les pesticides sont susceptibles de persister, mais le niveau de pollution est atténué par différents processus de dégradation biotiques et abiotiques. Parmi eux, nous nous intéressons plus particulièrement à la photodégradation induite, lors de laquelle des composés présents dans le milieu absorbent l'énergie lumineuse puis forment des espèces réactives qui réagissent avec les pesticides. L'importance de la photodégradation induite par les nitrates a été mise en évidence dans un contexte d'eaux naturelles pour le chlorotoluron, un herbicide de la famille des phénylurées [1]. De plus, des études d'écotoxicité réalisées sur des organismes représentatifs de trois niveaux trophiques ont mis en évidence les impacts dus aux photoproduits [2]. A l'opposé, la photodégradation induite reste mal connue en surface des sols, bien qu'elle soit susceptible de conduire là aussi à des sous-produits potentiellement néfastes pour les organismes terrestres.

L'objectif de cette étude était de caractériser la photodégradation du chlorotoluron en surface du sol, en s'intéressant à la fois aux cinétiques des réactions et aux photoproduits. Dans ce but, des irradiations de chlorotoluron en solution ont été réalisées sous lumière solaire simulée, en présence d'un ou d'un mélange des principaux photoinducteurs présents dans les sols (à concentrations réalistes) : des nitrates (5 mM), du fer(III) (50 μ M) et/ou des acides humiques (HA, 1 ou 5 mg/L). Le chlorotoluron et ses photoproduits ont été analysés par HPLC-UV et HPLC-ESI-MS(/MS) pour leur quantification et leur identification, respectivement.

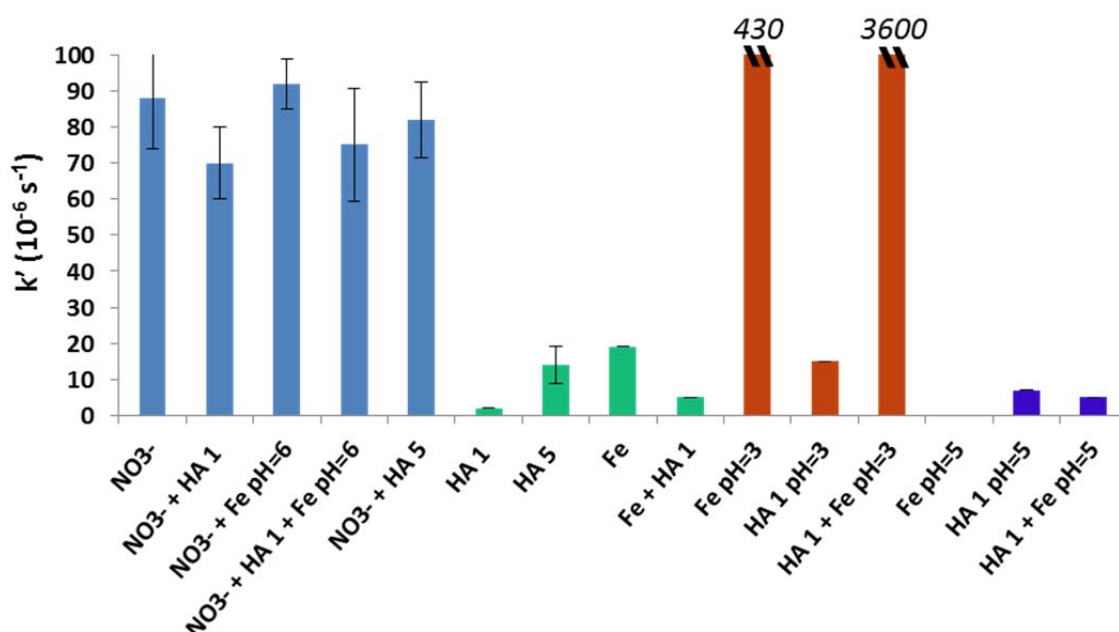


Figure 1. Effet des inducteurs (seuls ou en mélange) et du pH sur la cinétique de photodégradation du chlorotoluron.

La cinétique de dégradation du chlorotoluron a été caractérisée par la pseudo-constante cinétique k' de 1^{er} ordre, déterminée en début de réaction (figure 1). Dans les conditions d'étude, les nitrates sont les inducteurs les plus efficaces à pH neutre ; leur présence masque l'influence éventuelle des autres composés. Cependant, la dégradation du chlorotoluron est significative quand seuls du fer(III) ou des HA sont présents. En milieu acide, le fer apparaît très efficace quand il est majoritairement sous forme $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ à pH 3 mais beaucoup moins sous forme $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ à pH 5, ce qui s'explique à la fois par des différences de spectre d'absorption UV et de solubilité. Par ailleurs, à pH 3, l'association fer + acides humiques a un effet synergique, certainement par formation d'un complexe fer-ligand.

Lors d'études antérieures, nous avons établi le schéma de photodégradation du chlorotoluron induite par les nitrates [1]. Celui-ci comprenait cinq voies, qui résultaient principalement d'une photo-oxydation par les radicaux $\text{OH}^\bullet$ (d'où dégradation N-terminale, oxydation du méthyle porté par le cycle aromatique, substitution du chlore par un hydroxyle ou hydroxylation) ainsi que de réactions avec des espèces azotées ($\text{NO}_2^\bullet$, N_2O_4) conduisant à des dérivés nitrés.

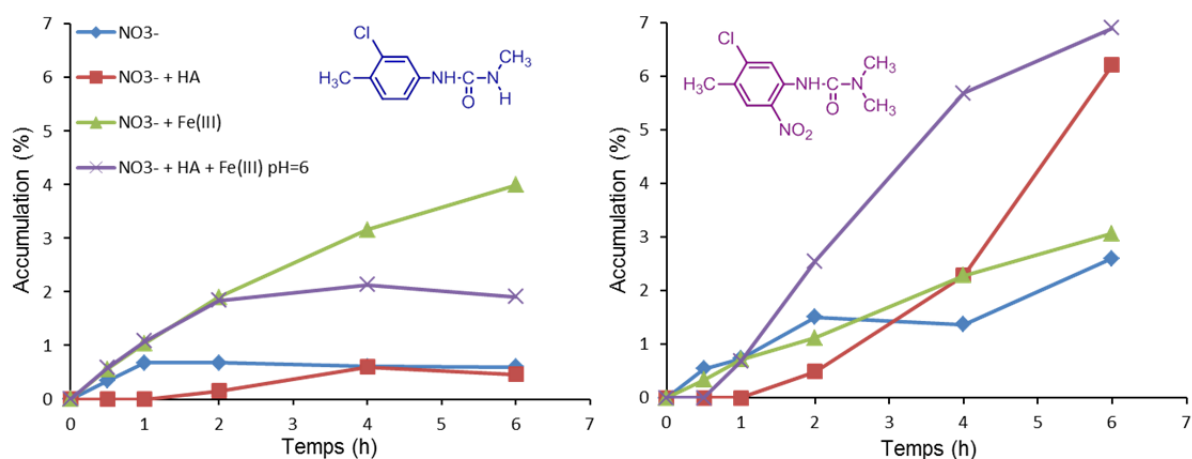


Figure 2. Evolution en fonction du temps d'irradiation du composé N-monodéméthylé (gauche) et nitré (droite).

A pH neutre et en présence de nitrates, seule l'accumulation de deux des produits majoritaires est légèrement influencée par d'autres photoinducteurs également présents (composé N-monodéméthylé favorisé par le fer et composé nitré par les HA, figure 2). Par contre, le pH modifie à la fois la nature et l'évolution des produits formés par l'association $\text{fer(III)} + \text{NO}_3^-$: en milieu acide, le composé nitré n'est plus observé et le N-formyle, très toxique, devient majoritaire avant de se dégrader à son tour (figure 3).

Par ailleurs, le produit de substitution Cl/OH , peu abondant en présence de nitrates, devient prépondérant en leur absence (figure 4). Enfin, un nouveau produit résultant d'une photoisomérisation a été mis en évidence quand les acides humiques sont les seuls inducteurs présents. Ce produit, certainement formé par transfert d'énergie, implique l'existence d'une 6^{ème} voie de dégradation, inédite pour les chlorophénylurées.

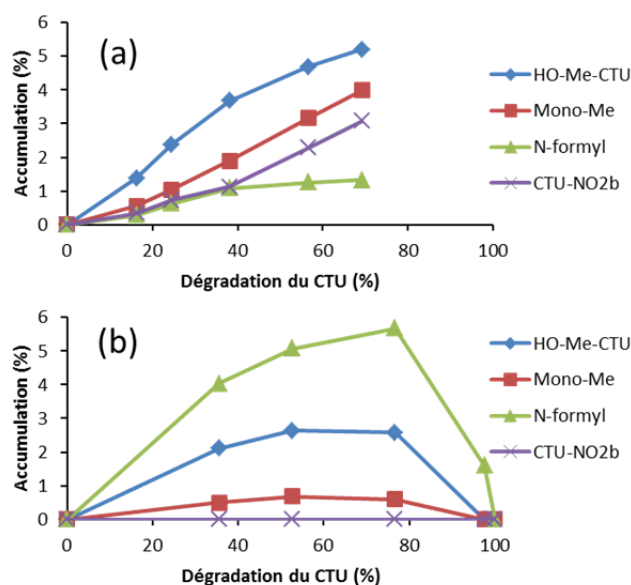


Figure 3. Evolution en fonction de l'avancement de la réaction des 4 photoproduits principaux en présence de nitrates et fer à pH 6 (a) et pH 3 (b).

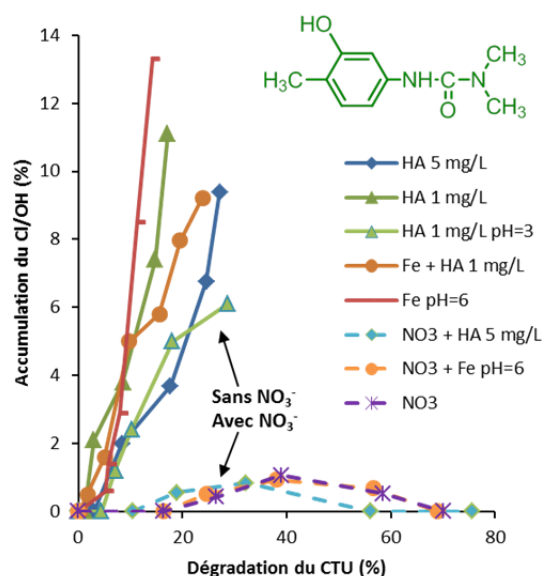


Figure 4. Evolution en fonction de l'avancement de la réaction du produit de substitution Cl/OH.

Remerciements : Les auteurs remercient l'INRA pour son soutien financier, dans le cadre d'un Projet Innovant (Départements EA et SPE).

Mots-clés : phénylurée, photodégradation induite, nitrates, acides humiques, fer(III)

Références

- [1] Nélieu S., Perreau F., Bonnemoy F., Ollitrault M., Azam D., Lagadic L., Bohatier J., Einhorn J. 2009. Sunlight nitrate-induced photodegradation of chlorotoluron: evidence of the process in aquatic mesocosms. *Environ. Sci. Technol.*, 43:3148-3154.
- [2] Nélieu S., Bonnemoy F., Bonnet J.L., Lefeuvre L., Baudiffier D., Heydorff M., Quemeneur A., Azam D., Ducrot P.H., Lagadic L., Bohatier J., Einhorn J. 2010. Ecotoxicological effects of diuron and chlorotoluron nitrate-induced photodegradation products: monospecific and aquatic mesocosm-integrated studies. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29:2644-2652.

Transfert de la chlordécone dans les végétaux

Clarisse LETONDOR, Sophie PASCAL-LORBER, François LAURENT

UMR 5245 ECOLAB, Xénobio/chimie Végétale, INRA, 180 Chemin de Tournefeuille, BP 93173,
F-31027 Toulouse
Clarisse.Letondor@toulouse.inra.fr

La Chlordécone (CLD), un insecticide organochloré utilisé pour lutter contre le charançon du bananier dans les Antilles française de 1972 à 1993, est classée parmi les POPs avec une demi-vie supérieure à celle du DDT. Sa faible dégradabilité et sa dispersion dans les bassins versants des bananeraies entraînent une contamination durable des sols agricoles et des écosystèmes environnants. Elle cause donc de réelles inquiétudes environnementales et sanitaires, en contaminant notamment la flore et les plantes cultivées.

Nous étudions le transfert de cette molécule dans deux plantes modèles, le radis et le sorgho, représentatives des légume-racines et des graminées, ces deux végétaux permettant de suivre l'ensemble du transfert, uptake et translocation, dans les parties végétatives.

Le but de cette étude est de mieux comprendre les mécanismes d'absorption de la CLD et de sa translocation dans les végétaux, pour anticiper à partir de ces plantes modèles, les risques d'exposition dans les chaînes alimentaires. Il s'agit en particulier de clarifier l'ambivalence de la contamination racinaire entre adsorption surfacique et absorption physiologique et de caractériser son transfert et son accumulation dans les parties aériennes des graminées.

Mots-clés : chlordécone, polluant organique persistant, légumes-racines, graminées, uptake, translocation

Utilisation de capteurs passifs pour prédire le prélèvement de cadmium et de plomb par les végétaux

Laurence DENAIX¹, Senda ZARROUK^{1,2,3}, Marie-Aline LAPORTE¹, Alain BERMOND², Naima KOLSI-BENSINA³, Valérie SAPPIN-DIDIER¹

¹UMR 1220 TCEM, INRA, Avenue E. Bourleaux - BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon

²UMR 214, Laboratoire de Chimie analytique, 16 Rue Claude Bernard F-75231 Paris cedex 05

³Laboratoire de Science du Sol et Environnement, INAT. 43, Charles Nicolle Avenue 1082, Tunis Mahrajène, Tunisie

laurence.denaix@bordeaux.inra.fr

Les plantes cultivées sur des sols contaminés en éléments traces métalliques (ETM) peuvent absorber et accumuler ces éléments dans leurs parties consommées. Afin d'évaluer le risque d'entrée dans la chaîne alimentaire associé à la contamination des sols en ETM, il est nécessaire de pouvoir prédire la phytodisponibilité des ETM dans les sols, i.e. la fraction d'ETM du sol susceptible d'être absorbée par une plante et d'interagir avec son métabolisme. La phytodisponibilité des ETM est cependant facile à définir mais difficile à mesurer. Beaucoup de méthodes ont été proposées mais peu sont à la fois simples, robustes et bon marché [1]. Davison et Zhang [2] ont développé un type de capteur passif adapté au prélèvement des métaux (DGT pour Diffusive Gradients in Thin films) pour évaluer la biodisponibilité des ETM dans l'environnement. Cette technique [3] utilise une résine chélatante séparée de la surface du sol par un gel de diffusion de manière à ce que le prélèvement d'ETM par la DGT soit contrôlé par diffusion. La DGT abaisse localement la concentration d'ETM en solution et fournit une mesure quantitative du flux d'ETM induit. Dans une perspective de prédiction de la phytodisponibilité des ETM dans les sols, plusieurs résultats encourageant ont été rapportés pour Cu [4], Zn [5] et plus récemment pour Cd et Pb [6, 7]. Cependant, les capacités prédictives de la DGT dépendraient de la combinaison des métaux, du degré de contamination des sols et de la plante considérée [6, 8]. Nous avons ainsi cherché à tester, pour des sols de nature et de niveau de contamination variables, un modèle de prélèvement des métaux utilisant cet indicateur. Nous avons ainsi réussi à estimer les quantités absorbées par du blé dur pour les éléments cadmium et plomb.

Mots-clés : métaux, phytodisponibilité, prélèvement, capteur passif, DGT

Références

- [1] McLaughlin, M.J., Zarcinas, B.A., Stevens, D.P. and Cook, N., Commun. Soil. Sci. Plant. Anal. 2000, 31, 1661.
- [2] Davison, W. & Zhang, H., Nature 1994, 367, 546.
- [3] Zhang, H., Davison, W., Knight, B. and McGrath, S., Environ. Sci. Technol. 1998, 32, 704.
- [4] Zhang, H., Zhao, F.J., Sun, B., Davison, W. and McGrath, S., Environ. Sci. Technol. 2001, 35, 2602.
- [5] Zhang, H., Lombi, E., Smolders, E. and McGrath, S., Environ. Sci. Technol. 2004, 38, 3608.
- [6] Nolan, A.L., Zhang, H. and McLaughlin, M.J., J. Environ. Qual. 2005, 34, 496.
- [7] Cornu J.-Y., Denaix L., Environ. Chem., 2006, 3, 61-64.
- [8] Koster, M., Reijnders, L., van Oost, N.R. and Peijnenburg, W., Environ. Pollut. 2005, 133, 103.

Impact du changement d'occupation des sols sur la biodisponibilité des métaux dans les sols contaminés : cas des cultures annuelles vs cultures pérennes à vocation énergétique

Muhamad IQBAL¹, Léa BEAUMELLE¹, Claire CHENU², Isabelle LAMY¹

¹UR 251 PESSAC, INRA, Route de St-Cyr, 78026 Versailles cedex

²UMR 7618 BIOEMCO, AgroParisTech, Batiment EGER, 78850 Thiverval-Grignon
isabelle.lamy@versailles.inra.fr

Les sols contaminés par des métaux peuvent conserver leur vocation agricole à condition d'y cultiver des plantes non-alimentaires qui n'entraînent pas d'impact pour l'environnement. Parmi ces cultures celle du miscanthus, plante pérenne en C4, peut modifier l'écodynamique des métaux dans les sols mais de façon encore mal prédite. Sur un sol limono-argileux contaminé en Pb et Zn par dépôts atmosphériques et cultivé avec et sans miscanthus, nous avons d'une part quantifié les flux de carbone dans les fractions granulométriques du sol sous miscanthus, et d'autre part utilisé un couplage de méthodes physique et chimique d'approche de la disponibilité pour comparer l'offre du sol en métaux entre culture annuelle et culture pérenne. Les résultats montrent qu'une incorporation de carbone est quantifiable dans les fractions organiques grossières du sol quatre ans après la mise en place du miscanthus. Ceux concernant les métaux sont contrastés : pour Cd et Zn la disponibilité des métaux reste inchangée pour les sols sous culture annuelle ou pérenne, tandis que pour Pb et Cu elle diminue sous miscanthus, cette modification s'accompagnant d'un changement de localisation des métaux vers les fractions fines du sol. Ces résultats sont discutés au regard du fonctionnement et de l'écotoxicologie du sol.

Mots-clés : biodisponibilité, métaux, *Miscanthus*

Fractionnement et biodisponibilité du mercure dans les sols d'une friche industrielle

Frédéric GIMBERT, Benjamin PAUGET, Mickaël CANTIN et Annette de VAUFLEURY

UMR 6249 Chrono-Environnement, CNRS-Université de Franche-Comté, UsC INRA, place Leclerc, F-25030 Besançon Cedex
frederic.gimbert@univ-fcomte.fr

Introduction

Le mercure (Hg) est un métal non essentiel qui présente un risque écotoxicologique élevé pour les organismes aquatiques mais également terrestres au regard de ses capacités de biomagnification dans les réseaux trophiques. L'analyse directe des tissus d'organismes exposés au laboratoire ou sur le terrain peut fournir des indications sur la biodisponibilité du Hg. Si certains invertébrés du sol comme les vers de terre ont pu être utilisés dans ce sens (Zagury et al., 2006), aucune information n'est disponible vis-à-vis de la biodisponibilité du Hg pour des organismes soumis à de multiples sources d'exposition comme les escargots. De plus, malgré les connaissances avérées de l'importance de la spéciation du Hg sur sa mobilité et son devenir dans les milieux (Gabriel et Williamson, 2004), très peu d'études ont été conduites, en particulier en milieu terrestre, pour vérifier les relations entre le fractionnement du Hg dans les sols et son accumulation dans les organismes. La présente étude a donc pour objectifs d'évaluer la disponibilité environnementale du Hg dans différentes fractions d'un sol contaminé et aider à mieux comprendre sa biodisponibilité et son transfert aux escargots.

Matériel et méthodes

Organismes

Les escargots sub-adultes *Cantareus aspersus* (syn. *Helix aspersa*) âgés d'environ trois mois et pesant $5,0 \pm 0,5$ g ont été élevés au laboratoire en conditions contrôlées.

Site et modalités d'exposition

Le site d'étude est une friche industrielle du centre de la France (Auvergne) dont l'usine a fabriqué durant la première moitié du 20^{ème} siècle des produits destinés au traitement phytosanitaire (bouillies métalliques et arsénées) à partir du grillage de minerai d'arsenic. Cette exploitation ainsi que le stockage des produits finis sont à l'origine d'une pollution du site par divers éléments métalliques dont le Hg (Pauget et al., 2010).

Des microcosmes (Scheifler et al., 2003 ; Gimbert et al., 2008) (n=18) ont été disposés selon un gradient de contamination en Hg variant de 0,03 à 55 mg.kg⁻¹. Quinze escargots ont été introduits dans chaque microcosme et une partie de ces individus (n=2 ou 3) a été utilisée pour déterminer leur concentration interne en Hg après 28 jours d'exposition. A cette date des échantillons de sol, de végétation et d'humus ont également été prélevés.

Extraction et fractionnement du Hg

Les échantillons de sols prélevés dans chacun des microcosmes (n=18) ont été soumis à des traitements physiques et chimiques successifs choisis pour extraire sélectivement les principales phases contenant le Hg (Issaro et al. 2009) :

- chauffage à 180°C pendant 48 h : Hg élémentaire (Hg⁰),
- extraction CaCl₂ 1M : Hg soluble et échangeable,
- extraction NH₄OH 1M : Hg lié à la matière organique,
- Hg résiduel.

Une extraction à l'EDTA (0.05M) a également été utilisée pour estimer la disponibilité environnementale du Hg dans les échantillons de sols.

Traitement et analyse des échantillons

Les escargots prélevés ont été pesés et sacrifiés après 48h de jeûne, le pied et les viscères ont été séparés, congelés puis lyophilisés et enfin broyés. Les échantillons de sol, de végétation et d'humus ont été séchés à température ambiante puis broyés. Le Hg a été analysé dans chacune des matrices brutes par spectrométrie d'absorption atomique (AMA 254).

Résultats

Fractionnement et disponibilité du Hg dans les sols

Le taux de recouvrement moyen du Hg lors de la procédure d'extraction séquentielle est de 101 % (99-104 %). A part dans les sols témoins où la fraction résiduelle représente 80% de concentration totale, le Hg est toujours principalement (31-89 %) présent sous sa forme élémentaire Hg^0 . La part de Hg soluble-échangeable est relativement faible, variant de 1 à 18% selon le sol. Entre 2 et 26% du Hg sont liés à la matière organique. De manière générale, les fractions peuvent être classées de la façon suivante : $Hg^0 > Hg$ résiduel $> Hg$ -org $> Hg$ échangeable.

Le rendement des extractions à l'EDTA 0.05M varie de 10 à 51% de la concentration totale.

Biodisponibilité et transfert du Hg

La végétation et l'humus échantillonnés dans les microcosmes présentaient des concentrations en Hg mesurables et parfois même très élevées avec des valeurs variant de 0,01 à 0,66 $\mu g.g^{-1}$ et de 0,1 à 74 $\mu g.g^{-1}$ respectivement.

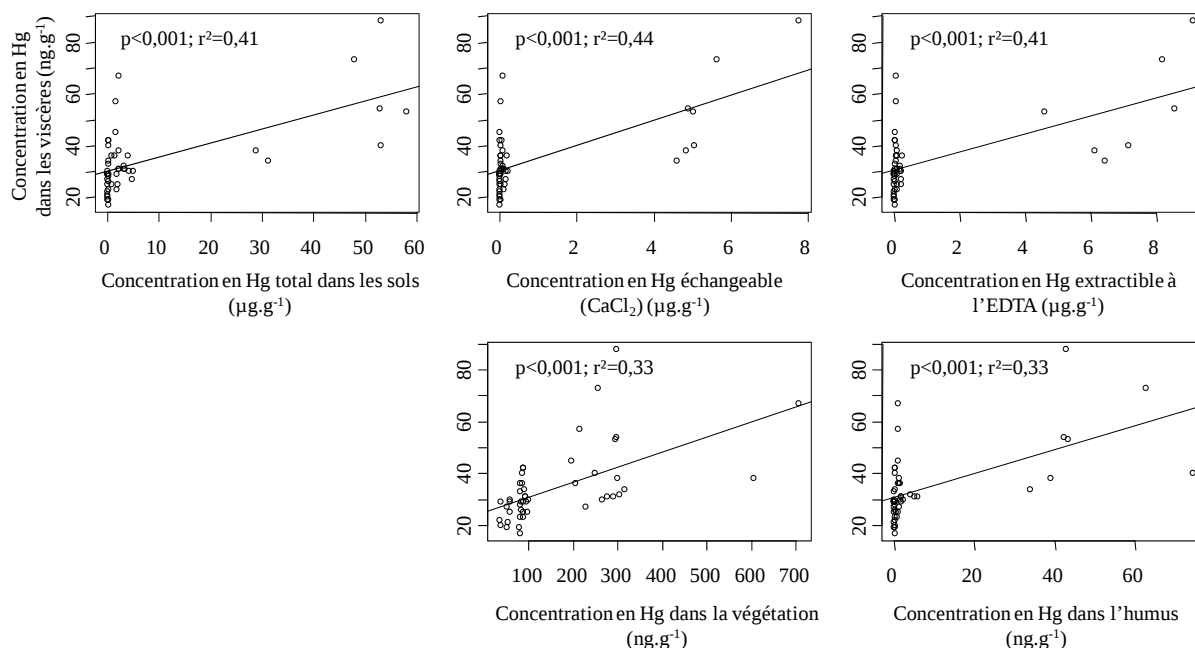


Figure 1. Concentrations en mercure (Hg) dans les viscères des escargots exposés sur le site en fonction de la concentration dans les sols (fractions totale, échangeable et extractible à l'EDTA), la végétation et l'humus.

L'analyse des concentrations internes en Hg dans le pied et les viscères des escargots encagés ont révélé une accumulation significative dans 13 des 18 microcosmes disposés sur le site mais avec des transferts relativement faibles. En effet, les concentrations internes (viscères) maximales mesurées après les 28 jours d'exposition ne dépassent pas 0,09 $\mu g.g^{-1}$, même sur les parcelles plus contaminées (Figure 1).

Néanmoins, des relations significatives entre concentrations en Hg dans les viscères des escargots et dans les différentes fractions du sol (totale, échangeable et extractible à l'EDTA) ou dans l'environnement (végétation et humus) ont pu être établies (Figure 1).

Discussion - Conclusion

Les approches chimiques de la contamination en Hg des sols ont permis de caractériser la pollution du site en soulignant son hétérogénéité, sa répartition au sein de fractions clés du sol et sa faible disponibilité environnementale. Ainsi, et de manière comparable aux données de la bibliographie (Issaro et al., 2009), seule une faible part de la contamination totale en Hg sera échangeable avec la solution du sol. Cette fraction explique à elle seule une part significative de la contamination de la végétation (14%) et des escargots (44%). L'utilisation de l'EDTA (extractant plus fort que le CaCl_2) ne permet pas d'améliorer la prédiction de la biodisponibilité du Hg, bien qu'il s'agisse un bon indicateur pour le Cd et le Pb chez *C. aspersus* (Pauget et al., soumis). La présence de Hg élémentaire (Hg^0) et de formes fortement liées au sol (matière organique, minéraux) explique probablement en partie de ces résultats.

En ce qui concerne les escargots, leur position à l'interface sol-plante-atmosphère nécessite également de considérer, en plus du transfert sol-escargot, le transfert plante-escargot. L'addition de la contamination de la végétation comme variable explicative du transfert du Hg permet d'augmenter la part expliquée de 12% (56%). La concentration en Hg de l'humus, très corrélée à celle de la végétation et surtout du sol, n'a pas été identifiée comme variable explicative significative. Enfin, afin d'évaluer le rôle des caractéristiques physico-chimiques des sols dans la modulation de la disponibilité et du transfert du Hg, des approches statistiques multivariées récemment développées pour le Cd, le Pb et le Zn (Pauget et al., 2011 et soumis) sont actuellement en cours d'application sur les présentes données.

Mots-clés : *Cantareus aspersus*, végétation, (bio)disponibilité, extractions, transfert.

Références

- Gabriel M.C. et Williamson D.G., 2004. Principal biogeochemical factors affecting the speciation and transport of mercury through the terrestrial environment. *Environmental Geochemistry and Health* 26: 421-434.
- Gimbert F., Mench M., Coeurdassier M., Badot P.M., de Vaufléury A., 2008. Kinetic and dynamic aspects of soil-plant-snail transfer of cadmium in the field. *Environmental Pollution* 152: 736-745.
- Issaro N., Abi-Ghanem C., Bermond A., 2009. Fractionation studies of mercury in soils and sediments: A review of the chemical reagents used for mercury extraction. *Analytica Chimica Acta* 631:1-12.
- Pauget B., Coeurdassier M., de Vaufléury A., 2010. Rapport final : Programme Bioindicateurs ADEME – Phase 2. Utilisation et intérêts des escargots et des micromammifères pour la bioindication de la qualité des sols. 153p.
- Pauget B., Gimbert F., Coeurdassier M., Scheifler R., de Vaufléury A., 2011. Use of chemical methods to assess Cd and Pb bioavailability to the snail *Cantareus aspersus*: a first attempt taking into account soil characteristics. *Journal of Hazardous Materials* 192: 1804-1811.
- Pauget B., Gimbert F., Coeurdassier M., Scheifler R., de Vaufléury A., soumis. Soil parameters as key factor to predict metal bioavailability to snails using chemical extractants. *Science of the Total Environment*.
- Scheifler, R., Ben Brahim, M., Gomot-de Vaufléury, A., Carnus, J.M., Badot, P.M., 2003. A field method using microcosms to evaluate transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from sewage sludge amended forest soils to *Helix aspersa* snails. *Environmental Pollution* 122: 343-350.
- Zagury G.J., Neculita C.M., Bastien C., Deschênes L., 2006. Mercury fractionation, bioavailability and ecotoxicity in highly contaminated soils from chlor-alkali plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25:1138-1147.

La bioindication active par l'escargot : un outil d'évaluation du risque de transfert de métaux intégrateur de leur biodisponibilité

Benjamin PAUGET, Michael COEURDASSIER, Frédéric GIMBERT,
Annette de VAUFLEURY

UMR 6249 Chrono-environnement, Université de Franche-Comté/CNRS Usc INRA
25030 Besançon Cedex
Benjamin.pauget@univ-fcomte.fr

Les indicateurs actuels de la qualité des sols, majoritairement basés sur des caractéristiques physico-chimiques (pollutions, état physique...), n'intègrent pas la composante biologique et donc le risque de transfert de contaminants vers les organismes et les réseaux trophiques. L'utilisation de bioindicateurs pour l'évaluation de la qualité des sols permet d'évaluer la biodisponibilité des contaminants (notamment des métaux) et ainsi évaluer ce risque de transfert. Les objectifs de cette étude sont :

- d'établir les concentrations internes de référence (CIRef) de contaminants métalliques (Cd, Pb, As, Cr, Cu et Zn) d'escargots *Cantareus aspersus* placés en sentinelles durant 28 jours sur des sites français non contaminés considérés dans le cadre du programme Bioindicateur 2*. Ces CIRef sont ensuite utilisées pour discriminer les sites présentant un transfert de métaux du sol et de la végétation aux escargots,
- de mettre en place d'un outil d'Evaluation du Risque de Transfert de Métaux (ERITME) du sol permettant de hiérarchiser les sites afin de dégager des priorités de gestion considérant les paramètres physico-chimiques et biologiques qui conditionnent la biodisponibilité des éléments trace métalliques (ETM) du sol pour les organismes.

Les CIRef ont été établies sur la base des concentrations dans les viscères des escargots exposés aux sites non contaminés en métaux, déterminés grâce aux valeurs des programmes ASPITET (gamme des valeurs ordinaires dans les sols Français et valeurs seuil d'investigation) et RMQS (vibrisse des concentrations en métaux mesurés dans les sols). Si la valeur de la médiane des concentrations en métaux dans les viscères des individus exposés est supérieure à la CIRef (2,2 mg kg⁻¹ pour le Cd, 12,9 mg kg⁻¹ pour le Pb, 0,2 mg kg⁻¹ pour l'As, 2 mg kg⁻¹ pour le Cr, 184 mg kg⁻¹ pour le Cu et 1490 mg kg⁻¹ pour le Zn), le site sera considéré comme présentant un risque de transfert de métal(aux) supérieur à la normale. L'utilisation des CIRef nous a permis de discriminer les sites contaminés dans la majorité des cas. Elles révèlent également des transferts de métaux inattendus sur des sites témoins et inversement sur des sites contaminés où aucun transfert n'est détecté (Figure 1). L'utilisation d'équations multivariées a permis d'identifier le pH, le taux de matière organique ainsi que la CEC comme étant des paramètres influençant l'accumulation de métaux. Ces résultats soulignent l'importance des paramètres du sol modulant la biodisponibilité des métaux pour l'escargot, et la difficulté de trouver de vrais sites témoins qui ne présentent aucun transfert de métaux.

La démarche ERITME, basée sur les CIRef, permet de mettre en évidence le risque de transfert de six métaux d'un sol pour les escargots. Cette méthode définit des priorités de gestion basées non pas sur la concentration totale en métaux du sol mais sur une évaluation biologique du risque tenant compte de la biodisponibilité des métaux. La hiérarchisation des modalités est basée sur leur quotient d'accumulation total (QAT : $\sum QA / \text{nombre de métaux analysés}$ avec $QA = [C_{\text{escargot}}] / [CIRef]$). Ce quotient représente la somme des risques de transfert de chaque métal (Cd, Pb, As, Cr, Cu et Zn) pour l'escargot divisé par le nombre de métaux afin d'obtenir une note représentative du risque de transfert global de métaux d'un

site. Le classement des QAT met l'accent sur le risque des sols des sites industriels principalement (Auzon avec un QAT de 1,74 et Metaleurop avec un QAT de 1,73). Sur ces sites, des transferts d'As (Auzon) et de Cd et de Pb (Metaleurop) sont identifiés, mettant ces sols en tête de liste des priorités de gestion. Cette démarche nous a permis de mettre en évidence le risque de transfert de Pb et d'As sur des modalités forestières peu ou non contaminées par ces métaux sur lesquelles des QAT de 1,485 et 1,010 (F08 et F63, respectivement) ont été calculés. L'identification d'un risque de transfert de métaux sur des modalités non contaminées, souligne le besoin d'utiliser des outils biologiques intégrant la biodisponibilité des métaux lors d'études de caractérisation du risque.

* <http://www2.ademe.fr/servlet/KBaseShow?sort=-1&cid=96&m=3&catid=15113>

Mots-clés : *Cantareus aspersus*, risque, transfert, métaux, CIREf.

Concentration en Cd dans les viscères

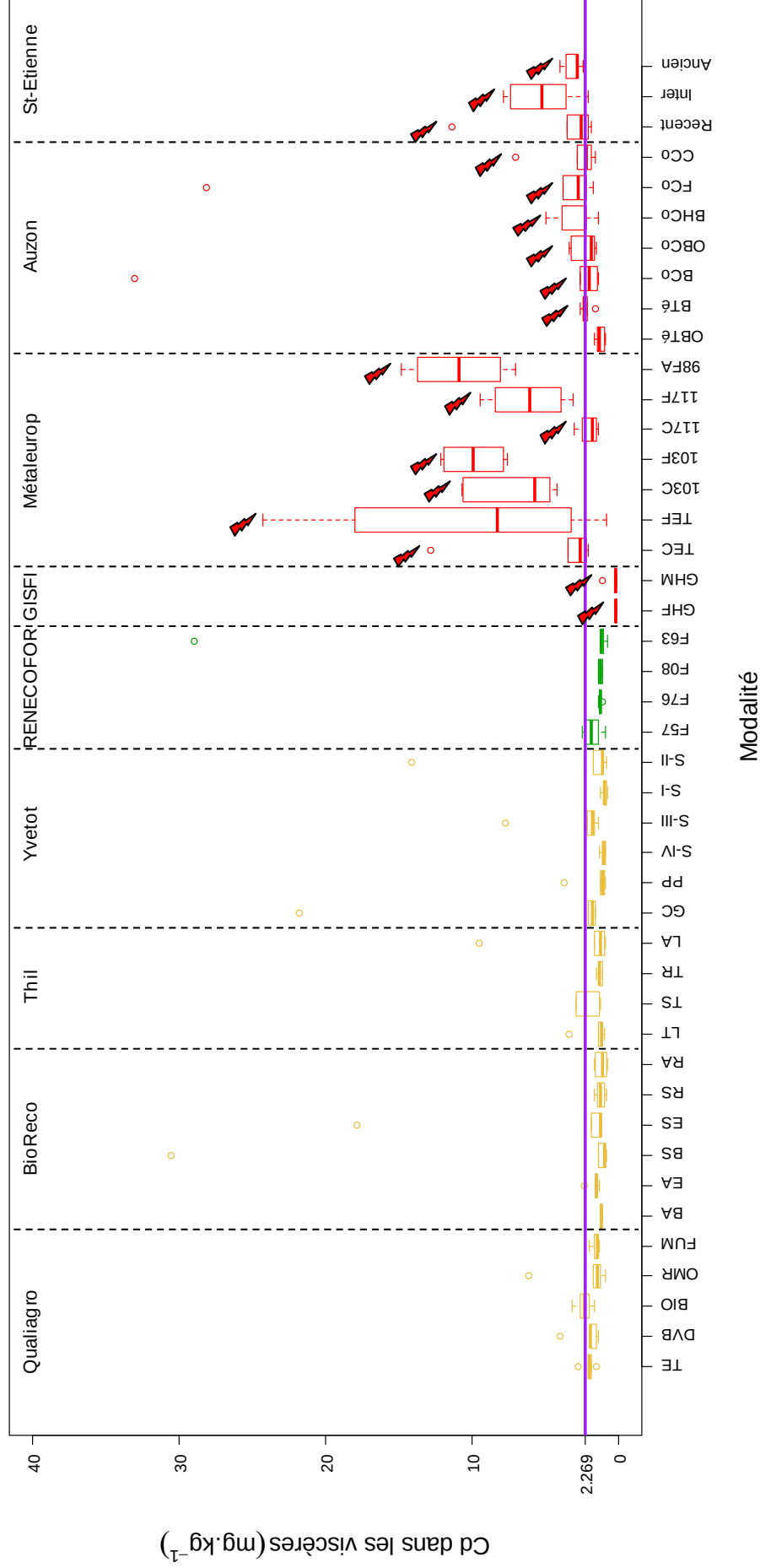


Figure 1. Identification des sites présentant un transfert de Cd par la CRef. Chaque boxplot représente les concentrations en Cd dans les viscères des individus exposés aux modalités. La ligne violette représente la CRef en Cd dans les viscères des escargots exposés aux modalités non contaminées. L'éclair identifie un sol dont le sol est contaminé en Cd. Boxplots jaunes : sites agricoles, boxplots verts : sites forestiers, boxplots rouge : sites industriels.

Quel impact à long terme des antibiotiques persistants apportés au sol lors de l'épandage de lisiers?

Christian MOUGIN¹, Angélique IGEL-EGALON¹, Nathalie CHEVIRON¹, Christelle MARRAULD¹, Cédric REPINCAÏ¹, Mickaël HEDDE¹,
Guillermina HERNANDEZ-RAQUET²

¹UR251 Physicochimie et Ecotoxicologie des Sols d'Agrosystèmes Contaminés
INRA, Route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles Cedex

²UMR0792, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés
INRA-INSA, 135 avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse Cedex 4
christian.mougin@versailles.inra.fr

Introduction

Les produits résiduels organiques issus des élevages, notamment porcins, constituent une source de contamination des sols par des composés en faible dose tels que les antibiotiques, les hormones ou certains métaux utilisés comme additifs alimentaires. La persistance de ces composés varie de quelques jours à plusieurs années dans les sols. De fait, ils pourraient altérer certains cycles microbiens et contribuer à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques dans les communautés bactériennes. (Kemper, 2008). Nous avons étudié le devenir et les effets potentiels de la ciprofloxacine, un antibiotique à large spectre de la famille des fluoroquinolones très utilisé en médecine vétérinaire et humaine, dans des modèles d'écosystèmes terrestres (Igel-Egalon et al., 2011 ; Mougin et al., soumis). Deux scénarios de contamination ont été considérés : apport direct de l'antibiotique ou via un lisier de porc dopé.

Matériels et méthodes

Nos expérimentations ont été menées en cosmes de 1 à 2 kg de sol limono-argileux de Versailles (la Cage), supplémenté par 25 mL/kg (30 T MS/ha) de lisier de porc provenant d'un élevage biologique. Le lisier a été dopé par de la ciprofloxacine pour aboutir à la concentration de 25 et 250 µg/kg de sol sec pour l'expérience devenir, et 25 et 250 ng/kg de sol sec pour l'expérience impact. Les cosmes ont été incubés à 20°C.

Le devenir de la ciprofloxacine a été suivi sur deux périodes de 84 jours par la mesure du ¹⁴-CO₂ dégagé, et par la détermination des quantités d'antibiotiques extractibles et non-extractibles dans les sols après 28, 56 et 84 jours d'incubation. Le transfert vers le blé ou les eaux a été également évalué après 56 jours et 70 jours. Deux vers de terre, *Aporrectodea sp.*, ont été ajoutés à chaque cosme à l'issue de la première période d'incubation.

Les impacts de la ciprofloxacine sur le fonctionnement du sol ont été évalués pendant 4 semaines après l'application du lisier par la mesure d'activités enzymatiques (déshydrogénase, β-glucosidase, phosphatase acide, laccase) et le test de litter-bag. Les biomasses bactériennes et fongiques ont été quantifiées par la mesure des ADNs génomiques par qPCR.

Résultats et discussion

Devenir de la ciprofloxacine

Hormis un faible dégagement en début d'incubation, aucune minéralisation de la ciprofloxacine marquée n'a pu être mesurée dans le sol pendant les 84 premiers jours d'incubation. La fraction extractible de l'antibiotique ou de ses produits de transformation n'a pu être quantifiée aux différents temps de mesure.

Nos résultats ont montré que l'antibiotique était intégralement et rapidement stabilisé dans les sols sous la forme de résidus non extractibles. Une très faible part des résidus (0,02% de la radioactivité initiale) peut néanmoins être transférée vers le blé durant 28 jours de croissance. La radioactivité mesurée dans les eaux de lixiviation des cosmes à l'issue d'un

apport d'eau mimant un épisode pluvieux de 20 mm permet de calculer des concentrations comprises entre 0,16 et 0,46 µg/L d'antibiotique dans les eaux.

L'ajout de vers de terre conduit à une remobilisation des résidus conduisant à une très faible minéralisation (Figure 1). Dans ces conditions, le temps de demi-vie de la ciprofloxacine est estimé à 17 ans.

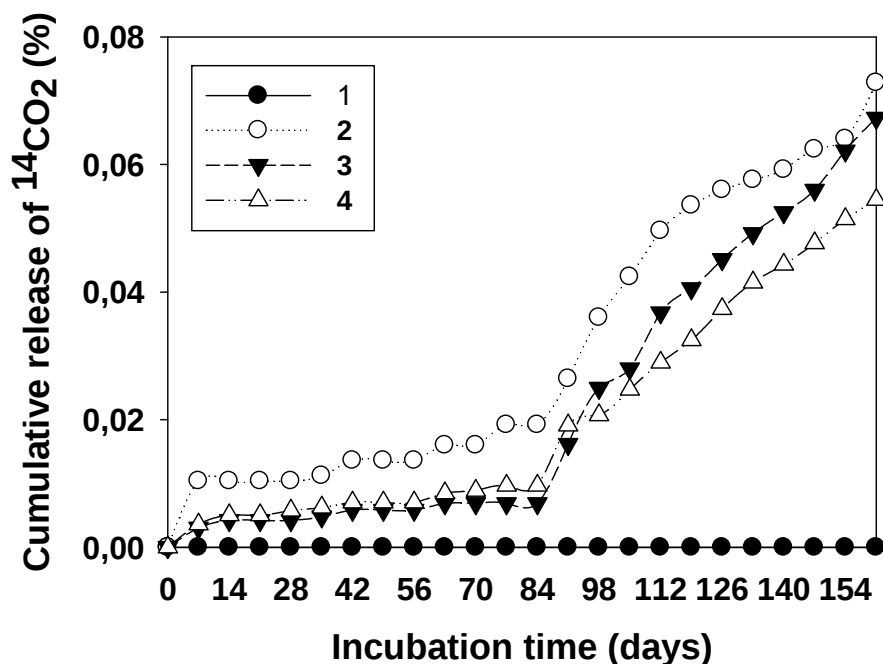


Figure 1. Minéralisation de la ciprofloxacine radiomarquée dans les sols. L'ajout de 2 individus d'*Aporrectodea* sp. a été effectué après 84 jours d'incubation. 1 : cosme sans apport d'antibiotique radiomarqué ; 2 : cosme avec ajout de lisier dopé par l'antibiotique à 25 µg/kg ; 3 : cosme avec ajout de lisier dopé par l'antibiotique à 250 µg/kg ; 4 : cosme avec apport direct d'antibiotique à 250 µg/kg.

Cette persistance de l'antibiotique dans le sol ne semble pas due à une inhibition de l'activité microbiologique (voir ci-dessous). La germination du blé n'a pas été altérée et les plantules ont présenté des biomasses équivalentes dans les différentes conditions de l'essai. De la même façon, aucune mortalité des vers n'a été observée. Cette stabilisation de l'antibiotique semble liée à de très fortes interactions de la molécule avec la montmorillonite, argile majeure des sols de la parcelle de la Cage.

Impact de la ciprofloxacine sur les microorganismes

Parmi les activités enzymatiques, la ciprofloxacine appliquée à la dose la plus élevée conduit à une diminution de l'activité déshydrogénase du sol par rapport au témoin ne recevant pas d'antibiotique sur une période de 28 jours. Le test du litter-bag ne montre pas d'effet inhibiteur associé à la présence de l'antibiotique dans le sol. Les biomasses bactériennes déterminées par Q-PCR sont augmentées en présence de l'antibiotique à la plus forte dose, alors que les biomasses fongiques ne sont pas modifiées.

Nos indicateurs microbiens sont globalement peu sensibles à la présence de la ciprofloxacine dans le sol.

Conclusion et perspectives

En conclusion, la ciprofloxacine présente un risque réel d'accumulation dans le sol. La connaissance du rôle joué par les vers de terre dans le devenir de l'antibiotique (répartition, biotransformation directe ou indirecte) reste un enjeu fort pour l'évaluation du risque à plus long terme.

Une étude de la transformation de la CIP par le champignon filamenteux *Trametes versicolor* va être entreprise afin d'identifier d'éventuels produits de transformation.

Nous n'avons pas identifié d'effets négatifs au niveau fonctionnel sur les organismes du sol. Notre approche doit être complétée par l'étude des impacts de l'antibiotique sur la structure des communautés microbiennes et de groupes fonctionnels spécifiques.

Mots-clés : médicaments vétérinaires, lisier, micro-organismes, sol, stabilisation

Références

- Igel-Egalon A., Cheviron N., Hedde M., Hernandez-Raquet G. and Mougin C. 2011. Impact of antibiotics from pig slurry on soil microbial communities, including the basidiomycete *Trametes versicolor*. Environ. Toxicol. (en ligne). DOI: 10.1002/tox.20623.
- Kemper N. 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecol Indic 8:1-13
- Mougin C., Cheviron N., Repincay C., Hedde M. and Hernandez-Raquet G. Fate of ciprofloxacin in terrestrial model ecosystems amended with contaminated pig slurry. Soumis à Env Chem Letters



4^{ème} Séminaire d'Ecotoxicologie
7-9 novembre 2011 – St Lager

Session 2

Altérations physiologiques et comportementales

Effets non-intentionnels des toxines de *Bacillus thuringiensis*

Marcel AMICHOT, Armel GALLET, David PAURON

UMR 1301 IBSV, INRA PACA, 400 Route des Chappes, 06903 Sophia-Antipolis
marcel.amichot@sophia.inra.fr

Introduction

Les bio-insecticides sont appelés à supplanter les pesticides chimiques et à être de plus en plus utilisés pour lutter contre les ravageurs en accord avec le Grenelle de l'Environnement et le plan Ecophyto 2018 (réduction de 50% de l'utilisation des pesticides chimiques d'ici à 2018). Parmi ces bioinsecticides l'utilisation des toxines de *Bacillus thuringiensis* (Bt) contre de nombreux insectes (noctuelles tordeuses, piérides du chou, teignes, moustiques etc...) augmente depuis plusieurs années (90% des bio-insecticides vendus). Bt est une bactérie du sol qui forme pendant la sporulation des corps d'inclusion cristallins contenant des toxines nommées Cry. La spécificité d'action de chaque toxine est restreinte car elle n'est létale que pour un nombre limité d'espèces d'insectes. Chaque toxine respecte donc, en terme de toxicité aigüe, l'équilibre de l'écosystème. Cependant, leurs effets à long terme sur la faune auxiliaire (en particulier l'abeille) ou sur l'homme, causés par une exposition chronique, sont encore peu ou pas connus.

Des études récentes ont montré que, quel que soit leur mode d'utilisation, Bt et/ou ses toxines se retrouvent dans l'environnement (Rosi-Marshall et al., 2007; Tank et al., 2010; Tilquin et al., 2008) à des doses supérieures à la normale. Des études réalisées en laboratoire montrent également que la présence de toxine Cry dans l'eau d'élevage du poisson zèbre est génotoxique pour cette espèce (Grisolia et al., 2009). Par ailleurs, Bt a été identifié dans des infections ou des surinfections pulmonaires chez la souris, ainsi que dans des infections nosocomiales chez l'homme (Barfod et al., 2010; Ghelardi et al., 2007). Il convient donc de s'interroger sur les risques éventuels associés à une utilisation extensive des toxines de Bt en agriculture biologique. Nous nous proposons donc d'identifier et de caractériser les effets non intentionnels de ces bio-insecticides, afin d'évaluer les risques à long terme. Notre projet comprend deux grands axes:

- 1: Identification des fonctions physiologiques affectées par les toxines et conséquences écotoxicologiques.
- 2: Compréhension des mécanismes d'actions sur les organes et fonctions physiologiques cibles.

La communication portera uniquement sur le premier axe.

Identification des effets et des toxines responsables

L'identification des toxines néfastes pour l'environnement ainsi que la caractérisation de leurs effets nécessitent la mise en place de cribles. Pour cela, nous avons choisi comme modèle la drosophile. En effet, celle-ci n'est pas sensible à la toxicité aigüe des toxines Bt. Ensuite et surtout, la drosophile est un excellent modèle génétique qui nous permettra de disséquer les mécanismes cellulaires et moléculaires liés aux effets observés. Nous disposons de plusieurs souches de Bt. produisant différentes combinaisons de toxines et nous sommes capables de produire individuellement puis de purifier les principales toxines produites par ces spores (qui sont aussi produites par plusieurs OGM). Deux types de cribles sont utilisés pour l'identification des toxines ayant des effets :

1- un crible physiologique

Le principe de ce crible est de suivre les principales fonctions physiologiques dont un dysfonctionnement refléterait une activité inattendue des toxines. Nous pouvons surveiller de nombreux marqueurs (enzymatiques, génétiques, hormonaux...) et effectuer de nombreuses mesures (taille, poids, durée des différentes phases du cycle de vie, nombres d'œufs pondus,...) reflétant la fécondité, la fertilité, la longévité, la croissance, la réponse aux stress etc...

2- un crible phénotypique.

Chez la drosophile, chaque défaut observé peut être lié à un processus morphogénétique et permet ainsi l'identification des gènes impliqués. Nous concentrons nos observations sur des critères facilement observables, tels que la morphologie des appendices (ailes, pattes, altères, antennes) et des organes chez l'adulte, et par exemple, la structure cuticulaire chez la larve.

Résultats

Crible physiologique :

A ce jour, nous avons réalisé deux types d'analyses : mesures d'activités d'enzymes de métabolisation des xénobiotiques et analyse de l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire et le stress oxydant.

Les mesures d'activités d'enzymes de métabolisation des xénobiotiques (ECOD, GST) ont montré que ces activités pouvaient être modulées par certaines souches de Bt. Il en est de même pour l'expression de certains gènes de l'immunité et du stress oxydant.

Crible morphologique

Une proportion de 0,5 à 1 % des ailes d'adultes issus de larves nourries sur un milieu contaminé présente des défauts morphogénétiques par ailleurs bien connus des biologistes du développement. Nous avons entre autres observé des malformations spectaculaires comme l'apparition d'une septième patte (figure 1a), la duplication d'une antenne et des malformations de l'œil.

Evaluation de la nocivité des effets observés

Cette évaluation nécessite de prendre en compte un niveau d'organisation supérieur, nous avons donc pris en compte l'individu dans sa globalité.

Nous avons réalisé des expériences de stress sur stress en testant la tolérance d'insectes préalablement traités par les bio-insecticides à la deltaméthrine. La procédure commence avec une contamination via la nourriture durant 3 jours des drosophiles par Bt (trois doses différentes sont utilisées). Les drosophiles sont alors collectées et testées pour leur tolérance à la deltaméthrine (contact tarsal).

Résultats

La contamination par Bt des drosophiles peut provoquer des variations relativement importantes dans la tolérance à la deltaméthrine. En effet, nous avons calculé des ratios supérieurs à 5 entre les DL50 des populations traitées. Pour une souche de Bt donnée, la variation de la DL50 est corrélée à la dose de Bt mais la corrélation est positive ou négative selon la souche de Bt utilisée, donc selon les toxines produites par cette souche (figure 1b).

En parallèle, nous avons testé la longévité de drosophiles traitées par différentes souches de Bt. Nous avons relevé une longévité plus importante chez des drosophiles présentant une augmentation de l'expression des gènes du stress oxydant.

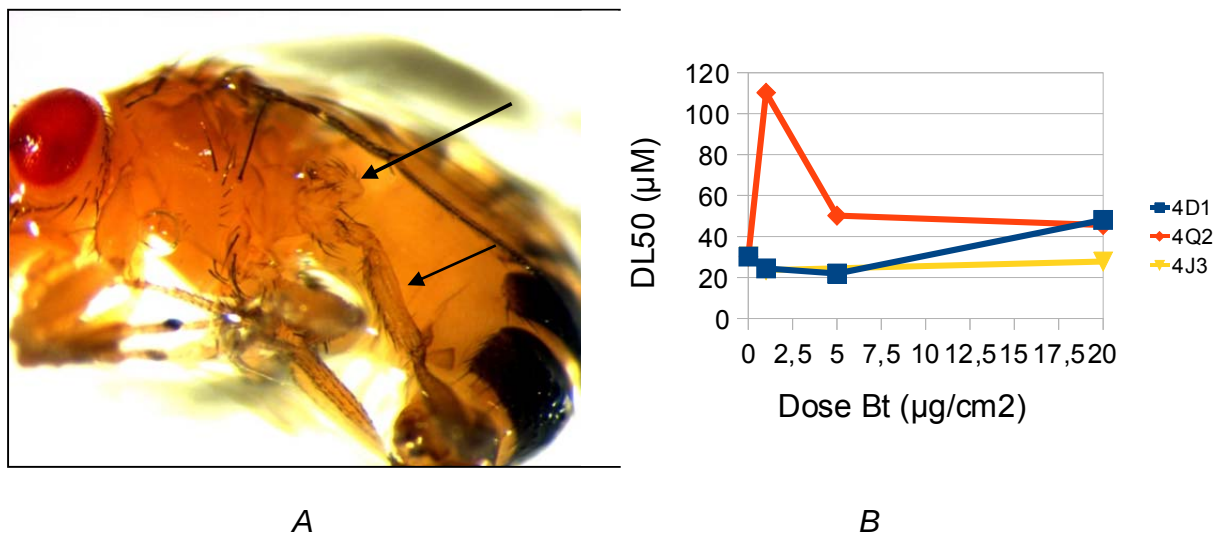


Figure 1. A : la flèche double pointe la septième patte atrophiée, la flèche simple une patte normale. **B :** DL50 pour la deltaméthrine de drosophiles pré-traitées par trois souches de Bt. 4Q2 est vide de toxines, les autres souches produisent différentes combinaisons de toxines.

Ces travaux montrent que Bt a des effets sur différents paramètres biologiques de la drosophile selon les souches testées. La communication donnera le détail des résultats de ces travaux et l'interprétation que nous en faisons.

Mots clés : bio-insecticide, toxine, *Bacillus thuringiensis*, effets non-intentionnels

Références

- Barfod, K. K., Poulsen, S. S., Hammer, M., and Larsen, S. T. (2010). Sub-chronic lung inflammation after airway exposures to *Bacillus thuringiensis* biopesticides in mice. *BMC Microbiol* 10 , 233.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Fiscarelli, E., and Senesi, S. (2007). *Bacillus thuringiensis* pulmonary infection: critical role for bacterial membrane-damaging toxins and host neutrophils. *Microbes Infect* 9 , 591-598.
- Grisolia, C. K., Oliveira, R., Domingues, I., Oliveira-Filho, E. C., Monerat, R. G., and Soares, A. M. (2009). Genotoxic evaluation of different delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis* on zebrafish adults and development in early life stages. *Mutat Res* 672 , 119-123.
- Rosi-Marshall, E. J., Tank, J. L., Royer, T. V., Whiles, M. R., Evans-White, M., Chambers, C., Griffiths, N. A., Pokelsek, J., and Stephen, M. L. (2007). Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 , 16204-16208.
- Tank, J. L., Rosi-Marshall, E. J., Royer, T. V., Whiles, M. R., Griffiths, N. A., Frauendorf, T. C., and Treering, D. J. (2010). Occurrence of maize detritus and a transgenic insecticidal protein (Cry1Ab) within the stream network of an agricultural landscape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 , 17645-17650.
- Tilquin, M., Paris, M., Reynaud, S., Despres, L., Ravanel, P., Geremia, R. A., and Gury, J. (2008). Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* Subsp. *israelensis* (Bti) in mosquito natural habitats. *PLoS One* 3 , e3432.

Mesures des effets non intentionnels du thiamethoxam chez l'abeille domestique par l'enregistrement automatique des comportements

Axel DECOURTYE¹, Maxime BEGUIN², Mickaël HENRY³, Jean-François ODOUX⁴,
Fabrice REQUIER⁴, François BRUN⁵, Pascal JOURDAN², Monique GAUTHIER⁶,
James DEVILLERS⁷, Pierrick AUPINEL⁴

¹ACTA, UMT PrADE, INRA - Abeilles et environnement, Site AgroParc, F-84914 Avignon Cedex 9

²ADAPI, UMT PrADE, INRA - Abeilles et environnement, Site AgroParc, F-84914 Avignon cedex 9

³INRA, UMT PrADE - UR Abeilles et environnement, Site AgroParc, F-84914 Avignon cedex 9

⁴INRA, Unité expérimentale d'entomologie Le Magneraud, F-17700 Surgères

⁵ACTA, UMR 1248 AGIR, B.P. 52627, F-31326 Castanet Tolosan cedex

⁶CNRS, CRCA, Université Paul Sabatier, 118 Route de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex

⁷CTIS, 3 chemin de la gravière, F-69140 Rillieux La Pape

axel.decourtye@acta.asso.fr

Introduction

L'identification des abeilles est indispensable à l'amélioration de l'état des connaissances dans de nombreux domaines scientifiques, comme l'éthologie, l'écologie ou l'écotoxicologie. Mais l'acquisition d'un outil de suivi des déplacements des individus se confronte aux contraintes techniques pour identifier les abeilles : vol rapide (environ 5 m.s⁻¹), large aire de prospection (en moyenne 3000 ha), faible poids (environ 100 mg), petite taille (10-12 mm de long) et plusieurs milliers d'individus (Streit et al., 2003). Le récent problème de la dépopulation des ruches, qui préoccupe la filière apicole dans de nombreux pays, en est la concrète illustration. Ce symptôme observé dans de nombreux pays est mis en relation avec différentes pressions selon les situations et selon les auteurs : des maladies, des situations nutritionnelles ou des stress chimiques. Concernant le sujet plus précis de l'incidence des traitements des semences de plantes mellifères avec des insecticides néonicotinoïdes systémiques, l'amélioration des connaissances sur les relations de cause à effet nécessite d'acquérir des techniques *in situ* de surveillance automatique des déplacements d'individus marqués (Desneux et al., 2007). Les méthodes classiques d'investigation des effets comportementaux des insecticides sur le butinage sont trop limitées par la plage de temps d'observation (Bortolotti et al., 2003 ; Colin et al., 2004 ; Yang et al., 2008), nous empêchant ainsi de couvrir tout le spectre d'activité quotidien des butineuses (parfois de l'aube au crépuscule) et surtout ne permettant pas de retracer l'historique complète de l'individu de sa première à sa dernière sortie. Pour corriger ces inconvénients nous avons développé des méthodes de suivi des individus par les puces RFID (Decourtye et al., 2011). Ce développement méthodologique a été capitalisé pour étudier l'impact de l'insecticide systémique thiaméthoxam, substance active du Cruiser, une spécialité commerciale utilisée sur les semences de maïs et de colza.

Matériels et méthodes

Marquage des abeilles par transpondeur

Les ouvrières ont été capturées en conditions naturelles puis emportées au laboratoire. Une fois immobilisée, chaque abeille a été équipée avec un transpondeur RFID (1,6 × 1 × 3 mm, 3 mg, 13,56 MHz) collé sur son thorax.

Enregistrements des données

Le dispositif de lecture RFID comporte deux rangées de 5 lecteurs positionnés entre le corps de la ruche et sa planche d'envol. Les données sont transférées à un ordinateur et enregistrées sous forme de fichiers (.txt). Les enregistrements RFID ont débuté immédiatement après le relâché des abeilles marquées et ont été le plus souvent prolongés jusqu'au moment où les lecteurs ne détectaient plus de passages d'abeilles, considéré comme le témoin de la mort de l'ensemble des ouvrières marquées.

Impact du thiaméthoxam sur les traits comportementaux

Dans cette première étape du travail, nos objectifs étaient à la fois d'éprouver pour la première fois en conditions réelles la technique d'enregistrement automatique par RFID dans une approche écotoxicologique *in situ*, mais aussi d'acquérir des connaissances sur les effets non intentionnels d'une exposition aiguë et orale de l'insecticide thiaméthoxam sur les traits d'histoire de vie des ouvrières.

Les ouvrières marquées étaient âgées de vingt jours. Après le marquage et un jeûne d'environ 2 heures, nous avons administré un volume défini de solution de saccharose (50 % m/m) contaminée au thiaméthoxam (98 % de pureté ; Cluzeau Info Labo) ou non contaminée (contrôle). Trois doses ont été testées : 2, 1 et 0,5 ng/abeille, soit respectivement DL50/2,5, DL50/5 et DL50/10. Après l'ingestion de la totalité du sirop de traitement, les abeilles ont été soumises à un deuxième jeûne d'environ une heure, avant leur relâche dans la ruche équipée du dispositif RFID, c'est-à-dire après 6 à 7 heures de captivité. 60-80 ouvrières ont été relâchées par modalité. Nous avons ainsi enregistré en continu les comportements des abeilles durant 23 jours.

Impact du thiaméthoxam sur le vol de retour des butineuses

Dans cette deuxième étape, nous avons analysé l'impact de l'administration orale de 1 ng/abeille du thiaméthoxam sur les capacités des butineuses à retourner à leur ruche. Deux expérimentations ont été effectuées, l'une évaluant si l'effet du thiaméthoxam sur le vol de retour des butineuses se gradue selon la distance à parcourir (individus relâchés aléatoirement en 6 points distants de 1000 m autour de la ruche), l'autre évaluant si l'effet du thiaméthoxam sur le vol de retour se gradue selon l'expérience du territoire que la butineuse possède. Pour cette deuxième expérimentation, les butineuses marquées ont été relâchées i) sur un site de butinage qu'elles connaissent ("butineuses expérimentées") ou ii) sur un site aléatoire ("butineuses naïves"). Les butineuses expérimentées correspondaient à des individus portant des pelotes de pollen de phacélie et relâchées sur cette plante à 1000 m de la ruche.

Traitements des données

Sous R (Version 2.11.0), nous avons analysé les variables comportementales obtenus pour les différentes modalités de traitement par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis ou par un test binomial.

Résultats

Impact du thiaméthoxam sur les traits comportementaux

Nous observons une diminution significative du nombre de sorties enregistrées par abeille et par jour pour les traitements au thiaméthoxam à 1 et à 2 ng par rapport aux données obtenues chez les abeilles non traitées (Figure 1).

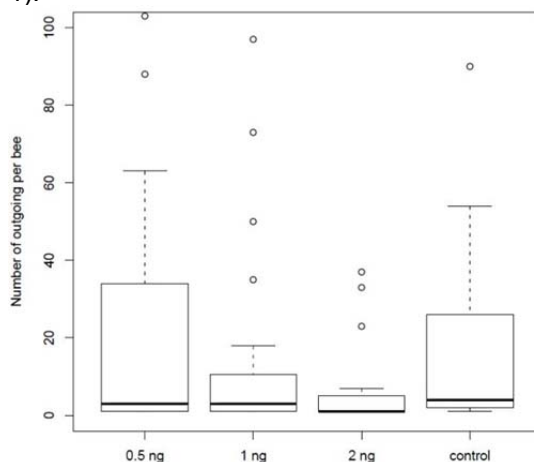


Figure 1. Nombre de sorties par abeille et par jour.

Impact du thiaméthoxam sur le vol de retour des butineuses

La proportion de butineuses traitées avec 1 ng de thiaméthoxam ne retournant pas à la ruche augmente avec la distance (95 %, 96 % et 77 % contre 96 %, 99 %, 85 % chez les contrôles). Les butineuses traitées retrouvant leur ruche ont un temps de retour significativement supérieur (par exemple pour 1000 m : 42 ± 51 s contre 22 ± 33 s chez les contrôles ; Figure 2).

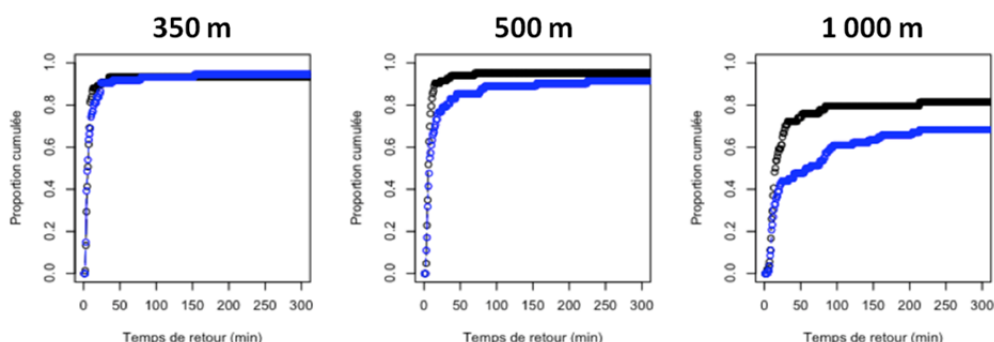


Figure 2. Courbes de proportion cumulée en fonction du temps de retour pour les abeilles contrôles (en noir) et traitées (en bleu), relâchées respectivement à 350 m, 500 m et 1000 m de la ruche.

L'effet négatif du thiaméthoxam sur la proportion de butineuses retournant à leur ruche et sur leur temps de retour se confirme dans la deuxième expérimentation. Par ailleurs, l'effet augmente lorsque les butineuses sont naïves par rapport au site de relâcher (Figure 3 ; Henry et al., soumis).

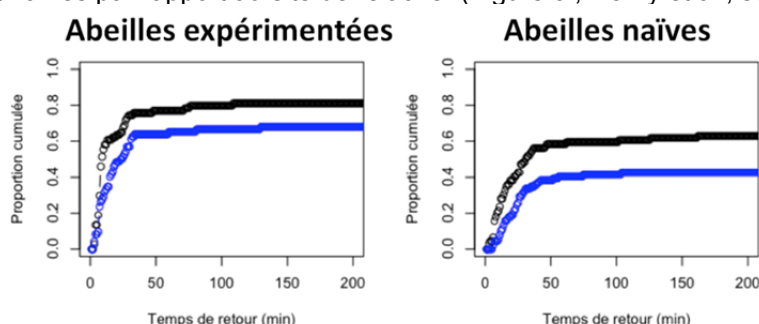


Figure 3. Courbes de proportion cumulée en fonction du temps de retour pour les abeilles expérimentées ou naïves (contrôles en noir, traitées en bleu).

Mots-clés : abeille domestique, pesticides, puces RFID, butinage, vol de retour.

Références

- Bortolotti L., Montanari R., Marcelino J. et al. 2003. Effect of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bull. Insect.* 56:63-67.
- Colin M.E., Bonmatin J.M., Moineau I., et al. 2004. A Method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47:387-395.
- Decourtye A., Devillers J., Aupinel P., Brun F., Bagnis C., Fourrier J., Gauthier M. 2011. Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. *Ecotoxicology* 20:429-437.
- Desneux N., Decourtye A., Delpuech J.M. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology* 52:81-106.
- Streit S., Bock F., Pirk C.W.W., Tautz J., 2003. Automatic life-long monitoring of individual insect behaviour now possible. *Zool.* 106:169-171.
- Yang E.C., Chuang Y.C., Chen Y.L., et al. 2008. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 101(6):1743-1748.

Effets des insecticides sur le développement des glandes hypopharyngiennes chez l'abeille domestique adulte après une exposition au stade larvaire

Pierrick AUPINEL¹, Dominique FORTINI¹, Axel DECOURTYE², James DEVILLERS³

¹INRA, UE 1255, UE Entomologie, F-17700 Surgères

²ACTA, UMT PrADE, INRA - UMR 406 Abeilles et environnement, Site AgroParc, 84914 Avignon cedex 9

³CTIS, 3 Chemin de la gravière, 69140 Rillieux La Pape
Pierrick.Aupinel@magneraud.inra.fr

Introduction

L'évaluation des risques sur abeille domestique liés à l'utilisation des produits phytosanitaires s'intéresse principalement aux effets létaux des matières actives sur larves et sur adultes, et non aux effets sublétaux. Cet état de fait résulte d'une part d'une large diversité de ces effets, et d'autre part d'une difficulté générale à relier ce type d'effet à une notion de risque vital pour la colonie. Cette ambiguïté est levée dès lors qu'il s'agit d'un effet qui touche directement une notion vitale, telle que l'alimentation des larves. On comprend ainsi que toute altération de cette fonction soit de nature à générer un risque réel pour la survie de la colonie. Les glandes hypopharyngiennes (GHP), associées aux glandes mandibulaires, jouent un rôle prédominant dans la sécrétion de la gelée royale et donc dans l'alimentation des larves. Cet organe, situé dans la tête, occupe une large partie du volume céphalique lorsqu'il atteint son développement maximum. Le développement des GHP dépend essentiellement de l'âge des ouvrières et de leur alimentation. Il a été montré que la taille et le fonctionnement des acini qui constituent ces glandes augmentent à partir de l'âge de 3 jours (Huang et Otis, 1989, Deseyn et Billen, 2005) et conserve un niveau d'activité maximal variable selon que les ouvrières sont maintenues en présence de couvain ou non. La teneur en protéines des pollens consommés par les ouvrières (Hrassnigg et Crailsheim, 1998, Pernal et Currie, 2000) constitue également un facteur déterminant pour le développement des GHP. Parmi les facteurs susceptibles d'affecter le développement des GHP, les inhibiteurs de protéase et notamment le SBTI (Inhibiteur de trypsine extrait du soja) connu pour ses effets insecticides a fait l'objet d'un certain nombre d'études sur l'abeille (Sagili et al, 2005, Sagili et Pankiw, 2007). Ces travaux révèlent des effets sur le développement des GHP à des doses faibles (1 % du pollen ingéré) et vraisemblables en terme de risque d'exposition en conditions agronomiques. Il a également été montré qu'une intoxication sublétale au diflubenzuron (50 µg par abeille et par jour durant 6 jours) perturbe significativement le développement des GHP (Gupta et Chandel, 1994). Si les effets d'une exposition à des substances toxiques ont pu être observés, aucune relation n'a jusqu'alors pu être établie entre une exposition durant le stade larvaire, et en effet différé sur le développement des GHP chez l'adulte. Ces scénarii sont en effet plus perniciose en conditions naturelles à deux titres :

- d'une part les relations de cause à effet sont beaucoup plus difficiles à établir compte tenu des délais qui séparent l'exposition de l'effet,
- d'autre part, une intoxication larvaire ne peut s'envisager que massivement et donc induire un déclin significatif des colonies.

Ce travail avait pour objectif d'évaluer, en conditions contrôlées, les effets potentiels d'une exposition sublétale de larves d'ouvrières à deux insecticides sur le développement des GHP des adultes.

Matériels et méthodes

La deltaméthrine est un insecticide neurotoxique de la famille des pyréthrinoïdes utilisé sur céréales, vigne, pomme de terre, cultures arboricoles et légumières. Le pyriproxyfène est un larvicide analogue de l'hormone juvénile qui agit en perturbant la mue imaginale. Il est principalement utilisé en cultures légumières et fruitières notamment contre les aleurodes. Les doses d'expositions testées ont été choisies à l'issue d'essais préalables qui nous ont permis de déterminer le seuil inférieur de létalité larvaire. Les larves sont exposées oralement par incorporation des molécules pures dans l'alimentation.

La méthode d'élevage *in vitro* utilisée est celle décrite par Aupinel *et al.* (2005). Les reines de plusieurs colonies sont isolées, et placées dans une cage (44,5 × 31,5 × 5 cm) dont les parois sont constituées de grilles à reine, contenant un cadre bâti vierge. Ce dispositif vise à contraindre la reine à pondre sur ce cadre, les grilles à reine l'empêchant de passer d'un cadre à un autre. Après 30 heures au maximum, la reine est libérée, et le cadre garni de pontes récentes est de nouveau placé dans la cage pour l'isoler de la reine, et remis au sein de la colonie pendant 3 jours, afin que les oeufs soient immédiatement pris en charge par les ouvrières et éclosent. Le lendemain de l'éclosion des pontes (J+1), les cadres contenant les larves L1 sont transportés au laboratoire (25°C) afin que les larves soient transférées une à une dans le dispositif d'élevage *in vitro*. Ce dispositif est constitué de plaques de microtitration de 48 puits. Chacun des puits contient un coton dentaire imbibé d'une solution désinfectante. Chaque coton est surmonté d'une cupule généralement utilisée pour l'élevage des reines, ayant préalablement reçu 20 µl d'un aliment composé à 50 % de gelée royale et 50 % d'une solution sucrée. Les jeunes larves sont transférées du cadre dans les cupules à raison d'une larve par cupule. Les plaques sont ensuite placées dans une étuve ventilée à 35°C et 96 % d'humidité relative (HR) de J+1 à J+6,. Le nourrissage a lieu chaque jour à l'aide d'une micropipette (excepté à J2), et les larves reçoivent au total 160 µl d'aliment. A J+7, les plaques sont placées dans une étuve à 35°C et 80% HR de J+8 jusqu'à la fin de l'éclosion. A partir de J+15, les plaques sont transférées dans des boîtes en plastique contenant un nourrisseur à sirop (50 % de sucre, 50 % d'eau) et un nourrisseur à pollen, destinées à recueillir les abeilles adultes. Elles sont ensuite élevées jusqu'à J+26 puis congelées pour analyse du développement des GHP. Il a été montré que le poids frais de la tête était corrélé positivement à la taille des GHP (Hrassnigg et Crailsheim, 1998). Une technique simple et objective pour évaluer le développement des GHP consiste à prélever la tête de l'abeille, de la broyer et doser les protéines totales par la méthode de Bradford. Les observations ont porté sur la mortalité cumulée jusqu'à J+26 (adultes âgés de 8 jours) et la quantité de protéines totale dans les têtes.

Résultats

Tableau 1. Mortalités cumulées jusqu'à J+26 et quantités de protéines contenues dans les têtes en fonction des doses d'exposition larvaire de deux insecticides (tests : χ^2 pour les mortalités, ANOVA pour les dosages de protéines).

matière active	traitement	Effectifs initiaux	mortalité %	Effectifs adultes	Protéines (moyenne $\pm$ Sd)
deltaméthrine	témoins eau	48	29,20 (ac)	34	0,46 $\pm$ 0,02 (a)
	témoins acétone	48	31,25 (abc)	33	0,40 $\pm$ 0,01 (ab)
	2 ng/larve	48	25,00 (ac)	30	0,35 $\pm$ 0,02 (bc)
	6 ng/larve	48	39,58 (abc)	29	0,32 $\pm$ 0,02 (c)
	18 ng/larve	48	45,83 (b)	26	0,31 $\pm$ 0,02 (c)
pyriproxyfène	témoin eau	48	39,58 (a)	30	0,33 $\pm$ 0,01 (a)
	témoin acétone	48	60,42 (b)	19	0,34 $\pm$ 0,02 (a)
	2 ng/larve	48	56,25 (abc)	21	0,32 $\pm$ 0,01 (a)
	6 ng/larve	48	50,00 (abc)	24	0,33 $\pm$ 0,02 (a)
	18 ng/larve	48	50,00 (abc)	24	0,35 $\pm$ 0,02 (a)
	54 ng/larve	48	64,58 (bc)	17	0,25 $\pm$ 0,01 (b)

Pour chaque molécule, on n'observe pas de relation significative entre les doses testées et les mortalités, même si une tendance apparaît pour les doses les plus fortes. Les effets sur les quantités de protéines varient différemment d'une molécule à l'autre. Après une exposition à la deltaméthrine, ces valeurs diminuent graduellement de 0,40 mg à 0,31 mg de protéines lorsque les doses d'exposition augmentent de 2 ng/larve à 18 ng/larve. Le pyriproxyfène ne produit pas d'effet sur la quantité de protéines jusqu'à la dose de 18 ng/larve. A 54 ng/larve, on observe une nette réduction de la quantité de protéines dans les têtes des ouvrières.

Conclusion

Cette étude montre que l'exposition de larves d'abeilles à des doses sublétales d'insecticides peut induire des effets sublétaux différés au stade adulte. L'inhibition du développement des GHP, bien que non létal au plan individuel, peut se révéler fatal pour la colonie dès lors que ce phénomène touche massivement et durablement les larves. Ce scénario est tout à fait vraisemblable dans la mesure où les abeilles fréquentent massivement les parcelles de grandes cultures, approvisionnant ainsi la ruche avec une source unique de pollen sur plusieurs semaines. Les doses d'expositions testées sont vraisemblables notamment pour la deltaméthrine. Cet insecticide peut être retrouvé dans le pollen de colza jusqu'à la dose de 0,605 mg par kg de pollen (Tasei et al, 1994). Par ailleurs, on sait que la quantité de pollen ingérée par une larve d'ouvrière durant son développement est estimée à 5,4 mg (Rortais et al, 2005). Dans ces conditions, la quantité de deltaméthrine ingérée par une larve nourrie exclusivement avec du pollen de colza serait environ de 3 ng, dose qui, au vu de nos résultats, peut induire des dérèglements notables sur le développement des colonies d'abeilles.

Remerciements : Cette étude a été en partie financée par le Ministère de l'Ecologie, du Développement durable, des Transports et du Logement (Programme PNRPE).

Mots-clés : abeille domestique, pesticide, larve, glandes hypopharyngiennes

Références

- Aupinel, P., Fortini, D.; Dufour, H., Tasei, J. N., Michaud, B., Odoux, J. F., Pham-Delegue, M. H. 2005. Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. Bulletin of Insectology 58 (2) : 107-111
- Deseyn J., Billen J. 2005. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). Apidology 36:49-57.
- Gupta P.R., Chandel R. S. 1994. Effects of diflubenzuron and penfluron on workers of *Apis cerana* and *Apis mellifera* L. Apidology 26:3-10.
- Huang Z. Y., Otis G. W. 1989. Factors determining hypopharyngeal gland activity of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). Insectes sociaux 36(4):264-276.
- Hrassnigg N., Crailsheim K. 1998. Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. Journal of insect Physiology 44:929-939.
- Pernal S. F., Currie R. W. 2000. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). Apidology 31:387-409.
- Rortais A., Arnold G., Halm M. P., Touffet-Briens F. 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. Apidologie 36 : 71-83
- Sagili R. R., Pankiw T., Zhu-salsman K. 2005. Effects of soybean inhibitor on hypopharyngeal gland protein content, total midgut protease activity and survival of the honey bee (*Apis mellifera* L.). Journal of insect Physiology 51:953-957.
- Sagili R. R., Pankiw T. 2007. Effects of protein-constrained brood food on honey bee (*Apis mellifera* L.) pollen foraging and colony growth. Behavioral Ecology and Sociobiology 61:1471-1478.
- Tasei J. N., Sabik H., Pirastru L., Langiu E., Blanche J. M., Fournier J., Taglioni J. P. 1994. Effects of sublethal doses of deltamethrin (Decis CE) on *Bombus terrestris*. Journal of apicultural research 33(3) : 129-135.

Evaluation des impacts phytosanitaires chez l'auxiliaire *Forficula auricularia* L.

Laure MALAGNOUX¹, Séverine SUCHAIL¹, Christophe MAZZIA¹,
Yvan CAPOWIEZ², Magali RAULT¹

¹Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR 406 Abeilles et Environnement, Laboratoire de Toxicologie Environnementale, Site AGROPARC, F-84914 Avignon Cedex 09

²INRA, Unité PSH, Equipe Ecologie de la Production Intégrée, Site AGROPARC, F-84914 Avignon Cedex 09
magali.rault@univ-avignon.fr

Dans le contexte européen actuel visant la réduction des risques et de l'utilisation des pesticides (Plan EcoPhyto 2018), le développement de méthodes alternatives devient un objectif majeur. Parmi celles-ci, la lutte biologique représente un outil intéressant. La présence de différents ennemis naturels spécialistes ou généralistes (coccinelles, syrphes, forficules) des insectes ravageurs constituent un écosystème utile permettant de réguler les populations de ravageurs en vergers.

Prédateur généraliste le perce oreille commun, *Forficula auricularia* L., devient alors une espèce bioindicatrice de choix pour une approche à la fois écotoxicologique et écologique. L'intérêt des forficules dans la lutte contre les ravageurs des cultures est dû à leur large gamme de proies et à leur efficacité sur certains ravageurs clés, dont les pucerons *Dysaphis plantaginea*, en vergers de pommiers (Dib *et al.* 2010). Les forficules possèdent, en outre, plusieurs atouts contribuant à la possibilité de les utiliser dans la lutte contre les ravageurs des cultures. Elles possèdent une aire de dispersion large, un comportement de recherche efficace, associés à une phéromone d'agrégation ce qui peut laisser espérer une utilisation optimale de ce groupe dans la gestion des populations de ravageurs. D'un point de vue écotoxicologique, les forficules sont faciles à piéger et présentent l'intérêt de couvrir différents niveaux d'exposition (sol, surface du sol et surface foliaire) en fonction des stades larvaires et de la période de l'année considérée.

L'objectif de ce travail est d'étudier les communautés de forficules dans un réseau de vergers de pommiers soumis à différents modes de protection (protection phytosanitaire conventionnelle, raisonnée, ou agriculture biologique). Des vergers abandonnés servent de référence. Parallèlement, une démarche intégrée est mise en place dans le but de suivre un ensemble de biomarqueurs de nature différente, pour prédire les impacts au niveau de l'agro-écosystème. Les biomarqueurs choisis sont (i) les B-estérases, biomarqueurs biochimiques, sensibles à certains pesticides utilisés en vergers de pommiers, et déjà utilisées sur d'autres modèles (Denoyelle *et al.* 2007, Laguerre *et al.* 2009) et (ii) la capacité de prédation, biomarqueur du comportement. L'effet de 5 insecticides de familles différentes couramment utilisées en vergers de pommiers est analysé pour chaque type de biomarqueur étudié. Enfin, à partir de populations prélevées au terrain, un élevage est mis en place, et les variations des caractéristiques de cycle de vie (survie, fertilité) sont estimées en fonction des modes de protection.

Le suivi mensuel effectué dans le réseau de vergers de pommiers nous permet d'observer la réponse des communautés aux pratiques agricoles, aux variations saisonnières et la

variabilité spatiale de ces populations dans la parcelle et à proximité (haies). L'échantillonnage, réalisé une fois par mois de mai à octobre, a mis en évidence une forte hétérogénéité des populations de forficules entre vergers soumis aux mêmes pratiques agricoles. De plus, leur abondance apparaît importante dans certains vergers conventionnels. Cette observation nous a conduit à effectuer des tests de sensibilité, vis à vis des organophosphorés, sur des populations de l'année, prélevées en verger, ainsi que sur les individus issus des populations mises en élevage l'année précédente. Le taux de mortalité des individus exposés à la dose autorisée en verger varie en fonction de leur provenance. En particulier, on observe une mortalité plus faible chez les individus recueillis dans les vergers conduits en agriculture conventionnelle, que chez les individus recueillis dans les vergers en agriculture biologique et vergers témoins. Ces caractéristiques semblent être conservées chez les individus issus de l'élevage.

Les B-estérases, acétylcholinestérase (AChE) et carboxylestérase (CbE), ont été localisées dans les différentes parties du forficule (tête, thorax, abdomen) et leurs caractéristiques cinétiques déterminées. Des inhibitions *in vitro* sont réalisées pour évaluer la sensibilité des différents biomarqueurs vis à vis de pesticides organophosphorés et carbamates. Les résultats montrent une forte localisation de l'acétylcholinestérase dans la tête, alors que les carboxylestérases sont réparties de façon plus homogène entre les différentes parties du corps. Chez la femelle, les CbEs sont cependant préférentiellement localisées au niveau de l'abdomen. Quelque soit le sexe considéré, les B-estérases présentent la même sensibilité vis à vis des carbamates. En revanche, pour une même concentration de pesticide, l'effet des organophosphorés dépend du sexe et du type de B-estérase. En effet, chez le mâle, on observe une forte sensibilité de l'acétylcholinestérase vis à vis de 10^{-6} M de chlorpyrifos-oxon, un pesticide organophosphoré, mais aucune inhibition des carboxylestérases (100% d'inhibition de l'AChE contre 0% d'inhibition des CbEs). Chez la femelle, dans les mêmes conditions, l'acétylcholinestérase présente 50% d'inhibition contre 20% d'inhibition des carboxylestérases. Ce résultat est d'une part en faveur d'un rôle protecteur des CbE vis à vis de l'AChE (Maxwell & Brecht, 2001) et soulève d'autre part le problème d'une sensibilité différentielle selon le sexe, pouvant entraîner une variabilité des populations en fonction des pratiques agricoles utilisées.

La capacité de prédation des forficules après exposition à différents pesticides est étudiée sur le puceron cendré (*Dysaphis plantaginea*). Les études sont réalisées sur les différents stades de développements larvaires L3 et L4 et sur adultes. Cinq insecticides les plus couramment utilisées en vergers de pommiers sont choisis : (1) le Pyrinex (chlorpyrifos) ; (2) le Decis (deltaméthrine) ; (3) le Suprem (acetamipride) ; tous trois utilisés en agriculture conventionnelle ; (4) le Pirimor (pyrimicarbe) utilisé en agriculture raisonnée et (5) le Spinosad, utilisé en agriculture biologique. Chaque pesticide est utilisé à la dose autorisée en verger et les forficules sont exposés pendant 12h avant de commencer l'expérience de prédation. Un exemple des résultats obtenus est montré Fig.1. Une diminution significative de la capacité de prédation des forficules au stade L3 est observée après exposition au Pyrinex et au Spinosad (Fig 1A). Une exposition aux autres familles de pesticide modifie dans une moindre mesure la quantité de pucerons consommés en fonction de la quantité de pucerons offerts, par rapport aux valeurs témoins (Fig 1B).

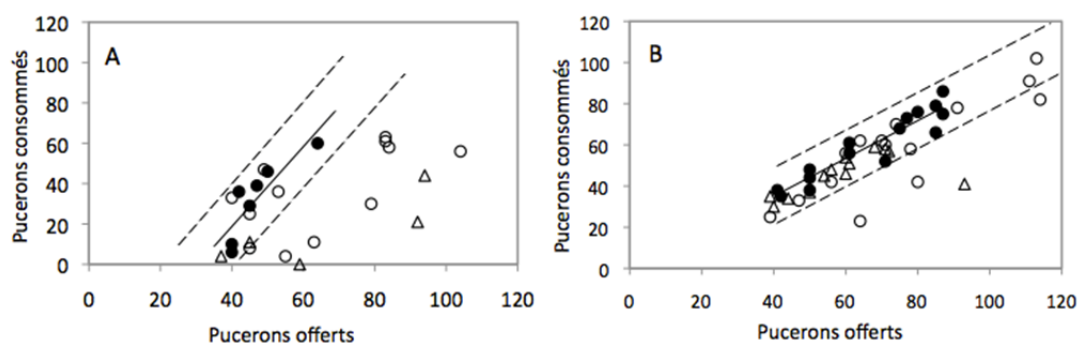


Figure 1. Suivi de la capacité de prédation chez les forficules. (A) Stade L3 : Témoins (●), Pyrinex (△), Spinosad (○) ; (B) Stade L4 : Témoins (●), Decis (△), Supreme (○). ---- Intervale de confiance autour des individus Témoins.

Les premiers résultats obtenus sur l'évaluation des impacts phytosanitaires chez l'auxiliaire *Forficula Auricularia* L. mettent en évidence l'intérêt de cette espèce, tant sur un plan écologique, en tant qu'auxiliaire des cultures, que sur un plan écotoxicologique en tant que modèle d'étude. Leur cycle de vie permet d'appréhender plusieurs niveaux d'exposition, leur capture aisée ainsi que la mise en élevage permet également de suivre un ensemble de biomarqueurs à différents stades du développement. Enfin la variation de sensibilité des B-estérases observée *in vitro* associée à la sensibilité observée *in vivo* selon la provenance des individus, ouvre de nombreuses perspectives quant aux mécanismes physiologiques d'adaptation des organismes soumis à une forte pression environnementale, en particulier, en arboriculture fruitière.

Mots-clés : biomarqueurs, forficules, pratiques agricoles, prédation.

Références

- Denoyelle R., Rault M., Mazzia C., Mascle O., Capowiez Y. 2007 Cholinesteras activity as a biomarker of pesticide exposure in *Allolobophora chlorotica* earthworms living in apple orchards under different management strategies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 2644-2649.
- Dib H., Simon S., Sauphanor B., Yvan Capowiez. 2010. The role of natural enemies on the population dynamics of the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea* Passerini (Hemiptera: Aphididae) in organic apple orchards in south-eastern France. *Biological Control* 55: 97-109.
- Maxwell D.M., Brecht K.M. 2001. Carboxylesterase: specificity and spontaneous reactivation of an endogenous scavenger for organophosphorous compound. *J. Appl. Toxicol.* 21: 103-107.
- Laguerre C., Sanchez-Hernandez J. C., Köhler H. R., Tribskorn R., Capowiez Y., Rault M. and Mazzia C. (2009) "B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: An enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure" *Environmental Pollution*, 157, 199-207.

Essais inter-laboratoire pour évaluer le standard ISO 11063 'Qualité du sol – méthode pour l'extraction directe des acides nucléiques du sol'

Ines PETRIC¹, Laurent PHILIPPOT², C. ABBATE³, Antonio BISPO⁴, Thierry CHESNOT⁵, Sara HALLIN⁶, Karine LAVAL⁷, Thierry LEBEAU⁸, Philippe LEMANCEAU², Corinne LEYVAL⁹, Kristina LINDSTROM¹⁰, Pascal PANDARD¹¹, E. ROMERO¹², Amadou SARR², Michael SCHLOTER¹³, Pascal SIMONET¹⁴, Kornelia SMALLA¹⁵, Bernd-Mickael WILKE¹⁶, Fabrice MARTIN-LAURENT²

¹Wellience Agro-Environment, BP 66517, F-21065 Dijon Cedex

²UMR 1229 MSE, INRA-Université de Bourgogne, F-21065 Dijon Cedex

³DACPA, Sezione di Scienze Agrochimiche, University of Catania, 95123 Catania, Italy

⁴ADEME, Agriculture and Forestry Department, F-49004 Angers Cedex 01

⁵Laboratoire Etudes et Expertises, IPL santé, environnement durables Est, F-54521 Maxéville

⁶Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Microbiology, Box 7025, 750 07 Uppsala, Sweden

⁷Laboratoire BioSol, APCA/Ecole d'Ingénieurs en Agriculture, F-76000 Rouen

⁸Plate-Forme Technologique AGROSYSTEMES, Institut Universitaire de Technologie, BP 50568, F-68008 Colmar Cedex

⁹LIMOS, Nancy Université, CNRS, Faculté des Sciences, BP 239, F-54506 Vandoeuvre-les-Nancy-Cedex

¹⁰Department of Food and Environmental Sciences, P.O. Box 56, 00014, University of Helsinki, Finland

¹¹INERIS, Parc Technologique ALATA, BP 2, F-60550 Verneuil en Halatte

¹²CSIC, Estacion Experimental del Zaidín, Environmental Protection, 18008 Granada, Spain

¹³Department for Terrestrial Ecogenetics Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health (GmbH), D-85764 Neuherberg, Germany

¹⁴Environmental Microbial Genomics Group, Laboratoire AMPERE, Ecole Centrale de Lyon, Université de Lyon, F-69134 Ecully

¹⁵Julius Kühn-Institut Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, D-38104 Braunschweig, Germany

¹⁶Technische Universität Berlin, Department of Ecology, D-10587 Berlin, Germany
fabrice.martin@dijon.inra.fr

L'extraction directe des acides nucléiques de microorganismes du sol est une étape cruciale de l'analyse moléculaire des communautés microbiennes du sol. Cependant, l'utilisation de nombreux protocoles d'extraction, chacun présent des biais, rendent difficile la comparaison des jeux de données. Cette déficience est d'autant plus dommageable que les méthodes moléculaires présentent un débit élevé et, en conséquence, génèrent de nombreuses données. Avec de surpasser cette problématique, en 2006 l'INRA a proposé à l'ISO une méthode d'extraction directe de l'ADN du sol. Cette méthode a été évaluée par 13 laboratoires européens indépendants au travers d'un essai interlaboratoire Français et d'un essai international. La reproductibilité de la méthode d'extraction des acides nucléiques du sol a été évaluée en comparant les quantités d'ADN, l'abondance et la structure génétique de communautés microbiennes extraits de 12 sols différents. Basés sur les résultats des essais interlaboratoires, la méthode a été approuvée à l'unanimité par les 21 pays votant à l'ISO. Le standard ISO11063 décrivant cette méthode a été publié par l'ISO. Il est en cours de traduction pour être publié en Français par l'AFNOR. Les résultats des essais interlaboratoires seront présentés et les perspectives offertes par ce nouveau standard en terme d'évaluation post-homologation de produits phytosanitaires discutées.

Mots-clés : ADN du sol, ISO, AFNOR

Référence

Petric I., Philippot L., Abbate, Abbate C., Bispo A., Chesnot T., Hallin S., Laval K., Lebeau T., Lemanceau P., Leyval C., Lindstrom K., Pandard P., Romero E., Sarr A., Schlöter M, Simonet P., Smalla K., Wilke B.M., Martin-Laurent F. 2011. Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 "Soil quality - Method to directly extract DNA from soil samples". J. Microbiol. Meth. 84:454-460.

Adaptation des modèles de « distribution de sensibilité des espèces » aux diatomées benthiques pour l'évaluation du risque des herbicides

Floriane LARRAS, Agnès BOUCHEZ, Bernard MONTUELLE

INRA, UMR CARTTEL, 75 avenue de Corzent, F-74200 Thonon-Les-Bains
floriane.larras@thonon.inra.fr

Les zones littorales lacustres sont souvent plus exposées que les zones pélagiques aux apports de polluants d'origine terrestre, en quantité et en diversité. Les organismes qui y vivent sont alors exposés à des mélanges de contaminants à plus ou moins faible dose. Les diatomées benthiques représentent une partie importante de la biomasse fixée sur cette zone. Elles sont largement utilisées pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques (en particulier dans le cadre de l'indice biologique diatomique IBD). Le développement d'outils prédictifs fiables pour déterminer le niveau de toxicité d'une substance ou d'un mélange représente un enjeu important pour la zone littorale où le rôle écologique et fonctionnel des diatomées benthiques est capital [1]. Dans le domaine de l'évaluation du risque en milieu aquatique, des modèles de distribution de la sensibilité des espèces (SSD) ont été mis au point sur le phytoplancton de la zone pélagique. Ces modèles permettent d'extrapoler des concentrations protectrices d'une substance/d'un mélange pour une espèce/une communauté [2]. Leur application et leur validation sur les diatomées benthiques de la zone littorale sont le cœur de ce travail de thèse.

Dans un premier temps, nous avons évalué la sensibilité de 11 souches de diatomées benthiques à 8 herbicides. Les souches ont été sélectionnées en fonction de leur présence dans les biofilms provenant de différents sites de la zone littorale du lac Léman, de façon à travailler sur un assemblage d'espèces représentatives de la diversité observée *in situ* tout en présentant une grande diversité de formes de vie et de tolérance (IPS). Notre choix s'est donc porté sur *Eolimna minima*, *Craticula accomoda*, *Nitzschia palea*, *Gomphonema parvulum*, *Mayamaea fossalis*, *Achnanidium minutissimum*, *Cyclotella meneghiniana*, *Encyonema silesiacum*, *Fragilaria rumpens*, *Fragilaria ulna*, *Fragilaria capucina* var *vaucheriae*.

Les 8 herbicides (répartis en 4 familles) ont été également choisis parmi ceux retrouvés dans la zone littorale du lac Léman, mais aussi sur des critères de diversité de caractéristiques physico-chimiques, de modes d'action et de toxicité. Le diuron, l'isoproturon, l'atrazine et la terbutryne (inhibition du photosystème 2 (PSII) sur les sites B ou A), le metolachlor et le dimetachlor (inhibition de la biosynthèse des longues chaînes d'acide gras) ainsi que l'amidosulfuron et le foramsulfuron (régulateur de croissance des végétaux supérieurs) ont été choisis.

Les bioessais ont été réalisés en conditions contrôlées. Les cultures âgées de 7 à 10 jours, et présentant un minimum de 10000 cellules/mL [3] ont été exposées aux herbicides après mise en suspension dans des tubes de 30 mL pendant 96h. Chacune des souches a été exposée à une gamme de concentrations pour chacun des herbicides. Ces tests ont permis de tracer des courbes doses-réponses desquelles nous avons pu extrapoler les concentrations effectives pour 5 et 50% (CE₅ et CE₅₀). Une grande variété de sensibilité des espèces est observée pour un même herbicide. Par ailleurs, le dimetachlor, l'amidosulfuron et le foramsulfuron se sont révélés trop peu toxiques pour être intégrés dans les modèles.

Dans un deuxième temps, 2 courbes SSD ont été modélisées pour chaque herbicide : une à partir des CE₅ (SSD-EC₅) et l'autre sur les CE₅₀ (SSD-EC₅₀) obtenues en bioessai (Fig. 1). Pour chaque courbe SSD, nous avons extrapolé la Hazardous Concentration 50% (HC₅₀) soit la concentration prédite pour laquelle 50% des espèces de l'assemblage sont affectées

pour le critère étudié. D'après les SSD-EC₅₀, l'ordre de toxicité entre les herbicides testés est diuron>terbutryne>isoproturon>atrazine>metolachlor. Ces courbes permettent également de d'évaluer le niveau de sensibilité des espèces selon leur répartition.

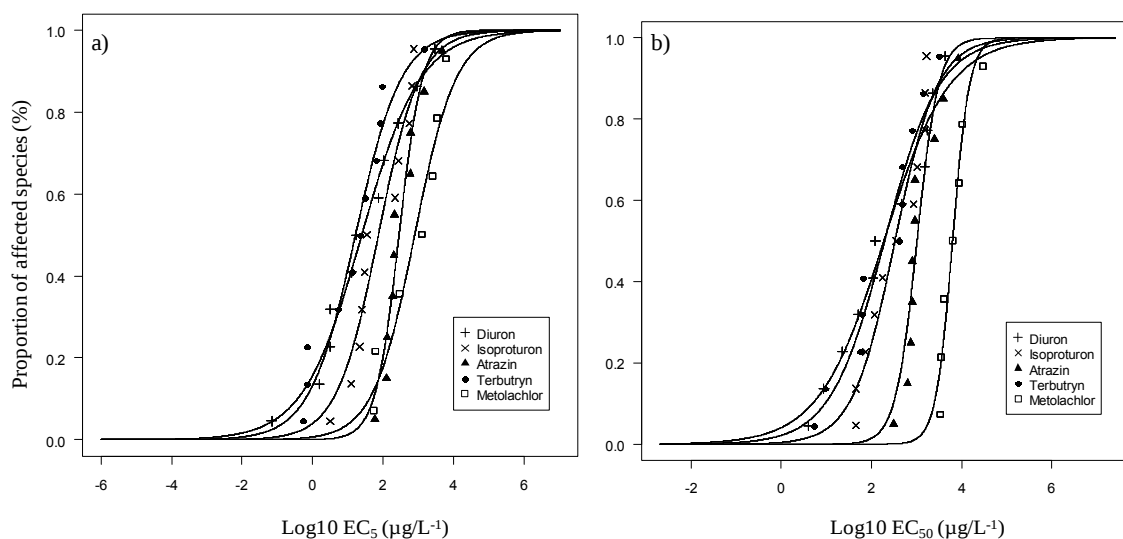


Figure 1 : Modélisation des courbes SSD pour chaque herbicide à partir a) des EC₅ et b) de EC₅₀.

En réponse aux inhibiteurs du PSII, *Nitzschia palea*, *Craticula accomoda*, *Gomphonema parvulum*, *Eolimna minima* et *Mayamaea fossalis* (sauf terbutryne) se sont révélées plus tolérantes. Cette tolérance pourrait être expliquée par différents traits de vie tels que le mode trophique [4] et la guildes écologique [5]. Les espèces à caractère N-hétérotrophe auraient tendance à être moins sensibles aux inhibiteurs du PSII que les N-autotrophes, plus dépendantes de la photosynthèse. Mais les espèces à caractère motile sembleraient également plus tolérantes à ces herbicides.

Ces premières expérimentations ont démontré a) la grande variation de sensibilité des diatomées benthiques aux 8 herbicides utilisés, b) que les modèles SSD peuvent être construits à partir de valeurs seuils concernant les diatomées benthiques ainsi que c) les espèces les plus tolérantes aux inhibiteurs du PSII sont N-hétérotrophes et/ou mobiles. La prochaine étape consistera à évaluer si la sensibilité des souches aux herbicides est modifiée dans le cas où l'exposition se fait directement sur les biofilms structurés, sans remise en suspension. Enfin, nous travaillerons sur les mélanges d'herbicides afin d'évaluer s'il y a ou non des effets synergiques, antagonistes ou additifs et de pouvoir mettre en place des modèles de prédiction du risque des mélanges en zone benthique.

Mots-clés : Diatomées benthiques, SSD, herbicides.

Références

- [1] Schmitt-Jansen M., Altenburger R., 2005. Toxic effects of isoproturon on periphyton communities-a microcosm study. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 62, 539-545.
- [2] Posthuma L., Suter G.W., Traas T.P., 2002. *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Lewis Publishers: Boca Raton.
- [3] ASTM International, 2007. *Standard Guide for conducting Static Toxicity Tests with Microalgae*. Designation: E1218-04E1.
- [4] Debenest T., Silvestre J., Coste M., Pinelli E., 2010. Effects of Pesticides on Freshwater Diatoms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 203.
- [5] Rimet F. et Bouchez A., 2011. Use of diatom life-forms and ecological guilds to assess pesticide contamination in rivers: Lotic mesocosms approaches. *Ecological Indicators* 11, 489-499.

Illustration des approches utilisées en écotoxicologie aquatique dans les Antilles françaises : bilan et perspectives des études sur les effets biologiques de la chlordécone sur les crustacés des rivières de Guadeloupe

Laurent LAGADIC¹, Dominique MONTI², Soazig LEMOINE², Danièle VASSAUX¹,
Gabrielle ZIMMERMANN-CHANCEREL¹, Lucie BAILLON¹

¹INRA, Equipe Ecotoxicologie et Qualité des Milieux Aquatiques, UMR 0985 Ecologie et Santé des Ecosystèmes, Agrocampus Ouest, 65 rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes

²Université des Antilles et de la Guyane, Equipe Dynamique des Ecosystèmes Caraïbes, EA 926, Campus de Fouillole, 97157 Pointe-à-Pitre
Laurent.Lagadic@rennes.inra.fr

Dans les Antilles françaises, l'utilisation de chlordécone dans les bananeraies du début des années 70 jusqu'au début des années 90 est à l'origine de pollutions avérées des sols, des ressources en eau et des organismes vivants. Dans le milieu naturel, les crustacés aquatiques présentent de très fortes concentrations en chlordécone dans leurs tissus. De ce fait, les autorités ont demandé un contrôle plus important des crustacés dans les élevages, alimentés par les cours d'eau, et il s'est avéré que, dans plusieurs fermes aquacoles d'ouassous (*Macrobrachium rosenbergii*) en Guadeloupe et Martinique, les animaux présentaient des teneurs supérieures à la LMR (Limite Maximale de Résidus) de 20 µg/kg. Jusqu'à présent, les études réalisées sur ce problème se sont principalement basées sur une approche empirique de l'évaluation de la contamination de l'eau et des crustacés, et de constats de modification de la structure des populations. Beaucoup de questions sont toujours sans réponse quand au mode de contamination des ouassous par la chlordécone, sur sa biodisponibilité et sur la capacité qu'ont les crustacés de pouvoir l'éliminer, mais également sur ses mécanismes d'action en tant que neurotoxique et perturbateur endocrinien. Les travaux en cours visent à utiliser l'ouassou *Macrobrachium spp.* à la fois comme organisme-sentinel sur le terrain et comme organisme-modèle en laboratoire afin de générer des connaissances sur des aspects mécanistes concernant notamment (i) les modalités d'exposition des organismes, en fonction de la biodisponibilité de la chlordécone, (ii) leurs capacités de détoxification/dépuration, et (iii) l'impact de la molécule sur la physiologie des organismes en considérant les mécanismes connus pour être affectés chez des modèles mammaliens, en l'occurrence neurotoxicité et perturbation endocrinienne, et (iv) les conséquences populationnelles des altérations de la physiologie des organismes, à tous les stades de leur développement, y compris les stades les plus jeunes (larves, post-larves et juvéniles).

Programme CHLORDEXCO - Pollution des sols et des eaux par la chlordécone aux Antilles, conséquences sur la contamination des cultures et des organismes dulçaquicoles (ANR CES 2008 ; Coord. Ph. Cattan, CIRAD)

Une étude publiée par D. Monti en 2007 a fait état de niveaux de contamination très élevés à l'aval de six rivières échantillonnées en Guadeloupe, avec 90% de résultats positifs sur l'ensemble des rivières prospectées sur l'île de la Basse-Terre. Le niveau de contamination des organismes n'est pas généralement étroitement corrélé à celui de l'eau mais se révèle très important dès les faibles teneurs en polluant mesurés en eau brute, avec un facteur de bioconcentration variant entre $\times 5000$ et $\times 35000$ chez les poissons ou crustacés. La charge en polluant des organismes montre par contre de nettes différences en fonction du milieu de vie des espèces, avec une biomagnification du polluant plus importante chez les espèces

vivant en faciès calme (Coat, 2009 ; Coat *et al.*, 2008 ; Monti & Coat, 2007). Des différences notables de contamination existent cependant entre espèces et, pour une même espèce, entre les organes ou les stades de vie. Ainsi, chez les crustacés décapodes (*Macrobrachium faustinum*), le céphalothorax est environ deux fois plus contaminé que l'abdomen et, pour ce dernier, la carapace est 4 à 5 fois plus contaminée que la chair (Données non publiées obtenues dans le cadre du programme CHLORDEXCO) et les phases juvéniles plus concentrées en polluant que les phases adultes (Monti, 2008).

L'état de santé d'adultes de *M. faustinum* prélevés selon une approche amont-aval dans la Rivière Pérou a été évalué au moyen de biomarqueurs au cours de mai 2009 à janvier 2010. Faute de connaissances suffisantes sur les mécanismes d'action de la chlordécone chez les invertébrés, les biomarqueurs choisis des biomarqueurs dits généralistes, à savoir les activités acétylcholinestérases (AChE), carboxylestérases (CbE), glutathion S-transférases (GST) et Na⁺/K⁺-ATPase. Les premiers résultats montrent que l'activité GST ne présente aucune variation alors que des différences amont-aval ont été observées pour les activités AChE, CbE et Na⁺/K⁺-ATPase. Ces résultats suggèrent des différences physiologiques entre les animaux prélevés en amont et ceux échantillonnés en aval sans qu'il soit toutefois possible de les relier sans équivoque à la présence de chlordécone dans la mesure où les biomarqueurs choisis ne sont pas spécifiques du mode d'action de la chlordécone.

Programme MACHLOMA - Mécanismes d'accumulation, d'élimination et de perturbation des systèmes nerveux et endocriniens induits par l'exposition de *Macrobrachium rosenbergii* à la chlordécone dans les Antilles françaises (ANR CES 2010 ; Coord. S. Lemoine, UAG)

Ce programme démarré en février 2010 devrait permettre non seulement de caractériser les mécanismes de bioconcentration et d'élimination de la chlordécone et de développer des biomarqueurs plus spécifiques des effets de cette molécule chez ces organismes, mais aussi de mieux identifier les sources de contamination des fermes aquacoles et d'apporter des solutions pour la relance de leur activité.

Dans le projet MACHLOMA, appuyé par l'existence d'une ferme éclosier en Guadeloupe qui permettra d'obtenir des individus de stades connus en grande quantité, il est proposé d'utiliser *M. rosenbergii* comme organisme modèle, afin d'apporter des connaissances indispensables d'une part à l'évaluation du risque de contamination de produits d'élevages aquacoles aux Antilles (appui aux professionnels de l'aquaculture locale) et d'autre part à la mise en œuvre d'une approche de bioindication *in situ* pertinente (après transfert des méthodes de mesures sur une espèce sauvage, en l'occurrence *M. faustinum*, utilisée dans le cadre du programme CHLORDEXCO).

Le but de ce projet est d'utiliser *M. rosenbergii* comme organisme modèle dans des expériences (1) d'intoxications expérimentales en laboratoire et (2) d'exposition dans des bassin d'élevage, sur une période de huit mois, dans des conditions naturelles, avec un niveau de contamination de l'eau (Rivière aux Herbes) en chlordécone d'environ de 0,33 µg.L⁻¹ (moyenne des 18 valeurs obtenues par la DIREN de Mai 2003 à Avril 2008). Pour la même période d'échantillonnage, la rivière Grande-Anse à Trois-Rivières, considérée comme la plus contaminée en chlordécone, présente une moyenne de 0,55 µg.L⁻¹.

Programme "Vulnérabilité des nurseries dulçaquicoles de Guadeloupe et Martinique face à la charge en pesticides des eaux: réponses écotoxicologiques de juvéniles d'espèces locales à la chlordécone" (Onema/ODE ; Coord. D. Monti, UAG)

Dans le cadre de ce programme, une investigation du potentiel métabolique et de son éventuelle modification par la chlordécone chez des larves de *Macrobrachium rosenbergii*, a été abordée par des mesures de la charge énergétique en adénylates (CEA).

Les mesures de CEA ont été menées parallèlement à des tests de survie et de mesures comportementales, sur des lots de larves de *M. rosenbergii* préalablement exposées ou non à la chlordécone et observées à l'aide d'une installation de toximétrie dynamique à l'UAG. La

mise en relation de ces deux types de mesures permettra d'établir si les éventuelles altérations comportementales des larves de *M. rosenbergii* en présence de chlordécone sont liées à une modification du « pool énergétique total ».

Globalement, les variations de la CEA reflètent les altérations du comportement natatoire des larves de *M. rosenbergii*. Ces perturbations comportementales pourraient être à l'origine d'une diminution de la capacité des larves à remonter en eau douce après leur séjour en milieu marin, ce qui expliquerait la baisse de la densité de population d'ouassous dans les rivières guadeloupéennes.

Perspectives

Les travaux futurs consistent, en s'appuyant sur les résultats des études menées dans les projets précédemment décrits, à évaluer les contributions relatives des formes dissoute et adsorbées (MES et sédiments) de la chlordécone à la contamination des crustacés décapodes dans des rivières de Guadeloupe. Ces études seront mise en œuvre dans des bassins versants où seront abordés (i) l'analyse et la modélisation des caractéristiques d'exposition selon que la chlordécone est sous forme dissoute ou adsorbée, et (ii) l'analyse des voies de contamination et des effets biologiques associés chez deux espèces de crustacés décapodes (*Macrobrachium* sp. et *Atya* sp.) présentes dans des faciès différents (lent vs rapide) où les temps de résidence des matières en suspension potentiellement vectrices de chlordécone sont différents.

Mots-clés : chlordécone, Antilles françaises, crustacés, *Macrobrachium* sp., bioconcentration, biomarqueurs

Références bibliographiques

- Coat, S. 2009. Identification du réseau trophique de rivière et étude de sa contamination par les pesticides organochlorés (chlordécone et β -HCH) en Guadeloupe. Thèse de doctorat de l'Université des Antilles et de la Guyane, 209 pages.
- Coat, S., Monti, D., Legendre, P., Bouchon, C., Massat, F., Lepoint, G., 2011. Organochlorine pollution in tropical rivers (Guadeloupe): Role of ecological factors in food web bioaccumulation. *Environmental Pollution*, 159(6): 1692-1701.
- Monti D., 2007. Biocontamination en Chlordécone, β -Hexachlorocyclohexane et Cadusaphos des Crustacés et Poissons d'eau douce, en Guadeloupe. *Convention UAG/Direction Régionale de l'Environnement Guadeloupe*. 36 pages + annexes.
- Monti D. 2008. Evaluation de la biocontamination en Chlordécone de crustacés et poissons de rivières du Nord-Ouest de la Basse-Terre, et synthèse à l'échelle de la Guadeloupe. *Convention UAG/Direction Régionale de l'Environnement Guadeloupe*. 31 pages + annexes.
- Monti D. et Coat S. 2007.- La contamination des espèces d'eau douce aux Antilles. in *Numéro spécial des Cahiers du Pôle de Recherche Agro-environnementale de la Martinique* « Pollution des sols par la chlordécone: impacts sur la qualité des milieux et des produits agricoles », 7(4): 29-33.

Intérêt des lignées cellulaires de poisson en évaluation éco-génotoxicologique

Sylvie BONY, Aude KIENZLER, Xavier TRONCHERE et Alain DEVAUX

USC INRA Impact Génotoxique sur les Hydrosystèmes, UMR LEHNA 5023
ENTPE, rue Maurice Audin, F-69518 Vaulx en Velin
sylvie.bony@entpe.fr

Les exigences réglementaires actuelles (REACH, DCE, Ecophyto2018...) incitent au développement de biomarqueurs fiables au plan de leur signification écologique et exacerbent le besoin de modèles biologiques sensibles, éthiques et de coût raisonnable. Pour répondre à ces critères, les approches *in vitro* utilisant des lignées cellulaires de poissons sont actuellement proposées en alternative aux essais *in vivo* sur poisson. Si la cytotoxicité est le paramètre généralement retenu dans ce contexte, nous avons fait le choix de nous intéresser en parallèle à l'utilisation de paramètres de génotoxicité comme indicateur de risque toxique. En effet, les biomarqueurs de génotoxicité présentent généralement des seuils d'effet à des doses infra-cytotoxiques et sont particulièrement pertinents dans les situations de bas niveau de contamination exerçant leurs effets sur le moyen ou le long terme.

Dans cette présentation, nous effectuerons un point rapide sur l'état de l'art de l'utilisation des lignées cellulaires de poissons en écotoxicologie et présenterons les travaux menés sur ces modèles biologiques pour optimiser la mesure de biomarqueurs de génotoxicité (dommages primaires à l'ADN, micronoyaux et activités de réparation des dommages) et les mettre en oeuvre dans divers scénarii de contamination.

Mots-clés : *in vitro*, lignée cellulaire, génotoxicité, biomarqueur

Conséquences écotoxicologiques d'un impact génotoxique sur les gamètes des organismes aquatiques

Alain DEVAUX, Sylvie BONY, Christian GILLET, Emilie. LACAZE, Luc FIAT, Raphael SANTOS, Wilfried SANCHEZ, Jean-Michel OLIVIER

USC INRA Impact Génotoxique sur les Hydrosystèmes, UMR LEHNA 5023
ENTPE, rue Maurice Audin, F-69518 Vaulx en Velin
alain.devaux@entpe.fr

Le milieu aquatique est le réceptacle final de contaminants présentant fréquemment des propriétés génotoxiques. De tels composés sont susceptibles d'affecter directement la descendance exposée ou indirectement via le succès de la reproduction. Une des conséquences possibles est une diminution du taux de recrutement conditionnant le maintien de la population en place.

Les dommages génotoxiques générés au niveau des gamètes peuvent conduire à des mutations délétères transmissibles aux générations suivantes et s'ajoutant à des effets épigénétiques. Cette présentation résume les travaux récents menés chez différentes espèces de poisson et de crustacé d'eau douce qui ont permis de démontrer l'existence d'un lien entre le niveau de dommages à l'ADN spermatique et le taux d'anomalies sur la F1 après exposition à des génotoxiques au laboratoire en conditions contrôlées (Devaux et al., 2011 ; Lacaze et al., 2011).

La seconde étape présentée concerne l'exploration actuelle de ce lien fonctionnel sur des populations de poissons sauvages exposés à des contaminations d'origine anthropique diverse. Le but final de ces études sera de disposer d'un biomarqueur à forte signification écologique apportant des éléments d'information sur l'impact des contaminations sur la dynamique des populations d'organismes aquatiques, pouvant expliquer en partie les déclin démographiques observés durant la dernière décennie.

Mots-clés : poisson, reproduction, génotoxicité, population

Apport de la génétique quantitative pour estimer l'impact évolutif des contaminants : exemple chez *Lymnaea stagnalis* exposée à des pesticides

Marie-Agnès COUTELLEC, Marc COLLINET et Thierry CAQUET

INRA, UMR 0985 Ecologie et Santé des Ecosystèmes,
Equipe Ecotoxicologie et Qualité des Milieux Aquatiques, 65 rue de Saint-Brieuc, F-35042 Rennes
cedex
marie-agnes.coutellec@rennes.inra.fr

Le stress environnemental peut entraîner des processus micro-évolutifs rapides dans les populations naturelles (Hoffmann et Hercus, 2000). Des réponses adaptatives rapides ont été documentées dans des situations écologiques particulières telles que la colonisation de nouveaux milieux, ou l'hétérogénéité liée à une structure en métapopulation (Reznick et Ghalambor, 2001). Il a été montré que le taux d'évolution naturel est altéré par les facteurs humains (Hendry *et al.*, 2008). Les polluants peuvent représenter une source de changement, d'hétérogénéité et de stress environnemental, et sont donc susceptibles de générer des processus micro-évolutifs. C'est sur cette idée que repose l'intérêt actuel de l'écotoxicologie pour la notion d'impact évolutif, comme nouvel enjeu de l'évaluation du risque écologique (Breitholtz *et al.*, 2006 ; Coutellec et Barata, 2011). Certains habitats sont plus enclins que d'autres aux altérations évolutives d'origine anthropique. Les milieux d'eau douce lenticques situés dans les paysages agricoles sont exposés de façon récurrente à des cocktails de pesticides, via divers processus de transfert. Le risque d'impact évolutif est particulièrement élevé dans les milieux fermés et chez les organismes à cycle de vie entièrement aquatique, car les processus locaux y sont favorisés : adaptation locale, fardeau de dérive génétique locale. Les effets liés à la dérive génétique sont des facteurs de risque d'extinction des populations (baisse de diversité génétique, accumulation du fardeau de mutations, consanguinité accrue, etc.). L'adaptation, bien que positive en soi, peut aussi avoir des conséquences néfastes (perte de variabilité génétique aux traits de réponse, dégradation de l'adaptabilité à d'autres forces sélectives, coût de fitness). Enfin, les contaminants peuvent avoir des effets trans-générationnels non génétiques (Vandeghechuchte et Janssen, 2011).

L'étude présentée vise à explorer les possibilités d'utilisation d'indices de génétique quantitative pour l'évaluation du risque écologique. Elle porte sur l'effet de l'exposition à des pesticides sur les performances de croissance à la génération suivante, en réponse à un gradient de stress biotique calibré, chez le mollusque gastéropode d'eau douce *Lymnaea stagnalis*. Les questions posées sont les suivantes : (1) des conditions réalistes d'exposition aux pesticides peuvent-elles entraîner des performances de fitness divergeant entre lignées au sein des populations ? (2) quel est le potentiel de réponse adaptative pour les traits liés à la valeur sélective ? (3) l'exposition parentale affecte-t-elle la capacité ultérieure de la population à répondre à d'autres facteurs environnementaux ? (Coutellec *et al.*, 2011).

Méthode

Le protocole met en œuvre des lignées expérimentales issues d'une population naturelle (40 lignées isofemelles), caractérisées au préalable pour divers traits d'histoire de vie (THV) au laboratoire (Fig.1). Ces lignées ont été implantées dans des mésocosmes extérieurs, témoins ou soumis à des contaminations successives par divers pesticides représentatifs de deux types de traitements agricoles (Auber *et al.*, 2011). Après 5 mois d'exposition, les individus (G₁ marqués) ont été recapturés et leur descendance a été soumise à un gradient de stress biotique (Fig 1). Pour les THV suivis, la variance familiale a été utilisée pour inférer l'héritabilité et le coefficient de variation génétique, comme indicateurs de potentiel évolutif

de la population. Le second paramètre serait un meilleur indicateur d'évolvabilité, en partie parce qu'il ne dépend pas de la variance environnementale (Houle, 1992). Les interactions G×E ont été recherchées au niveau familial, afin de détecter des différences de norme de réaction et la possibilité d'évolution adaptative pour les traits étudiés. Enfin, le plan expérimental a permis de tester l'influence de l'exposition aux pesticides sur les performances de la descendance face au stress biotique (effets trans-générationnels non génétiques).

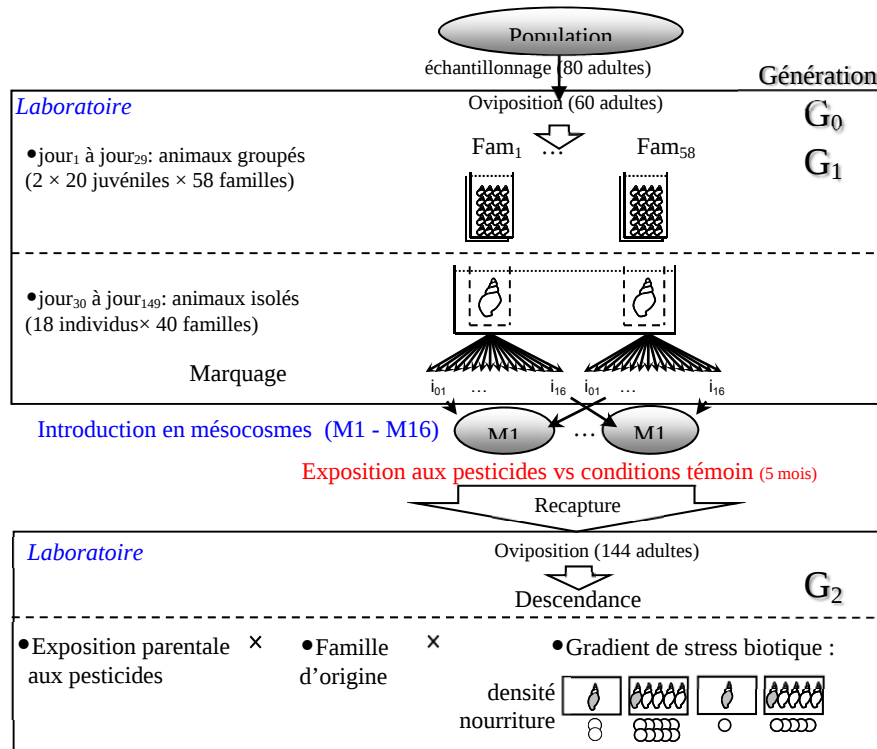


Figure 1. Schéma général du protocole expérimental.

Résultats - Discussion

Hétérogénéité familiale, héritabilité et coefficient de variation génétique

Au laboratoire, la variance inter-famille est significative pour la plupart des traits mesurés, avec une héritabilité au sens large (H^2) allant de 0,09 à 0,67. Ce résultat s'oppose à la faible héritabilité attendue à l'équilibre pour les THV, mais est cependant en accord avec d'autres travaux (Long *et al.*, 2009). Les traits liés à la fitness peuvent maintenir de la variation génétique en raison de mutations ou de forces sélectives opposées ou balancées sur la variation existante (Merilä et Sheldon, 1999). De plus, une faible héritabilité peut résulter non pas d'une variance génétique additive diminuée mais d'une variance environnementale accrue. Les résultats obtenus chez *L. stagnalis* sont donc compatibles avec la théorie, et montrent un fort potentiel adaptatif de la population pour les traits liés à la fitness. Comparativement, le coefficient de variation génétique (CV_G) reste limité (max = 14,7%), même pour les traits à forte H^2 .

Héritabilité en environnement hétérogène

Le stress peut affecter l'expression de la variabilité génétique et l'héritabilité (Sgro et Hoffmann, 1998). Chez *L. stagnalis*, les résultats concordent entre conditions de laboratoire et mésocosmes (conditions hétérogènes, possiblement stressantes). Aucune relation entre le niveau de stress et l'héritabilité ou le coefficient de variation n'a été détectée. Cette absence de relation peut avoir plusieurs causes : baisse de puissance expérimentale, forte variance génétique même en conditions bénignes, considération erronée des niveaux de stress. L'étude montre des interactions G×E significatives en G₁ (interaction pesticide × famille pour la taille des pontes et leur taux d'éclosion) et en G₂ (interaction stress biotique ×

famille pour la croissance juvénile et la taille adulte maximale). Ces résultats indiquent l'existence de normes de réaction différentes au sein de la population étudiée, et montrent qu'une évolution adaptative est possible pour ces traits vis-à-vis des facteurs testés.

Influence de l'exposition parentale sur la réponse de la descendance au stress biotique

L'objectif était de tester si les pesticides pouvaient induire des effets trans-générationnels non génétiques et si ces effets étaient détectables dans la génération G_2 (effet *pesticide*), et sur sa norme de réaction face au stress biotique imposé (interaction *pesticide* × *stress biotique*). Aucun effet de ce type n'a été décelé, en dépit d'un clair effet du gradient de stress biotique.

Conclusion

La contribution génétique à la variance phénotypique de traits d'histoire de vie a été étudiée chez *L. stagnalis*, sous diverses conditions environnementales dont certaines stressantes. Les effets négatifs de la réduction de nourriture et de l'intensification de la compétition se sont avérés significatifs sur la croissance (stress biotique, génération G_2). Les pesticides ont affecté différents THV (génération G_1), mais n'ont pas altéré la réponse au stress biotique à la génération suivante. La plupart des traits étudiés ont montré une variance héritable significative, sans relation apparente avec le niveau de stress. Ce résultat, ainsi que les interactions de type $G \times E$ détectées pour les deux types de stress (pesticides et stress biotique), reflètent le potentiel adaptatif des traits étudiés. L'étude dans son ensemble illustre une méthode d'estimation des conséquences éco-évolutives directes ou indirectes d'un stress d'origine anthropique, potentiellement applicable à l'évaluation du risque écologique.

Mots-clés : pesticides, impact évolutif, potentiel adaptatif, *Lymnaea stagnalis*.

Références

- Auber A., Roucaute M., Togola A., Caquet T. 2011. Structural and functional effects of conventional and low pesticide input crop-protection programs on benthic macroinvertebrate communities in outdoor pond mesocosms. *Ecotoxicology* 20: 2042-2055.
- Breitholtz M., Ruden C., Hansson S.O., Bengtsson B.E. 2006. Ten challenges for improved ecotoxicological testing in environmental risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63: 324-335.
- Coutellec M.A., Barata C. 2011. An introduction to evolutionary processes in ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20: 493-496.
- Coutellec M.A., Collinet M., Caquet T. 2011. Parental exposure to pesticides and progeny reaction norm to a biotic stress gradient in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Ecotoxicology* 20: 524-534.
- Hendry A.P., Farrugia T.J., Kinneson M.T. 2008. Human influences on rates of phenotypic change in wild animal populations. *Molecular Ecology* 17: 20-29.
- Hoffmann A.A., Hercus M.J. 2000. Environmental stress as an evolutionary force. *Bioscience* 50:217-226.
- Houle D. 1992. Comparing evolvability and variability of quantitative traits. *Genetics* 130:195-204.
- Long T.A.F., Miller P.M., Stewart A.D., Rice W.R. 2009. Estimating the heritability of female lifetime fecundity in a locally adapted *Drosophila melanogaster* population. *Journal of Evolutionary Biology* 22:637-643.
- Lynch M., Walsh B. 1998. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Association Inc., Sunderland.
- Merilä J., Sheldon B.C. 1999. Genetic architecture of fitness and nonfitness traits: empirical patterns and development of ideas. *Heredity* 83:103-109.
- Reznick D.N., Ghalambor C.K. 2001. The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution. *Genetica* 112-113:183-198.
- Sgro C.M., Hoffmann A.A. 1998. Effects of temperature extremes on genetic variance for life history traits in *Drosophila melanogaster* as determined from parent-offspring comparisons. *Journal of Evolutionary Biology* 11:1-20.
- Vandegheuchte M.B., Janssen C.R. 2011. Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20: 607-624.

Intérêt des modèles mécanistes en écotoxicologie pour l'estimation des effets toxiques, de l'individu à la population

Virginie DUCROT et Laurent LAGADIC

INRA, Equipe Ecotoxicologie et Qualité des Milieux Aquatiques, UMR985 Ecologie et Santé des Ecosystèmes, Agrocampus Ouest, 65, rue de Saint Brieuc, F35042 Rennes Cedex
virginie.ducrot@rennes.inra.fr

Introduction

Actuellement, l'évaluation du risque des produits chimiques repose majoritairement sur l'étude des effets au niveau des individus *via* des bioessais en laboratoire et l'analyse statistique de ces données. Cette démarche présente un grand nombre de limites, notamment au niveau de l'interprétation des concentrations sans effet observé (NOEC). En effet, la valeur de NOEC dépend entièrement du plan d'expérience utilisé pour les bioessais (e.g. gamme de concentrations testées, durée du test, critère d'effet étudié, nombre de réplicats, nombre d'individus par réplicat, test statistique utilisé pour traiter les données). Il est possible de dépasser ces limites en utilisant la modélisation.

Les modèles statistiques de régression non linéaire (e.g. logit, probit, Weibull) permettent de calculer des concentrations générant x% d'effet sur l'échantillon étudié (ECx). Les ECx sont plus fiables que les NOEC car elles permettent de prendre en compte l'ensemble des résultats de la courbe de toxicité dans le calcul de la valeur seuil. Elles dépendent moins du plan d'expérience que les NOEC (e.g. elles ne correspondent pas une à des concentrations testées) et elles sont moins variables d'une étude à l'autre (pour une même espèce et un même produit) que les NOEC. Cependant, le modèle de régression utilisé est généralement choisi de façon arbitraire, sans fondement biologique. Or, lorsque x est faible, la valeur de la ECx dépend beaucoup du modèle de régression utilisé et l'incertitude autour de cette valeur augmente. Afin d'obtenir des estimations de la ECx précises et concordantes d'un modèle de régression à l'autre, ce sont donc généralement les EC50 qui sont calculées. Les ratios PEC/EC50 sont ensuite utilisés comme base pour l'évaluation du risque d'un produit. Cependant, les EC50 correspondent par définition à un niveau d'effet important sur les individus, qui peut générer des effets significatifs sur les populations (e.g. modification de la structure d'âge, diminution de l'effectif, et ce même si la valeur du ratio PEC/EC50 est inférieure à 1 (indiquant une absence de risque du produit). Au vu des arguments précédents, il semble plus pertinent d'essayer de déterminer la concentration sans effet du toxique sur l'organisme. Cette concentration, la EC0, ne peut pas être déterminée statistiquement de façon fiable. Enfin, tout comme pour les NOEC, les valeurs des ECx dépendent de la durée de l'essai. En conséquence, l'exposition des organismes à des concentrations inférieures à ECx pendant des durées plus longues que la durée de l'essai ayant servi à calibrer le modèle sont susceptibles de générer des effets sur l'organisme.

Dans ce contexte, il apparaît que les modèles toxicocinétique-toxicodynamique sont les mieux adaptés à cette analyse dans le contexte de l'évaluation du risque. En se basant sur les propriétés physico-chimiques des produits et la biologie des organismes étudiés, ils décrivent les processus physiologiques impliqués dans (i) l'absorption/l'élimination du produit par l'organisme et (ii) sa réponse à la présence du produit dans ses tissus. Cette dimension mécaniste permet d'intégrer l'ensemble des connaissances relatives à la toxicité des produits, à la sensibilité de l'espèce étudiée et à ses capacités de récupération. Par ailleurs, ces modèles permettent de prédire les effets du produit étudié sur les performances individuelles au cours du temps, en fonction du profil d'exposition, et facilitent l'extrapolation des effets attendus au niveau des populations. Ces avantages sont illustrés au travers d'un exemple d'utilisation des modèles DEBtox (basés sur la théorie du budget énergétique dynamique) pour analyser les effets d'un herbicide chez un gastéropode herbivore : la limnée des étangs.

Etude de cas : modélisation des effets du diquat sur la survie d'un gastéropode aquatique herbivore, la limnée des étangs

Le modèle de DEBtox est un modèle générique basé sur la physiologie des organismes. Il a été spécifiquement mis au point à partir de la théorie DEB pour l'analyse des données issues de tests de

survie, de croissance et de reproduction en laboratoire. Les hypothèses du modèle reposent sur l'observation suivante, simple mais réaliste car démontrée expérimentalement : l'élimination du toxique présent dans le corps de l'animal, la mise en œuvre de mécanismes de défense contre le produit et la réparation des dégâts causés par ce toxique ont un coût énergétique important. Ce surcoût énergétique est prioritaire par rapport aux autres dépenses d'énergie, ce qui induit une diminution de la quantité d'énergie allouée aux grandes fonctions physiologiques (e.g. croissance et reproduction) et des modifications des règles d'allocation de l'énergie à ces fonctions. Ces dérèglements de l'allocation énergétique sont à l'origine d'une diminution des performances individuelles, dont l'intensité dépend seulement de la concentration en produit dans le milieu (les autres paramètres du milieu étant constant lors des bioessais). Ce modèle a été validé pour de nombreux produits toxiques chez diverses espèces de vertébrés et d'invertébrés, si bien que les sorties du modèle (et notamment la concentration sans effet ou NEC) sont utilisables en évaluation du risque depuis 2006. Les modèles DEBtox sont basés sur les hypothèses toxicologiques suivantes :

- les processus d'absorption et d'élimination du produit par l'organisme sont appréhendés de façon dynamique (modèle toxicocinétique à un compartiment : l'absorption du composé est proportionnelle à sa concentration en solution, et son élimination est proportionnelle à sa concentration interne). La variation de concentration interne en toxique au cours du temps est responsable des effets observés ;

- la concentration interne peut augmenter sans provoquer d'effets jusqu'à une concentration seuil. Au-delà de ce seuil, les capacités de défense de l'organisme sont insuffisantes par rapport au niveau de contamination et des effets macroscopiques apparaissent sur les performances individuelles. Chaque molécule de toxique exerce un effet d'intensité similaire. L'intensité des effets est donc linéairement proportionnelle à la différence au cours du temps entre la concentration interne et le seuil ;

- mathématiquement, les effets toxiques se traduisent par une modification de la valeur des paramètres du modèle DEBtox chez les individus exposés par rapport aux témoins (Fig. 1).

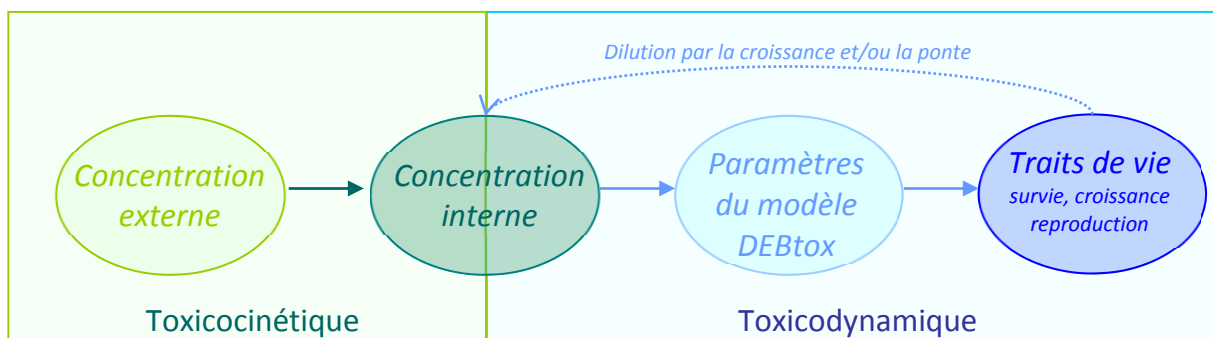


Figure 1. Schéma conceptuel représentant les différentes étapes de la modélisation des effets toxiques à l'aide du modèle DEBtox.

Ce modèle a été utilisé pour analyser les données issues d'un test de toxicité sur le cycle de vie complet de la lymnée des étangs, *Lymnaea stagnalis*. Depuis le stade embryonnaire, les animaux ont été régulièrement exposés à une gamme de concentration en diquat (5 - 10 - 20 - 40 - 80 - 160 - 320 µg/L), selon un scénario de traitement réaliste en termes de concentration et de fréquence d'application (concentration maximale autorisée pour l'application comme herbicide de faucardage = 224 µg/L). La survie, le développement embryonnaire, la croissance, la consommation de nourriture, l'acquisition de la maturité sexuelle, la fécondité et la qualité des descendants ont été évalués durant un an dans deux populations de lymnées génétiquement différenciées (i.e. 8 individus fondateurs provenant de 2 lignées différentes, soit une taille efficace de 4,67 dans la population A ; 80 fondateurs issus de 80 lignées différentes soit une taille efficace de 80 dans la population B). Nous présentons ici les résultats relatifs à la survie des animaux du stade juvénile au stade adulte.

Résultats et conclusions

Le diquat génère 100% de mortalité embryonnaire dès 40µg/L : la survie des juvéniles n'a été donc évaluée que pour les concentrations comprises entre 5 et 20 µg/L. Le modèle de toxicocinétique permet de confirmer que ce produit ne se bioaccumule pas dans les tissus des lymnées. Cependant, la survie des juvéniles est significativement affectée par la présence de l'herbicide aux concentrations supérieures ou égales à 10 µg/L, et de façon relativement similaire dans les deux populations testées. Ce résultat est contraire à nos hypothèses de travail : nous attendions une plus forte sensibilité au

sein de la population A, du fait de sa plus faible taille efficace (pouvant être mise en relation avec une plus faible variabilité génétique inter-individus, une accumulation du fardeau génétique et un taux de consanguinité plus élevé dans cette population). L'étude comparative des réponses sublétales au diquat dans les deux populations apportera des informations complémentaires quant au rôle des caractéristiques génétiques dans la sensibilité des populations.

Le modèle de survie permet de décrire de façon fiable les effets sur la survie au cours du temps dans la population B, et ce pour toutes les concentrations testées (Fig. 2.). La concentration sans effet du diquat sur la survie des animaux issus de cette population a été estimée à 1.05 [1.0 ; 1.7] μg diquat /L dans la population B, contre 1.75 [1.15 ; 2] dans la population A : le modèle de survie confirme donc qu'il n'y a pas de différence de sensibilité entre les populations.

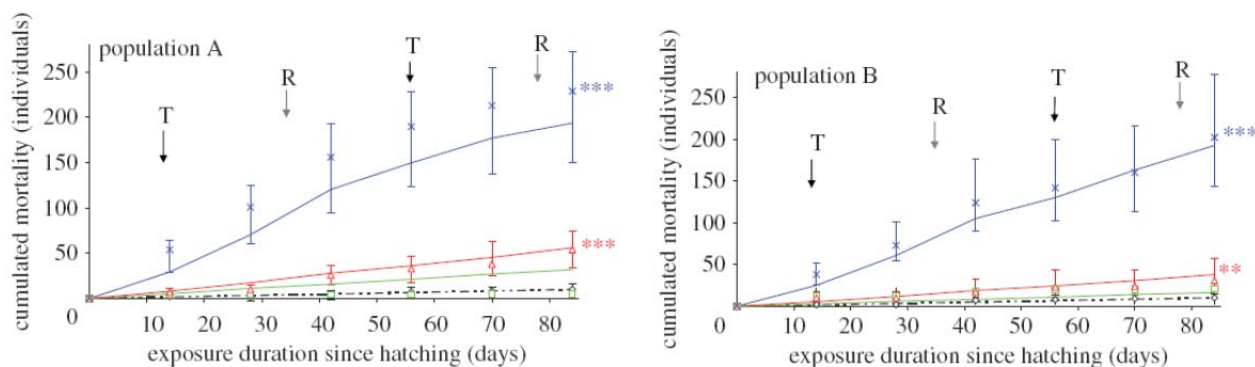


Figure 2. Etude de la mortalité cumulée chez des juvéniles de *Lymnée* exposés au diquat (points : données ; lignes : modèle DEBtox survie ; noir : témoins ; vert : 5 $\mu\text{g/L}$; rouge : 10 $\mu\text{g/L}$; bleu : 20 $\mu\text{g/L}$).

Dans le cas de la population A, le modèle surestime les effets de l'herbicide sur la survie pour la concentration la plus faible (5 $\mu\text{g/L}$) et tend à surestimer les effets observés à la plus forte concentration testée (20 $\mu\text{g/L}$). Cette erreur du modèle est corrélée aux effets du diquat sur le comportement alimentaire des animaux exposés : surconsommation de nourriture par rapport aux témoins chez les animaux exposés à 5 $\mu\text{g/L}$, et sous-nutrition chez les animaux exposés à 20 $\mu\text{g/L}$. Ce résultat a permis de mettre en évidence l'importance du facteur alimentaire dans la sensibilité à l'herbicide chez ce gastéropode herbivore. Etant donné que le modèle DEB est basé sur des hypothèses bioénergétiques, il permet de prendre en compte le facteur « nourriture » lors de l'analyse des données de bioessais, et d'éviter ainsi une interprétation erronée des résultats du test de toxicité à l'échelle de la population.

En conclusions, l'exposition répétée au diquat génère des effets sur les traits de vie liés à la valeur sélective chez *L. stagnalis* dès 5 $\mu\text{g/L}$, soit vingt fois moins que la dose d'application recommandée pour le faucardage des mares. Les concentrations d'application autorisées ayant été définies à partir de bioessais court terme, notre résultat confirme la nécessité d'utiliser les résultats de test de toxicité chronique dans le contexte de la réévaluation du diquat par les états membres en 2012. Les modèles toxicocinétique-toxicodynamique sont les outils les mieux adaptés pour mener à bien ce travail : ils permettent d'interpréter les données de bioessais de façon fiable, et leurs données de sortie (*i.e.* valeur des traits de vie individuels en fonction de la concentration et de la durée d'exposition ; concentrations sans effets sur chacun des traits de vie) sont directement utilisables pour extrapoler les effets attendus au niveau des populations, comme le requiert la directive. Le modèle DEB s'avère particulièrement intéressant dans ce contexte puisqu'il permet de prendre en compte l'influence de certains déterminants de la réponse aux toxiques, comme le comportement alimentaire des animaux exposés.

Mots-clés : modélisation, évaluation du risque, exposition, invertébrés, pesticides



4^{ème} Séminaire d'Ecotoxicologie
7-9 novembre 2011 – St Lager

Session 3

Altérations de la dynamique des populations et des communautés

Application des techniques de microrespirométrie pour la caractérisation écotoxique microbienne (traits physiologiques et PICT) de sols contaminés par des métaux lourds

Annette BÉRARD¹, Christophe MAZZIA², Valérie SAPPIN-DIDIER³,
Yvan CAPOWIEZ⁴

¹UMR INRA/UAPV 1114 EMMAH, Site Agroparc, F-84914 Avignon Cédex 9

²UMR 406 INRA/UAPV, Site Agroparc, 84914 Avignon Cédex 9

³UMR 1220 TCEM, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon cedex

⁴UR 1115 INRA PSH, Site Agroparc, F-84914 Avignon Cédex 9

annette.berard@paca.inra.fr

Introduction

Les communautés microbiennes (com. mic.) participent directement à la qualité biologique des sols en agissant sur leur fertilité chimique, leurs conditions sanitaires microbiennes et chimiques, ainsi que sur leur structure et stabilité, et présentent une très grande diversité spécifique et fonctionnelle (Pankhurst 1997). Ainsi, ce sont des indicateurs édaphiques particulièrement pertinents (Boivin et al. 2002). Cependant, peu d'outils existent qui permettent d'utiliser ces communautés comme indicateurs d'écotoxicité dans les sols. La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) est basée sur le concept qu'une communauté biologique exposée à un toxique, sera sélectionnée et s'adaptera à celui-ci, acquerrant ainsi une tolérance accrue vis-à-vis de ce toxique (si on la compare à une « même » communauté non exposée). Cet outil d'écotoxicité associant structure et fonction à l'échelle de la communauté, a été largement utilisé dans les écosystèmes aquatiques (e.g. Bérard et al. 2002, Tlili et Montuelle 2011) ; il l'a été moins dans les écosystèmes édaphiques (Boivin et al. 2002), en partie pour des raisons méthodologiques. Les mesures de respirométrie des sols ont récemment été utilisées pour évaluer sous forme de bioessais d'activité catabolique, la tolérance à un toxique (Witter et al. 2000). Mais ces mesures impliquant des analyses en chromatographie gazeuse, sont très coûteuses en temps et difficilement applicables à de nombreux échantillons. Campbell et al. (2003) ont mis au point une technique de microrespirométrie (MicroRespTM) permettant de travailler simultanément sur de nombreux échantillons de sols, mais cette technique n'a encore, à notre connaissance, jamais été utilisée pour mettre en évidence le PICT dans un sol.

Notre objectif est d'appliquer la technique MicroRespTM pour aborder les com. mic. comme indicatrices d'écotoxicité. Nous comparerons la respiration basale, la biomasse, l'état physiologique, la diversité catabolique et la tolérance à un contaminant des com. mic. de différents sols contaminés par des métaux lourds dans un contexte d'épandage de boues d'épuration.

Matériel et méthodes

En 1976, une étude à long terme a été réalisée sur des placettes agricoles de l'Inra de Bordeaux avec l'épandage de boues provenant d'une station d'épuration traitant les effluents d'une usine de production de batteries. Ces boues contenaient des métaux en concentrations élevées (Cd et Ni particulièrement). Les épandages de boues furent arrêtés en 1980. 11 placettes de sols ont été prélevées en 2011 sur une profondeur de 0-10 cm. Ces placettes ont été choisies en fonction de leurs degrés de contamination en métaux : notons que 3 placettes initialement témoins (sans apport direct de boue) ont été contaminées par les placettes adjacentes et contiennent de 7 à 10 ppm de Cd environ dans leurs sols, 2 sols supplémentaires ont été prélevés dans une prairie à proximité du site expérimental et sont considérés comme référence (Tab. 1). Ces échantillons de sol ont été tamisés à 2 mm de

maille, et placés à une humidité correspondant à environ 50% de la WHC (11 % d'humidité massique) pour une préincubation de 6 jours.

Table 1. Concentrations en Cd et paramètres microbiens mesurés dans les sol (CE50 : RegTox).

	Sol	Cd (ppm)	Respiration Basale (µgC-CO ₂ /g sol sec/h)	SIR-Glucose Biomasse (µg C/g sol)	qCO ₂ (mgC-CO ₂ /gC/h)	CE50 Cd ²⁺ (µg/g sol) (intervalle de confiance 5%)
Référence	REF1	0,0	0,13	32,29	3,99	1571 (1236-1976)
	REF2	0,3	0,14	28,48	4,81	1681 (1263-2213)
Témoin initial	C25	7,0	0,12	15,75	7,35	3184 (2200-5386)
	C24	11,1	0,11	21,52	5,12	1339 (1048-1778)
	C31	11,5	0,09	12,16	7,47	5525 (3720-9265)
SEW 10	B10-26	12,1	0,10	13,59	7,60	6088 (3969-12550)
	B10-22	19,2	0,09	13,24	7,06	4439 (2844-9016)
	B10-29	31,9	0,11	18,00	6,01	5690 (4003-9390)
SEW 100	B100-23	81,7	0,09	10,64	8,91	4324 (2890-7240)
	B100-28	86,3	0,11	12,43	8,50	11391 (3963-244841)
	B100-30	107,2	0,10	11,53	9,10	10961 (4374-94171)

Deux types de mesures ont donc été réalisées à l'aide de la technique MicroRespTM : (i) des mesures caractérisant les com. mic. d'un point de vue biomasse (SIR-Glucose, Anderson et Domsch, 1985), respiration basale (RB), quotient métabolique (qCO₂) indicateur physiologique (Anderson et Domsch, 1985) et profil catabolique (CLPP) indicateur de diversité fonctionnelle. (ii) des bioessais, permettant d'évaluer la tolérance acquise de ces communautés autochtones vis-à-vis du Cd présent en grande quantités dans ces différents sols (PICT). La technique MicroRespTM permet de miniaturiser les mesures de respiration induites par différents substrats carbonés (SIR sur 11 substrats, 30 mgC/g eau de sol) et mesure de respiration basale (avec eau) en distribuant de manière volumétrique des échantillons de sol dans une microplaque (96 puits) à puits profonds, celle-ci ayant déjà reçu les substrats sous forme dissoute dans l'eau. L'incubation de 6 heures se fait après avoir placé un joint en silicone (individualisant les puits) et une microplaque ayant dans chacun de ses 96 puits, un indicateur coloré sensible au pH (rouge de crésol) pris dans un gel d'agarose. La lecture de cette plaque supérieure de détection (spectrophotomètre de 570 nm) permet d'estimer la concentration en CO₂ dans le système (après calibration avec GC) et donc d'évaluer la production de CO₂ par le sol. Pour appliquer la méthode PICT, nous avons introduit dans les puits profonds de la microplaque inférieure, 25 µl de 7 concentrations croissantes en Cd (52 - 3372 µg Cd²⁺/g sol). Nous avons ensuite distribué le sol selon le système MicroRespTM (3 réplicats par concentration) et préincubé le sol pendant 15 heures (obscurité, 25°C), ceci pour permettre l'évacuation de CO₂ éventuellement lié à des dégagements rapides d'origine géochimique et de favoriser la biodisponibilité du métal

pour les microorganismes (Tlili et al. 2011). Les puits reçoivent ensuite individuellement 25 µl de Glucose et le système avec joint et plaque de détection est installé pour une incubation de 6 heures. Les mesures de densité optique de la plaque de détection sont réalisées en début et fin d'incubation.

Résultats et discussions

Nos résultats montrent que les sols les plus contaminés se différencient d'un point de vue profils cataboliques (Fig.1) des autres sols et présentent les biomasses et respirations les plus faibles et les qCO_2 et $CE50_{Cd}$ les plus élevés (Tab. 1, Kruskal-Wallis tests; $p \leq 0.05$), indiquant un effet important des contaminations sur les com. mic., leur tolérance et leurs traits physiologiques.

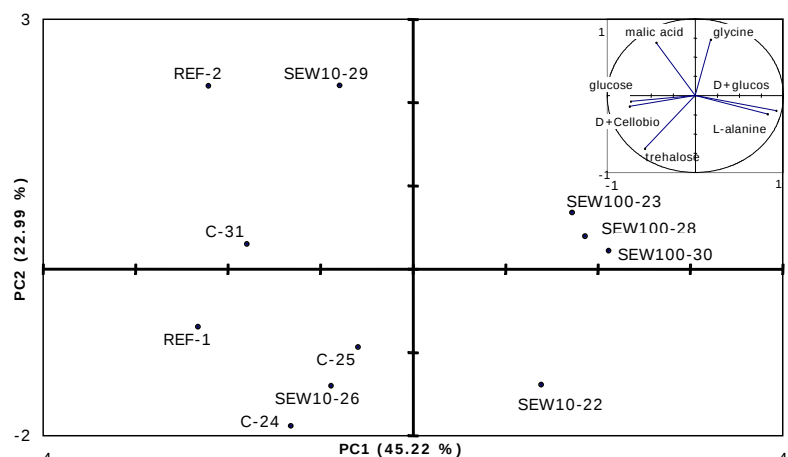


Figure 1. ACP réalisée sur les CLPP des différents sols étudiés (moyennes de 4 réplicats)

exemple d'utilisation du MicroRespTM pour appliquer le PICT aux communautés microbiennes des sols.

Mots-clés : communautés microbiennes, PICT, MicroRespTM, sol, métaux lourds

Références

- Anderson J.P.E., Domsch K.H. 1985. Maintenance carbon requirements of actively-metabolizing microbial populations under in situ conditions. *Soil Biol. Biochem.* 17, 197-203.
- Bérard A., Dorigo U., Humbert J.F., Leboulanger C., Seguin F. 2002. Application of the pollution-induced community tolerance (PICT) method to algal communities: its values as a diagnostic tool for ecotoxicological risk assessment in the aquatic environment. *Annales de Limnologie* 38: 247-261.
- Boivin M. E. Y., Breure A. M., Posthuma L., Rutgers M. 2002. Determination of field effects of contaminants - Significance of pollution-induced community tolerance. *Human and Ecol. Risk Assess.* 8:1035-1055.
- Campbell C.D., Chapman S.J., Cameron C.M., Davidson M.S., Potts J.M. 2003. A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil. *Appl. Environm. Microbiol.* 69, 3593-3599.
- Pankhurst C.E. 1997. Biodiversity of soil organisms as an indicator of soil health, in: Pankhurst C.E., Doube B.M., Gupta V.V.S.R. (Eds.), *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International, pp. 297-325.
- Tlili A, Marechal M, Montuelle B, Volat B, Dorigo U, Bérard A (2011) Use of the MicroRespTM method to assess pollution-induced community tolerance to metals for lotic biofilms. *Environ Pollut* 159:18-24.
- Tlili A, Montuelle B. 2011. Microbial pollution-induced community tolerance. In: Amiart-Triquet C, Rainbow PS, Romeó M (eds) *Tolerance to environmental contaminants*. CRCpress, Boca Raton, pp 65-108.
- Witter E., Gong P., Baath E., Marstorp H. 2000. A study of the structure and metal tolerance of the soil microbial community six years after cessation of sewage sludge applications. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 1983-1991.

ECOFUN-MICROBIODIV : un programme européen pour développer et évaluer des outils pour mesurer l'impact de pesticides sur les microorganismes des sols

Irène FRIEDEL¹, Jérémie BEGUET¹, Ellen KANDELER², Dimitrios KARPOUZAS³, Ines PETRIC⁴, Simonida DJURIC⁵ et Fabrice MARTIN-LAURENT¹

¹UMR 1229 MSE, INRA, 17 rue Sully, BP 86510, F-21065 Dijon Cedex

²Université d'Hohenheim, Stuttgart

³Université de Thessalonique, Thessalonique, Grèce

⁴Institut Rudjer Boskovic, Zagreb, Croatie

⁵Faculté d'Agriculture, Novi Sad, Serbie

fabrice.martin@dijon.inra.fr

Les microorganismes du sol jouent un rôle clef dans les cycles biogéochimiques. Les pratiques agricoles, incluant les traitements phytosanitaires, doivent garantir un impact minimal sur les fonctions écosystémiques remplies par les microorganismes du sol. Selon les directives européennes 91/414/EEC et 2006/388, concernant l'homologation des pesticides, la toxicité des pesticides sur les microorganismes du sol est simplement évaluée au travers de tests de minéralisation de l'azote et du carbone (OECD 216, 217). Ces tests globaux ne fournissent pas un éclairage suffisant de leur toxicité vis-à-vis des microorganismes du sol. Par conséquent, il est nécessaire de développer des outils d'évaluation plus intégratifs et compréhensifs pour estimer l'impact des pesticides sur les microorganismes du sol. Le programme européen ECOFUN-MICROBIODIV (FP7, ERA-NET) s'inscrit dans ce contexte. Il vise à développer et à évaluer des outils innovants permettant d'estimer l'impact écotoxicologique d'herbicides faiblement dosés (sur la composante microbienne des sols. Ce programme coordonné par l'INRA se repose sur un consortium européen comprenant des équipes Allemande, Croatie, Grec, Française et Serbe. Il est en lien direct avec la commission écotoxicologie terrestre de l'AFNOR et de la commission miroir à l'ISO afin d'identifier les méthodes pouvant être standardisées. Les avancées d'ECOFUN-MICROBIODIV seront présentées par le coordonateur.

http://www4.inra.fr/ecofun_microbiodiv

Mots-clés : écotoxicologie, pesticide, impact

Effet d'apports répétés de produits résiduels organiques sur la réponse de bioindicateurs : intérêt de dispositifs de longue durée

Sabine HOUOT¹, Guénola PERES², Mickaël HEDDE³, Samuel DEQUIEQT⁴, Rémy CHAUSSOD⁴, Cécile VILLENAVE⁵, Benjamin PAUGET⁶, Jérôme CORTET⁷, Nathalie CHEVIRON³, Marina Le GUEDART⁸, Isabelle GATTIN⁹, Thierry BEGUIRISTAIN¹⁰, Antonio BISPO¹¹, Valérie SAPPIN-DIDIER¹²

¹INRA-AgroParisTech UMR 1091 EGC, F-78850 Thiverval-Grignon

²UMR EcoBio, Université de Rennes1 –CNRS, Station Biologique, F-35380 Paimpont

³INRA UR 251 PESSAC, route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles cedex

⁴INRA UMR 1229 MSE, 17 Rue Sully, F-21065 Dijon

⁵UMR 210 Eco&Sols, Batiment 12, 2 Place Viala, F-34060 Montpellier cedex 2

⁶UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA, Chrono-Environnement, Place Leclerc, F-25030 Besançon cedex

⁷Laboratoire Sols et Environnement, ENSAIA, 2 avenue de la Forêt de Haye, BP 172, F-54505 Vandœuvre lès Nancy

⁸UMR 5200 CNRS, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146, rue Léo Saignat, Case 92, F-33076 Bordeaux Cédex

⁹Laboratoire Biosol, ESITPA, 3 rue du Tronquet, CS 40118, F-76134 Mont-Saint-Aignan cedex

¹⁰UMR 7137 LIMOS CNRS Nancy Université, Faculté des Sciences, Boulevard des Aiguillettes, BP 70239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex

¹¹ADEME, 20 avenue du Grésillé, BP 90406, F-49004 Angers cedex 01

¹²UMR 1220 TCEM, INRA, Avenue E. Bourleau, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon
sabine.houot@grignon.inra.fr

Le recyclage de produits résiduels organiques (PRO) en agriculture permet la valorisation des éléments nutritifs qu'ils contiennent. Cette pratique permet également de relever le niveau de matière organique dans des sols déficitaires. Cependant, les PRO peuvent être également vecteurs de contaminants organiques et inorganiques qui peuvent dégrader la qualité des sols, en particulier leur fonctionnement biologique. Ces effets bénéfiques, mais également la contamination éventuelle des sols ne s'observent qu'après des apports répétés de PRO. L'INRA coordonne un réseau de sites d'apports répétés de PRO dans lesquels ces effets peuvent être évalués : le SOERE-PRO (Système d'Observation et d'Expérimentation pour la Recherche en Environnement). Le programme « Bioindicateurs » de l'ADEME a pour objectifs de développer des indicateurs biologiques de la qualité des sols répondant de façon intégrée à des pratiques culturales ou à des niveaux de contamination. Les résultats présentés concernent la réponse des bioindicateurs aux apports répétés de différents composts d'origine urbaine dans un des sites du SOERE-PRO. Globalement, les effets observés sont plutôt liés aux modifications du fonctionnement des cycles biogéochimiques du C et du N, aux modifications des caractéristiques du sol telles que le pH qu'à l'augmentation des teneurs en contaminants dans les sols.

Mots-clés : composts, sol, bioindicateurs, faune, microflore

Nécessité d'essais à long terme pour évaluer l'impact des systèmes de culture sur les vers de terre

Céline PELOSI¹, Michel BERTRAND²

¹UR251 PESSAC, INRA, Route de St-Cyr, 78026 Versailles cedex
²UMR211 Agronomie, INRA/AgroParisTech, 78850 Thiverval-Grignon
celine.pelosi@versailles.inra.fr

Introduction

Les vers de terre remplissent d'importantes fonctions agroécologiques puisqu'ils participent à l'évolution de la matière organique et de la structure du sol. Ils sont des indicateurs de la biodiversité, de la fonctionnalité et de la qualité du sol et peuvent servir d'outil pour évaluer l'impact des systèmes de culture (1). Bouché, 1972 (2) distingue trois catégories écologiques de vers de terre, basées sur des critères morphologiques, comportementaux et écologiques. Les anéciques sont des vers pigmentés de grande taille qui vivent dans des galeries verticales permanentes et se nourrissent de matière organique en surface et/ou contenue dans le sol. Les endogés sont des vers non pigmentés, de taille moyenne, vivant généralement dans les premiers centimètres de sol où ils construisent un réseau de galeries sub-horizontales. Ils se nourrissent de la matière organique contenue dans le sol. Enfin, les épigés sont des vers pigmentés de petite taille qui vivent dans la litière de surface et se nourrissent des matières organiques en décomposition dans cette litière. Ils sont donc particulièrement exposés aux aléas climatiques, à la prédation et aux opérations culturales comme les applications de pesticides.

La compensation de la perte de biodiversité due à l'intensification des pratiques agricoles est un enjeu environnemental majeur qui nécessite la mise en place de nouveaux systèmes de culture. Dans ce contexte, il est nécessaire d'étudier l'impact de ces systèmes alternatifs sur la biodiversité. Les systèmes de culture sans labour et/ou avec une couverture végétale sont connus pour favoriser les populations de vers de terre, principalement les espèces de grande taille et/ou se nourrissant à la surface du sol (3 ; 4). Les résultats sur les effets des intrants chimiques, et en particulier des pesticides, au champ, sont plus contrastés. Ils sont parfois difficilement interprétables en raison des confusions d'effets, par exemple avec des applications de fumier (5). De plus, ces effets sont souvent étudiés au cours d'essais dont on ne connaît pas l'historique avec précision ou qui n'ont été mis en place que quelques années (3 à 6 ans) avant les prélèvements (6 ; 7).

Dans une étude antérieure (8), la densité, la biomasse et la diversité de vers de terre ont été mesurées à l'automne 2005, 2006 et 2007 sur trois systèmes de culture d'un essai de longue durée : un système sous couvert végétal permanent (SCV), un système biologique (BIO) et un système conventionnel (CONV). Sur la période 2005-2007, la diversité ainsi que la densité et la biomasse des épigés et des anéciques étaient supérieures pour le système SCV. Les endogés, quant à eux, étaient plus nombreux dans les systèmes BIO et CONV. Ces deux derniers systèmes ne présentaient aucune différence de densité, de biomasse ni de diversité. Ces résultats pouvaient être attribués aux ressources nutritives disponibles pour les vers de terre, moins importantes en BIO qu'en CONV, en raison des rendements inférieurs. De plus, les substances actives utilisées dans le système CONV présentaient une toxicité aiguë faible pour *Eisenia fetida* (9).

D'après Tebrügge et Düring, 1999 (3), il existe une période de transition de plusieurs années pour passer d'un système conventionnel à un système alternatif, durant lequel le système va vers un état d'équilibre. Une nouvelle campagne de mesure a donc été conduite au printemps 2011. Le but de cette étude est de déterminer si les conclusions obtenues à l'issue de la première série de mesure sont toujours valides quatre ans plus tard ou si les effets des différents systèmes de culture continuent de se manifester.

Matériel et méthodes

L'essai est implanté sur la parcelle de La Cage (INRA de Versailles-Grignon) depuis 1997. Les principales caractéristiques des trois systèmes de culture et les précédents culturaux sont présentés dans les tableaux 1 et 2. Les systèmes diffèrent principalement par le travail du sol, la production de

biomasse et l'application de pesticides et de fertilisants. L'essai est divisé en six parcelles d'1 ha, correspondant à 2 réplicats de chaque système. Chaque réplicat est divisé en 2 sous-parcelles et, chaque année, une des deux sous-parcelles est en blé d'hiver. L'autre sous-parcelle est en colza, maïs, luzerne, pois ou lupin.

Système de culture	Sous Couvert Végétal (SCV)	Biologique (BIO)	Conventionnel (CONV)
Labour	Pas	Tous les ans (sauf après légumineuse)	Tous les ans (sauf après légumineuse)
Rendements (moyenne sur les 5 dernières années) (t ha ⁻¹)	6,9	5,6	8,9
Utilisation pesticides	+	0	++
Utilisation fertilisants	+	0	++
Rotation de cultures	Pois, blé, maïs, blé	Colza, blé, pois, blé, luzerne, blé	Colza, blé, pois, blé
Rendement (moyenne des 5 dernières années) (tonnes/ha)	6,9	5,6	8,9
Argile (g kg ⁻¹)	163,8	173,5	179,5
Limon (g kg ⁻¹)	531,0	604,5	629,8
Sable (g kg ⁻¹)	305,5	224,0	215,5
Matière organique (g kg ⁻¹)	21,7	16,5	17,3
CaCO ₃ (g kg ⁻¹)	0,9	0,9	0,9
Rapport C/N	11,2	10,6	10,6
pH	7,0	7,3	7,4

Tableau 1. Résumé des itinéraires techniques, des rendements et des caractéristiques du sol dans les systèmes SCV, BIO et CONV. Les symboles 0 ; + et ++ représentent un gradient : nul, moyen et important, respectivement. Les pesticides utilisés sont des fongicides, herbicides et molluscicides (pas d'insecticides).

Système de culture	SCV	BIO	CONV
Automne 2005	Blé, maïs	Luzerne - luzerne	Blé, colza
Automne 2006	Blé, pois	Blé, colza	Blé, pois
Automne 2007	Pois, blé	Blé, colza	Blé, pois
Printemps 2011	Luzerne, blé + luzerne	Luzerne - luzerne	Blé, pois

Tableau 2. Précédents et antécédents dans les systèmes SCV, BIO et CONV, pour les 4 années de prélèvement.

La densité, la biomasse et la diversité de vers de terre ont été étudiées en 2005, 2006, 2007 et 2011. Les prélèvements ont été réalisés dans la sous-parcelle sur laquelle était cultivé du blé d'hiver, à l'automne pour les années 2005, 2006 et 2007 et au printemps pour l'année 2011. Cinq répétitions ont été réalisées sur chacun des deux réplicats, pour les trois systèmes.

L'échantillonnage des vers de terre au champ combine une extraction chimique avec une solution d'allyl isothiocyanate et un tri manuel du sol, à partir d'un bloc de sol de 40 cm×40 cm×20 cm de profondeur. Les vers de terre, préservés dans du formol à 4%, ont ensuite été pesés, comptés et identifiés à l'espèce à l'aide de la clé d'identification proposée par Sims et Gerard, 1999 (10).

Pour la diversité, les indices de Shannon-Wiener et d'équitabilité ont été calculés (11). Des ANOVA (analyses de variance, permettant d'étudier le comportement d'une variable à expliquer continue en fonction d'une ou plusieurs variables explicatives catégorielle) et des tests de Tukey (tests de comparaison de moyenne) ont été utilisés pour analyser les résultats (12).

Résultats

Les mêmes sept espèces ont été trouvées en 2005-2007 et en 2011 dans les différents systèmes. Il s'agissait de *Lumbricus terrestris*, *Aporrectodea giardi* et *Aporrectodea longa* pour les anéciques, *Aporrectodea caliginosa*, *Aporrectodea icterica* et *Allolobophora chlorotica* pour les endogés et *Lumbricus castaneus* pour les épigés. En 2005-2007, très peu d'individus de l'espèce *Aporrectodea longa* avaient été trouvés donc cette espèce n'apparaît pas dans Pelosi et al., 2009 (8).

En ce qui concerne l'indice de Shannon-Wiener et l'indice d'équitabilité, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les trois systèmes de culture en 2011 (tableau 3) alors que pour 2005-2007, des valeurs significativement plus élevées avaient été mesurées pour le système SCV.

Systèmes	Automne 2005		Automne 2006		Automne 2007		Printemps 2011	
	SW	Equitabilité	SW	Equitabilité	SW	Equitabilité	SW	Equitabilité
SCV	2,03 (0,02) ^b	0,79 (0,01) ^b	2,02 (0,11) ^b	0,89 (0,11) ^b	1,94 (0,11) ^b	0,84 (0,05) ^b	2,03 (0,49) ^a	0,75 (0,14) ^a
BIO	1,55 (0,15) ^a	0,67 (0,06) ^a	1,72 (0,01) ^a	0,76 (0,13) ^a	1,45 (0,03) ^a	0,67 (0,06) ^a	2,30 (0,07) ^a	0,87 (0,03) ^a
CONV	1,40 (0,05) ^a	0,54 (0,01) ^a	1,57 (0,13) ^a	0,64 (0,00) ^a	1,74 (0,11) ^a	0,75 (0,04) ^a	2,10 (0,31) ^a	0,86 (0,06) ^a

Tableau 3. Valeurs moyennes (et écarts-types, entre parenthèses) des indices de diversité de Shannon-Wiener et d'équitabilité dans les trois systèmes de culture, pour les 4 années de prélèvement. Une analyse de variance par colonne (par indice et par an). Les abréviations SCV, BIO, CONV et SW désignent respectivement le système sous couvert végétal permanent, le système biologique, le système conventionnel et l'indice de Shannon-Wiener.

Les densités totales à l'automne 2005-2007 ne diffèrent pas entre les 3 systèmes de culture (tableau 4a). Toutefois, le système SCV présente des densités de vers anéciques et épigés, une diversité et une biomasse supérieures à celles des systèmes BIO et CONV. Aucune différence de densité, de biomasse et de diversité n'est constatée entre les systèmes BIO et CONV (tableaux 3, 4a et b).

a)

Année	Système	TOTAL	Proportion des groupes écologiques		
			% anéciques	% endogés	% épigés
Automnes 2005 - 2007	SCV	120,7 (64,0) a	48 ^b	38 ^a	14 ^b
	BIO	122,3 (99,9) a	14 ^a	82 ^b	4 ^a
	CONV	148,7 (75,8) a	11 ^a	88 ^b	1 ^a
Printemps 2011	SCV	371,9 (139,8) ^b	30 ^b	23 ^a	47 ^b
	BIO	495,0 (141,6) ^b	23 ^b	56 ^b	21 ^b
	CONV	106,9 (30,4) ^a	14 ^a	82 ^a	4 ^a

b)

Année	Système	TOTAL	Proportion des groupes écologiques		
			% anéciques	% endogés	% épigés
Automnes 2005 - 2007	SCV	78,9 (38,2) b	84 ^b	13 ^a	3 ^b
	BIO	37,6 (28,4) a	52 ^a	47 ^b	1 ^a
	CONV	32,1 (19,8) a	40 ^a	60 ^b	< 1 ^a
Printemps 2011	SCV	125,3 (30,5) ^b	70 ^b	18 ^a	12 ^b
	BIO	98,7 (33,0) ^b	71 ^b	22 ^a	7 ^b
	CONV	31,5 (7,3) ^a	40 ^a	58 ^a	2 ^a

Tableau 4. Valeurs moyennes de a) densité (nombre m⁻²) et de b) biomasse (g m⁻²) de vers de terre dans les trois systèmes de culture, pour les prélèvements à l'automne 2005-2007 et au printemps 2011 et proportion des différents groupes écologiques. Une analyse de variance par colonne et par période. Les abréviations SCV, BIO et CONV désignent respectivement le système sous couvert végétal permanent, le système biologique et le système conventionnel.

Au printemps 2011, par rapport à la période 2005-2007, les densités totales ont été multipliées par 3 à 4 en système SCV et BIO mais ont peu varié en système CONV (tableau 4a). Les vers épigés sont généralement faiblement représentés en systèmes cultivés en raison de leur forte exposition aux produits phytosanitaires et de l'absence de matière organique en surface. La densité d'épigés a très fortement augmenté en systèmes BIO et SCV entre les deux périodes. Entre les prélèvements d'automne 2005-2007 et du printemps 2011, la biomasse totale a été multipliée par 1,6 en SCV et par

2,6 en BIO. Au printemps 2011, la densité en BIO est supérieure à celle obtenue en SCV. La densité et la biomasse en CONV n'ont pas évolué entre les deux périodes (tableau 4a et 4b).

Discussion et conclusion

Entre les deux périodes de prélèvement, automne 2005-2007 et printemps 2011, les différents systèmes de culture présentent des évolutions différentes : alors que les effectifs et les biomasses sont similaires en système CONV, ils augmentent fortement dans les systèmes SCV et BIO.

La forte augmentation des populations de vers de terre en BIO pourrait être due à la présence, durant deux années consécutives, de luzerne, susceptible d'influencer positivement la densité de vers de terre (13). Cependant, les précédents en BIO étaient les mêmes en 2005 et il n'y avait pas de telles différences entre le CONV et le BIO.

On peut également penser que l'effet négatif des pesticides appliqués avant la mise en place de l'essai en BIO ont eu des effets négatifs sur les vers de terre jusqu'après la première campagne d'échantillonnage (2005-2007). Cela pourrait être lié aux produits de dégradation de certains pesticides qui peuvent être plus néfastes que les molécules d'origine (14 ; 15) et/ou à l'effet retard de résidus liés de pesticides (16 ; 17). De plus, les études menées en laboratoire révèlent que les pesticides, utilisés aux doses recommandées, ont souvent peu d'effet sur la mortalité mais qu'ils peuvent impacter la croissance et la fécondité des vers de terre (18 ; 19). C'est le cas pour le glyphosate et l'isoproturon, utilisés dans cet essai, qui n'ont pas forcément d'impact négatif sur la survie des vers de terre mais affectent leur croissance et leur fécondité (20 ; 18 ; 21). Ces effets sur les paramètres de vie pourraient avoir des conséquences sur la dynamique des populations de vers de terre à long terme.

La comparaison des systèmes de culture dits 'alternatifs' avec un système conventionnel montre un effet positif du système sous couvert végétal et du système biologique sur les populations de vers de terre. Le labour affecte négativement, rapidement et fortement la survie des vers de terre, ce qui explique que son arrêt (système SCV) ait un effet mesurable et important à court terme (8 ans). Les pesticides peuvent augmenter la mortalité des vers de terre mais ils affectent également d'autres paramètres de vie comme la fécondité et la croissance, et peut-être sur plusieurs générations.

De nouvelles mesures seront réalisées à l'automne 2011 pour confirmer ces conclusions puisque les campagnes d'échantillonnage en 2005-2007 et 2011 n'ont pas eu lieu à la même saison.

Cette étude met en évidence l'intérêt d'essais à long-terme pour évaluer l'impact des systèmes de culture sur les communautés lombriciennes. Dans certaines études (5), les résultats de comparaison de systèmes de culture sont contrastés, peut-être en partie du fait de l'âge différent des systèmes étudiés. Ceux-ci ne seraient pas forcément à l'équilibre puisque d'après Tebrügge et Düring, 1999 (3), une période de transition est nécessaire après la mise en place d'un essai pour que les systèmes atteignent leur état d'équilibre.

Références bibliographiques

- (1) Paoletti M.G., 1999 - The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74 : 137-155
- (2) Bouché M.B., 1972 - Lombriciens de France: Ecologie et Systématique. INRA Annales de Zoologie-Ecologie animale, INRA Publication, France
- (3) Tebrügge F., Düring R.A., 1999 - Reducing tillage intensity - a review of results from a long-term study in Germany. *Soil and Tillage Research*, 53 : 15-28
- (4) Chan K.Y., 2001 - An overview of some tillage impacts on earthworm population abundance and diversity - implications for functioning in soils. *Soil and Tillage Research*, 57 : 179-191
- (5) Hole D.G., Perkins A.J., Wilson J.D., Alexander I.H., Grice P.V., Evans A.D., 2005 - Does organic farming benefit biodiversity? *Biological Conservation*, 122 : 113-130
- (6) Nuutinen, V. Haukka, J., 1990 - Conventional and organic cropping systems at Suittia .7. Earthworms. *Journal of Agricultural Science in Finland*, 62 : 357-367
- (7) Liebig M.A., Doran J.W., 1999 - Impact of organic production practices on soil quality indicators. *Journal of Environmental Quality*, 28 : 1601-1609
- (8) Pelosi C., Bertrand M., Roger-Estrade J., 2009 - Earthworm community in conventional, organic and no-tilled with living mulch cropping systems. *Agronomy for Sustainable Development*, 29 : 287-295
- (9) Agritox, 2005 - <http://www.dive.afssa.fr/agritox/php/fiches.php>

- (10) Sims R.W., Gerard B.M., 1999 - Earthworms. FSC Publications, London
- (11) Lacoste A., Salanon R., 2005 - Eléments de biogéographie et d'écologie. Colin, A. Nathan
- (12) R Development Core Team, 2011 - R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- (13) Larsson H., 1999 - Experiments with leguminous crops in a stockless organic farming system with sugar beets, in: Olesen, J.E., Eltun, R., Gooding, M.J., Jensen, E.S. Kopke, U. (Eds.), Designing and testing crop rotations for organic farming. Proceedings from an international workshop. *Danish Research Centre for Organic Farming (DARCOF)*, Tjele Denmark, pp. 311-317
- (14) Sinclair C.J., Boxall A.B.A., 2003 - Assessing the ecotoxicity of pesticide transformation products. *Environmental Science & Technology*, 37 : 4617-4625
- (15) Gasser L., Fenner K., Scheringer M., 2007 - Indicators for the exposure assessment of transformation products of organic micropollutants. *Environmental Science & Technology*, 41 : 2445-2451
- (16) Doublet J., Mamy L., Barriuso E., 2009 - Delayed degradation in soil of foliar herbicides glyphosate and sulcotrione previously absorbed by plants: Consequences on herbicide fate and risk assessment. *Chemosphere*, 77 : 582-589
- (17) Lerch T.Z., Dignac M.F., Nunan N., Barriuso E., Mariotti A., 2009 - Ageing processes and soil microbial community effects on the biodegradation of soil ¹³C-2,4-D nonextractable residues. *Environmental Pollution*, 157 : 2985-2993
- (18) Mosleh Y.Y., Paris-Palacios S., Couderchet M., Vernet G., 2003 - Effects of the herbicide isoproturon on survival, growth rate, and protein content of mature earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) and its fate in the soil. *Applied Soil Ecology*, 23 : 69-77
- (19) Yasmin S., D'Souza D., 2007 - Effect of pesticides on the reproductive output of *Eisenia fetida*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79 : 529-532
- (20) Springett J.A., Gray R.A.J., 1992 - Effect of repeated low-doses of biocides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa* in laboratory culture. *Soil Biology & Biochemistry*, 24 : 1739-1744
- (21) Correia F.V., Moreira J.C., 2010 - Effects of glyphosate and 2,4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85 : 264-268

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

Laurent LAGADIC¹, Thierry CAQUET¹, Benoît REAL², Igor DUBUS^{3*}, Nicolas SURDYK³, Anne TOGOLA³, Marc ROUCAUTE¹, Arnaud AUBER¹, Caroline GORZERINO¹, Ana ROUCAUTE¹, Marie-Agnès COUTELLEC¹, Virginie DUCROT¹, Alphonse QUEMENEUR⁴, Martine OLLITRAULT⁴, Didier AZAM⁴

¹INRA, Equipe Ecotoxicologie et Qualité des Milieux Aquatiques, UMR 0985 Ecologie et Santé des Ecosystèmes, Agrocampus Ouest, 65 rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes

²ARVALIS - Institut du Végétal, 2 Chaussée Brunehaut, Estrées Mons, BP 70156, 80203 Péronne Cedex

³BRGM, 3 avenue Claude Guillemin, BP36009, 45060 Orléans Cedex 2

⁴INRA, Unité Expérimentale Ecologie et Ecotoxicologie Aquatique, 65 rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes

*Adresse actuelle : FOOTWAYS S.A.S., 10 avenue Buffon, 45071 Orléans Cedex 2

Laurent.Lagadic@rennes.inra.fr

Contexte et problématique

L'utilisation de pesticides peut être à l'origine de la contamination des écosystèmes aquatiques, notamment ceux qui jouxtent les parcelles agricoles. Bien que des progrès aient été réalisés pour l'évaluation des risques liés à l'utilisation des pesticides dans un contexte de pré-homologation (c'est-à-dire avant leur mise sur le marché), de nombreuses incertitudes subsistent en ce qui concerne (i) la caractérisation de l'exposition des organismes et (ii) les effets résultant d'expositions multiples à des mélanges de pesticides sur les organismes aquatiques non cibles et leurs conséquences fonctionnelles sur les écosystèmes aquatiques. En effet, les données disponibles proviennent essentiellement d'études réalisées préalablement à la mise sur le marché des substances et concernent le plus souvent des substances étudiées de manière individuelle en laboratoire ou en mésocosmes. Quelques travaux ont porté sur les effets de mélanges de pesticides, notamment dans le cadre de deux programmes financés par les APR 1999¹ et 2002² du Programme 'Pesticides' du Ministère chargé de l'Ecologie, mais très peu ont étudié les effets d'itinéraires techniques de protection des cultures réellement mis en œuvre, ou bien en prenant seulement en compte la dérive des brouillards de pulvérisation comme voie de contamination (1). Or, la contamination des milieux aquatiques naturels implique de nombreuses substances actives et leurs produits de dégradation, souvent présents de manière simultanée, et des voies de transfert multiples. Financé par le ministère de l'Ecologie suite à l'APR 2006 du programme de recherche 'Evaluation et réduction des risques liés à l'utilisation des pesticides', le programme EMERITAT (*Étude Modélisation-Exposition-Risque d'Itinéraires Techniques en milieu AquaTique*) avait pour objectif l'évaluation des risques des produits phytosanitaires sur des communautés d'organismes aquatiques dans des conditions réalistes d'exposition. L'étude a pris en compte à la fois la diversité des substances actives et les périodes d'application de l'intégralité des pesticides entrant dans les itinéraires techniques de protection phytosanitaire (ITK) préconisés pour la lutte contre les bioagresseurs lors de deux années successives (blé-colza) choisies au sein d'une rotation pois-blé-colza-maïs. Les ITK retenus correspondaient d'une part à une conduite de culture dite "classique" et d'autre part à une stratégie qualifiée de "bas intrants pesticides". Cette dernière intègre différentes actions destinées à réduire le

¹ Modifications structurales et fonctionnelles de communautés d'organismes aquatiques exposées à un mélange d'herbicide et d'adjuvant en mésocosmes lentiques ; 2000-2004. Coord. : G. Lacroix (ENS, Paris).

² Changements d'échelle et évaluation du risque écotoxicologique de mélanges entre substances actives herbicides et adjuvant – CEREMEL ; 2003-2007. Coord. L. Lagadic (INRA, Rennes).

risque lié à l'utilisation des pesticides (réduction de la fréquence de traitement, réduction des doses, substitution de substances actives, décalage des dates de semis). Deux scénarios agropédoclimatiques, correspondant à des sols hydromorphes, ont été définis à partir de deux situations environnementales contrastées, à savoir l'Ouest de la France (site de La Jaillière) et l'Est du Bassin Parisien (site de la Brie), pouvant conduire à des flux différents de substances actives vers les milieux aquatiques. L'objectif principal du programme était d'établir si la mise en œuvre d'une stratégie de type "bas intrants pesticides" permettait ou non de réduire à la fois le risque écotoxicologique et les effets engendrés sur les communautés de microalgues et d'invertébrés, à la fois en termes de structure et d'un point de vue fonctionnel. Au delà, l'exploitation des résultats du programme EMERITAT vise à améliorer les préconisations fournies par les conseillers agricoles afin de prendre en compte de manière réaliste l'impact que peuvent avoir les itinéraires techniques sur les écosystèmes aquatiques et améliorer ainsi la construction de programmes de protection des cultures permettant de lutter efficacement contre la dégradation de la qualité des eaux superficielles.

Matériel et Méthodes

Itinéraires techniques de protection phytosanitaire

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

Modélisation des transferts

Les transferts de substances actives vers les milieux aquatiques sont dépendants de divers phénomènes physiques, chimiques et biologiques depuis la zone d'application vers l'atmosphère, le sol, les eaux souterraines et les eaux de surface. Dans le cadre de cette étude, les transferts issus d'une parcelle drainée vers une pièce d'eau réceptacle ont été simulés *in silico*, pour une succession de trois années climatiques moyennes. Les modèles numériques correspondants ont été appliqués à des sols hydromorphes présents sur les sites de La Jaillière (Ouest de la France) et de la Brie (Est du Bassin Parisien). Pour chacune de ces deux situations agropédoclimatiques, les transferts simulés étaient les pertes par drainage (modèle MACRO), le ruissellement (modèle PRZM) et la dérive de pulvérisation (courbes de Ganzelmeier). Par combinaison des 2 situations agropédoclimatiques et des 2 itinéraires techniques, 4 modalités de traitement ont été définies : "Jaillière Classique" (J.CLA), "Jaillière Bas Intrants pesticides" (J.BIP), "Brie Classique" (B.CLA) et "Brie Bas intrants pesticides" (B.BIP). Pour chacune de ces modalités de traitement, les concentrations hebdomadaires prédites par les modèles ont été utilisées pour contaminer des mares expérimentales (mésocosmes) et étudier, pendant deux années consécutives, les réponses des communautés de microalgues et d'invertébrés.

Expérimentations en mésocosmes

L'étude a été réalisée dans 16 mésocosmes circulaires d'environ 9 m³, situés à l'air libre et soumis aux conditions climatiques naturelles (température, éclairage, précipitations). Trois réplicats étaient utilisés pour chaque modalité de traitement et quatre mésocosmes ont été utilisés comme témoins. La contamination des mésocosmes a été réalisée avec des préparations commerciales lorsqu'il s'agissait d'apports par dérive, alors que des substances actives pures ont été utilisées lorsque les apports étaient issus du drainage et du ruissellement.

Divers paramètres environnementaux et différents compartiments biologiques ont fait l'objet d'un suivi réalisé à l'aide de méthodes développées pour ce type d'expérimentations (2,3). Un suivi permanent de la température de l'air et de l'eau, de la pluviométrie et du rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) a été réalisé. De même, la température, le pH, la concentration en oxygène dissous et la conductivité ont été mesurés chaque semaine dans l'eau des mésocosmes. Des prélèvements d'eau ont été réalisés une fois par mois afin de déterminer les concentrations en ammonium, en nitrates et en orthophosphates. La dynamique des substances actives dans l'eau ainsi que de leurs métabolites a été suivie. Pour cela, des échantillons intégrateurs de l'ensemble de la colonne d'eau ont été prélevés dans tous les mésocosmes traités 24 h après la contamination et dans tous les mésocosmes toutes les 3 semaines. Les résidus de pesticides ont été analysés en GC-MS après extraction liquide-liquide ou en UPLC-MS-MS selon la nature chimique de la substance considérée. Les valeurs de concentrations en résidus ont été utilisées pour déterminer le temps de demi-vie dans l'eau et la concentration pondérée d'exposition pour chaque substance (4). Elles ont aussi été utilisées pour

estimer, à chaque date d'échantillonnage, le niveau de risque associé pour les producteurs primaires et les invertébrés aquatiques par le calcul d'Unités Toxiques (UT).

La concentration en chlorophylle *a* dans l'eau a été déterminée chaque semaine et des prélèvements de périphyton ont été effectués à l'aide de lames de verre suspendues pendant 3 semaines à 20 cm sous la surface de l'eau. L'évolution au cours du temps de l'abondance et de la diversité du zooplancton a été suivie grâce à des prélèvements effectués chaque semaine dans la colonne d'eau des mésocosmes. La communauté de macro-invertébrés a été étudiée grâce à la mise en œuvre d'un échantillonnage stratifié basé sur l'emploi de substrats artificiels et de pièges à émergence. Afin d'évaluer les effets des traitements sur la fonctionnalité écologique des systèmes, une étude de la dynamique de la dégradation de la litière d'aulne (*Alnus glutinosa*) a été mise en place. Pour cela, des lots de feuilles d'aulne collectées en automne et séchées à l'air libre ont été pesés et introduits dans des pochettes à grandes mailles (5 mm) et dans des pochettes à mailles fines (0,25 mm). Dans le premier type de pochettes, la dégradation de la litière est liée à la fois à l'action des macro-invertébrés détritivores et des micro-organismes tandis que dans le second type la dégradation est uniquement liée aux micro-organismes. L'évolution de la masse de feuilles au cours du temps a été utilisée pour estimer le taux de dégradation de la litière, en ajustant aux données un modèle de décroissance exponentielle. Parallèlement, les invertébrés contenus dans les pochettes ont été identifiés et dénombrés.

Résumé des principaux résultats

Modélisation des transferts

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

Effets sur les microalgues et les invertébrés

Dans le cas des itinéraires techniques de protection du blé :

- les substances utilisées dans le cas des conduites de cultures "classiques" ou "bas intrants pesticides" n'ont pas eu d'effet ou n'ont eu que des effets modérés sur les caractéristiques physico-chimiques de l'eau et sur les communautés de microalgues, même si, pour ces dernières, des effets un peu plus marqués ont pu être observés pour les organismes du périphyton exposés aux substances proposées dans l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" lorsque celles-ci atteignent le milieu aquatique au printemps ;
- les substances utilisées dans le cas des conduites de cultures "classiques" ou "bas intrants pesticides" ont été à l'origine d'effets modérés et, le plus souvent, prononcés à court terme sur (i) le zooplancton, impacté par les substances apportées au milieu aquatique à l'automne dans le cas des itinéraires techniques "classiques" et au printemps dans le cas des itinéraires techniques "bas intrants pesticides" et (ii) les insectes émergents, impactés sur la période printemps-été, surtout dans le cas de l'itinéraire technique "bas intrants pesticides" ;
- les substances utilisées dans le cas des conduites de cultures "classiques" ou "bas intrants pesticides" ont été à l'origine d'effets prononcés, y compris sur le long terme, sur les macroinvertébrés benthiques et, corrélativement, sur la dégradation de la litière, ceci traduisant une atteinte fonctionnelle des écosystèmes aquatiques liée à une réduction marquée et durable de l'abondance de nombreux taxons d'invertébrés consommateurs de débris végétaux, (principalement crustacés et mollusques et, dans une moindre mesure, insectes ; Fig. 1).

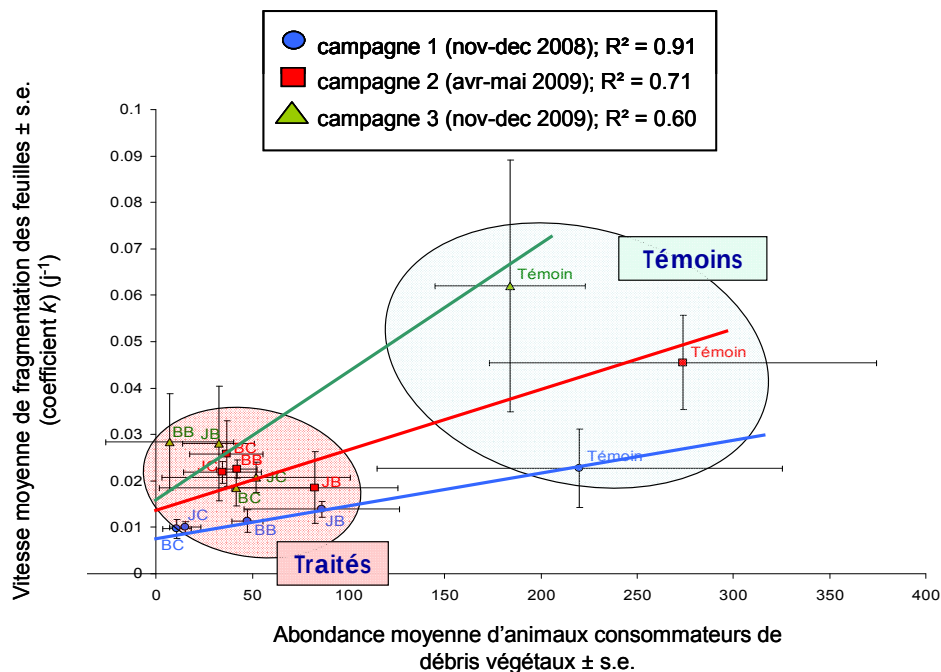


Figure 1. Relation entre la vitesse moyenne de fragmentation des feuilles d'aulne (coefficient k , moyenne $\pm$ s.e.) et l'abondance d'animaux consommateurs de débris végétaux au sein des pochettes à grandes mailles pour chacune des 5 modalités de traitement (Témoin ; JC: Jaillièrre Classique ; BC: Brie Classique ; JB: Jaillièrre Bas intrants pesticides ; BB: Brie Bas intrants pesticides) au cours des trois campagnes d'étude.

Dans le cas des itinéraires techniques de protection du colza :

- l'absence d'effet des substances utilisées dans le cas des conduites de cultures "classiques" ou "bas intrants pesticides" sur les caractéristiques physico-chimiques de l'eau, les communautés de microalgues (phytoplancton et périphyton), et les insectes émergents, même si ces derniers ont été modérément (transitoirement) affectés dans le cas des itinéraires techniques "classiques" ;
- la présence d'effets prononcés, à plus ou moins court terme (*i.e.*, avec ou sans restauration) des substances utilisées dans le cas des conduites de cultures "classiques" ou "bas intrants pesticides" sur le zooplancton, les macro-invertébrés benthiques et la dégradation de la litière (figure 2), ces effets se produisant le plus souvent lors des apports de pesticides à l'automne et en hiver, sauf dans le cas des itinéraires techniques "bas intrants pesticides" où les effets sur les macro-invertébrés benthiques ont été observés sur la période printemps-été.

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

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

- les insecticides pyréthrinoides ; il s'agit plus particulièrement de la bifenthrine (itinéraire "classique") et de la deltaméthrine (itinéraires "classique" et "bas intrants pesticides"), les effets de la lambda-cyhalothrine ayant été en général moins marqués.

- le cyprodinil, fongicide utilisé sur le blé dans le cas des traitements "bas intrants pesticides". L'effet drastique de cette substance est partiellement dû à un surdosage lors du deuxième traitement mais dès la première application les niveaux d'exposition étaient suffisamment élevés pour présenter un risque important pour les communautés d'invertébrés (zooplancton et macroinvertébrés).

Conclusions

Les résultats issus du programme EMERITAT ont permis de comparer différents scénarios d'exposition des eaux de surface représentatifs des systèmes drainés français, selon que la conduite culturale fait appel à des itinéraires de protection phytosanitaire "classiques" ou "bas intrants pesticides". Il apparaît que les itinéraires techniques "bas intrants pesticides", visant à réduire l'utilisation des pesticides, ne donnent pas encore entière satisfaction en termes de réduction des impacts sur les milieux aquatiques. La mise en œuvre d'itinéraires techniques destinés à minimiser l'impact environnemental nécessite donc certaines reconsidérations, notamment en ce qui concerne l'utilisation des insecticides (en particulier la bifenthrine pour la protection du blé, la deltaméthrine pour la protection du colza) et la mise en œuvre d'une substitution de substances dans le cas des fongicides (cas du cyprodinil).

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

Références bibliographiques

- (1) Arts G.H.P., Buijse–Bogdan L.L., Belgers J.D.M., Van Rhenen–Kersten C.H., Van Wijngaarden R.P.A., Roessink I., Maund S.J., Van Den Brink P.J., Brock T., 2006. Ecological impact in ditch mesocosms of simulated spray drift from a crop-protection programme for potatoes. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 2: 105-125.
- (2) Hanson M.L., Graham D.W., Babin E., Azam D., Coutellec M.-A., Knapp C.W., Lagadic L., Caquet Th., 2007. Influence of isolation on the recovery of pond mesocosms from the application of an insecticide. 1. Study design and planktonic community responses. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26: 1265-1279.
- (3) Caquet Th., Hanson M.L., Roucaute M., Graham D.W., Babin E., Lagadic L., 2007. Influence of isolation on the recovery of pond mesocosms from the application of an insecticide. 2. Benthic macroinvertebrates responses. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26: 1280-1290.
- (4) Van Wijngaarden R.P.A., Van den Brink P.J., Crum S.J.H., Oude Voshaar J.H., Brock T.C.M., Leeuwangh P., 1996. Effects of the insecticide Dursban 4E (Active ingredient chlorpyrifos) in outdoor experimental ditches: I. Comparison of short-term toxicity between the laboratory and the field. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15: 1133-1142.

Analyse expérimentale de la réponse de descripteurs structuraux et fonctionnels des communautés de macroinvertébrés aquatiques à une exposition à un fongicide

Yannick BAYONA^{1,2}, Marc ROUCAUTE¹, Kevin CAILLEAUD², Anne BASSERES²,
Laurent LAGADIC¹ & Thierry CAQUET¹

¹INRA, UMR0985 Écologie et Santé des Écosystèmes, Équipe Écotoxicologie et Qualité des Milieux Aquatiques, Agrocampus Ouest, 65 rue de Saint Brieuc, F-35042 Rennes Cedex

²Service Environnement, Total Petrochemicals, Pôle d'Etude et de Recherche de Lacq, BP47, F-64170 Lacq

yannick.bayona@rennes.inra.fr

L'évaluation du risque écotoxicologique des toxiques fait souvent intervenir la mesure de divers paramètres ou descripteurs dans des systèmes expérimentaux complexes, de type micro- ou mésocosmes, ou dans des milieux naturels. Si ces paramètres s'avèrent le plus souvent satisfaisants lorsqu'il s'agit d'évaluer les conséquences des effets létaux et/ou à court terme des substances testées, leur pertinence pour la mise en évidence des conséquences des effets non létaux, indirects et/ou à long terme ou pour la transposition des résultats obtenus en conditions expérimentales aux situations naturelles est parfois sujette à caution, notamment en ce qui concerne les possibilités d'aborder la dynamique de restauration des écosystèmes perturbés. Par ailleurs, alors que l'évaluation du risque repose pour l'essentiel sur des critères structurels, il y a une demande de plus en plus importante pour une mise en cohérence des activités humaines avec la préservation des services écosystémiques. Il y a donc un besoin de descripteurs additionnels susceptibles de révéler d'éventuels effets "subtils" des toxiques sur les performances fonctionnelles des communautés et de développer des approches mixtes qui associent caractérisation taxonomique et écologique des assemblages d'espèces.

L'objectif de ce projet, réalisé en partenariat avec le Service Environnement de Total Petrochemicals dans le cadre d'une thèse CIFRE, est d'évaluer expérimentalement la pertinence de différents descripteurs pour la mise en évidence des effets directs et indirects des toxiques et d'analyser leur évolution au cours de périodes de restauration post-contamination. Il s'agit aussi de déterminer si des réponses identiques sont obtenues selon qu'il s'agit d'un écosystème lotique ou lentique. Trois hypothèses sont testées :

- certaines caractéristiques fonctionnelles pourraient être fortement altérées par les toxiques tandis que d'autres ne le seraient pas, en raison de l'existence d'une redondance fonctionnelle.

- la résilience des communautés lotiques serait plus élevée que celle des communautés lenticques, en raison d'une recolonisation par l'amont.

- la résistance des communautés lenticques pourrait être plus importante que celle des communautés lotiques du fait de la sélection de certains traits biologiques (respiration aérienne, tolérance à l'hypoxie, etc.) en leur sein.

Des expérimentations en mésocosmes ont été mises en place sur deux plates-formes. Une première expérimentation a été réalisée sur la plate-forme des Rivières Pilotes du Pôle de Recherche et Développement de Mont Lacq (PRDML) de Total Petrochemicals du 28 septembre au 15 décembre 2010. La plate-forme comporte 16 canaux linéaires (40×0,5×0,5 m) avec un débit de 12m³/h par canal. Elle est alimentée par une prise d'eau située au niveau du barrage d'Artix (64) alimenté par le Gave de Pau. Le plan expérimental comportait 4 canaux témoins et 4 canaux contaminés avec du thirame (concentrations nominales : 35 et 170 µg/L ; 2 réplicats par concentration). Une seconde expérimentation est en cours sur la

plate-forme de l'Unité Expérimentale d'Ecologie et Ecotoxicologie Aquatique (U3E) de l'INRA de Rennes. Les mésocosmes utilisés sont des bassins circulaires d'environ 9 m³ (diamètre = 3,2 m ; profondeur : 0,9 m). Ils sont disposés en extérieur et sont donc exposés aux conditions climatiques naturelles (température, luminosité, précipitations). Ils ont été préparés sur le modèle de ceux utilisés au cours d'expérimentations antérieures (Hanson *et al.*, 2007). Le plan expérimental comporte 4 mésocosmes témoins et 4 mésocosmes contaminés avec du thirame (concentrations nominales : 35 et 170 µg/L ; 2 réplicats par concentration). L'expérimentation a commencé en mai 2011 et doit s'achever en décembre 2011.

Dans les deux cas, le thirame a été apporté sous forme d'une préparation commerciale en poudre, l'Ordoval® à 80% de thirame. Pour les systèmes lotiques il a été procédé à une contamination en continu pendant 3 semaines alors que dans le cas des systèmes lentiques, 4 traitements ont été réalisés à une semaine d'intervalle.

Les mêmes paramètres ont été mesurés dans l'eau des deux types de systèmes expérimentaux (concentration en thirame et en oxygène dissous, pH, température, et conductivité). Par ailleurs, divers compartiments biologiques ont été étudiés grâce à un échantillonnage régulier. Le périphyton et les macroinvertébrés benthiques ont été échantillonnés toutes les 3 semaines à l'aide de substrats artificiels dans les deux types de systèmes tandis que le phytoplancton et le zooplancton ont été échantillonnés de façon hebdomadaire uniquement dans les systèmes lentiques. Parallèlement plusieurs campagnes de mesure de vitesse de dégradation de la litière d'aulne glutineux (*Alnus glutinosa*) ont été réalisées. Les feuilles de cette espèce sont connues pour leur palatabilité pour les invertébrés et leur assimilation facile. Afin de distinguer la contribution à la dégradation des feuilles due aux macroinvertébrés de celle associée à l'activité des microorganismes, nous avons constitué des jeux de pochettes à litière constitués pour chacun d'une pochette à petites mailles (PM, vide de maille = 0,25 mm ; dégradation par les microorganismes uniquement) et d'une pochette à grande mailles (GM, vide de maille = 5 mm ; dégradation par les microorganismes et les macroinvertébrés). Dans chaque pochette a été introduite une masse connue (3±0,1 g) de feuilles d'aulne séchées à l'air libre. Quatre jeux ont été introduits dans chaque mésocosme, dont 3 ont été utilisés pour l'estimation du taux de dégradation et un pour la réalisation de prélèvements destinés aux analyses de concentration en ergostérol (estimation de la biomasse d'hyphomycètes). Pour cela, 12 rondelles de limbe (en évitant les nervures) ont été prélevées et conservées à -80°C avant d'être analysées. Deux campagnes (comportant à chaque fois 3 semaines d'immersion) ont été réalisées afin de mettre en évidence un éventuel effet des traitements sur l'activité de fragmentation. La première s'est déroulée durant la période de contamination, et la seconde pendant la période de restauration post-traitement (2 mois après la fin de l'exposition). La vitesse de décomposition de la litière est estimée par le coefficient k (j⁻¹) de la fonction exponentielle négative qui relie la biomasse de litière et le temps (Gessner et Chauvet, 2002) :

$$B(t)=B_0 e^{-kt}$$

où : B_0 est la biomasse initiale de feuilles (g) et t correspond au temps écoulé depuis le début de l'expérimentation (j).

Dans les canaux expérimentaux, l'exposition au thirame a eu des effets significatifs sur les communautés de macroinvertébrés à partir de trois semaines après le début de la période d'exposition. Les groupes les plus négativement impactés sont les mollusques gastéropodes (Physidae et Lymnaeidae). Inversement, une augmentation de l'abondance des larves de Diptères Orthocladiinae a été observée dans les canaux traités. Un effet négatif du thirame sur la dégradation des feuilles d'aulne dans les pochettes à grandes mailles a été mis en évidence pour les deux concentrations testées et pour les deux campagnes de mesure (Figure 1). Aucun effet n'a été mis en évidence en ce qui concerne les pochettes à petites

mailles, ce qui suggère que ce sont surtout les macroinvertébrés qui ont été affectés. Ceci est confirmé par les résultats du dosage de l'ergostérol qui n'ont pas mis en évidence d'effet des traitements sur la biomasse des hyphomycètes et ceci quel que soit le type de pochette considéré.

Dans le cas des mésocosmes lentières, les effets de la contamination par le thirame sur la structure des communautés de macroinvertébrés ont été moins importants. De même, aucun effet significatif n'a été observé sur la dégradation de la litière (Figure 1).

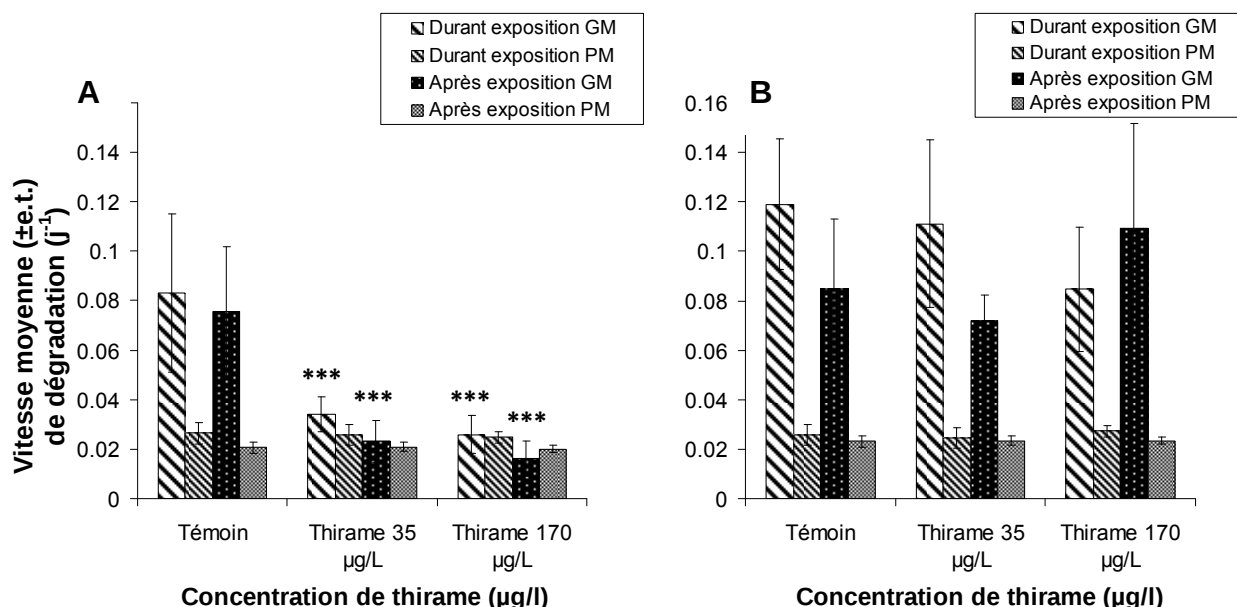


Figure 1. Vitesse moyenne ($\pm$ e.t.) de dégradation de la litière d'aulne dans les différents mésocosmes. A. Mésocosmes lotiques ; B. Mésocosmes lentières. GM= pochettes à grandes mailles, PM= pochettes à petites mailles (différence significative par rapport aux témoins, ANOVA et test post-hoc de Dunnett, * : $p < 0,001$).**

Les modifications structurelles induites par le thirame ont eu des conséquences fonctionnelles significatives dans le cas des systèmes lotiques. L'absence de relation de ce type dans les systèmes lentières pourrait découler soit de niveaux d'exposition au thirame différents (les analyses de résidus sont en cours), soit d'une sensibilité plus faible des communautés lentières. Les analyses complémentaires actuellement en cours devraient permettre de tester ces hypothèses. Elles apporteront aussi des informations complémentaires sur les réponses d'autres descripteurs (diversité fonctionnelle, niche trophique réalisée, ...).

Mots-clés : invertébrés aquatique, écotoxicologie, écologie fonctionnelle, évaluation du risque, bioindication.

Références

- Gessner M., Chauvet E. 2002. A case for using litter breakdown to assess functional stream integrity. *Ecological Applications* 12:498-510.
- Hanson M.L., Graham D.W., Babin E., Azam D., Coutellec M.-A., Knapp C.W., Lagadic L., Caquet Th. 2007. Influence of isolation on the recovery of pond mesocosms from the application of an insecticide. I. Study design and planktonic community responses. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26:1265-1279.

Adaptation de l'indice SPEAR aux mésocosmes lenticques pour caractériser l'exposition des communautés d'invertébrés aquatiques aux pesticides

Marc ROUCAUTE, Arnaud AUBER, Thierry CAQUET, Laurent LAGADIC

UMR0985 Écologie et Santé des Écosystèmes, Équipe Écotoxicologie et Qualité des Milieux
Aquatiques, INRA, Agrocampus Ouest, 65 rue de Saint Briec, F-35042 Rennes
marc.roucaute@rennes.inra.fr

Les mésocosmes lenticques sont couramment utilisés pour l'évaluation du risque écotoxicologique des pesticides pour les milieux aquatiques. La pertinence des informations obtenues à l'aide de ces dispositifs dépend notamment de la vulnérabilité aux pesticides des communautés qu'ils hébergent, une communauté comportant des espèces vulnérables étant davantage susceptible de révéler les effets néfastes des substances testées. Il semble donc utile de pouvoir caractériser, *a priori*, la vulnérabilité vis-à-vis des pesticides des communautés d'invertébrés présentes dans des systèmes expérimentaux en vue d'évaluer le potentiel de détection des effets par ces outils. De plus, un tel descripteur de vulnérabilité pourrait permettre de caractériser, *a posteriori*, le niveau d'impact des traitements appliqués sur les mésocosmes. Jusqu'à présent toutefois, il n'existe pas d'outils de bioindication spécifiques des pesticides qui soient adaptés aux milieux stagnants.

Les métriques du système *SPEAR* (*SPEcies At Risk*) développé à l'UFZ de Leipzig (Liess et von der Ohe, 2005) ont été proposées pour caractériser le niveau d'exposition des communautés d'invertébrés aquatiques aux pesticides. Ces métriques sont calculées à partir du nombre ou de l'abondance des espèces à risque au sein des communautés. L'assignation d'une espèce au groupe des espèces vulnérables (*SPEAR*) ou non (*SPEcies NOT At Risk*) est basée sur un ensemble de traits biologiques et écologiques. Toutefois, cet indice a été développé et testé pour être appliqué en rivière.

Au cours de ce travail, nous avons adapté cette démarche aux conditions spécifiques des expérimentations en mésocosmes lenticques, en proposant un nouvel indice *LSPEAR* (*Lentic SPEAR*). Dans ce système, la catégorisation d'une espèce ou d'un groupe taxonomique dépend :

- de sa sensibilité moyenne aux toxiques organiques (*S*) :

$$S = \log \left(\frac{CL_{50} D.magna}{CL_{50} Taxon i} \right) \geq -0,36 \text{ pour } LSPEAR$$

- de son temps de génération, qui doit être supérieur à 6 mois pour que l'espèce ou le groupe soit considéré comme vulnérable.

- de la capacité du taxon à la dissémination aérienne à la date du prélèvement. Les espèces d'insectes ne peuvent être considérées comme à risque qu'en dehors de leur période d'émergence.

Par ailleurs, nous avons créé une troisième catégorie, celle des espèces opportunistes, qui n'existe pas dans la version originale du système *SPEAR*. Cette catégorie regroupe les taxons tolérants, à temps de génération court et présentant une probabilité de (re)colonisation aérienne au moment de l'échantillonnage.

L'indice *LSPEAR* est calculé à chaque date d'échantillonnage selon la formule :

$$LSPEAR = \frac{\sum_{i=1}^S \log(n_i + 1) \times y_i}{\sum_{i=1}^S \log(n_i + 1)}$$

Avec *S*, le nombre total de taxons ; *n_i* l'abondance du taxon *i* et *y_i* = 1 si le taxon est *LSPEAR*, 0 si *LSPEnotAR* et -1 si le taxon est opportuniste.

Nous avons appliqué cet indice aux données obtenues lors des deux années d'expérimentation du programme EMERITAT (soutenu par le programme 'Pesticides' du MEDDTL) qui consistait à analyser la réponse des communautés d'invertébrés exposées à une succession de pesticides appliqués sur une rotation culturale pois-blé-colza (Auber *et al.*, 2011).

Le plan expérimental consistait en 16 mésocosmes de 9 m³ répartis en 3 groupes : un groupe de 4 mésocosmes témoins et deux groupes de 6 pour chacun des deux itinéraires techniques testés : "Classique" et "Bas intrants pesticides". Les dates de traitement et les doses appliquées pour chaque itinéraire ont été modélisées en utilisant des modèles adaptés aux différentes voies de transfert des pesticides des parcelles traitées vers les milieux aquatiques (dérive, ruissellement et drainage), en considérant les doses appliquées sur un champ d'un ha, et les données pluviométriques représentatives pour une série de 10 années.

Les concentrations en résidus de pesticides dans l'eau ont été mesurées sur des échantillons prélevés 24 h après chaque application ou, par défaut, une fois toutes les trois semaines. Les communautés d'invertébrés benthiques ont été échantillonnées à l'aide de substrats artificiels toutes les trois semaines.

Les données de concentration en résidus ont été utilisées pour calculer les valeurs d'Unités Toxiques correspondantes pour *D. magna* selon la formule :

$$UT \ D. magna = \frac{C_{i,t}}{CE_{50,i}}$$

Avec *C_{i,t}* la concentration dans l'eau du pesticide *i* au temps *t* et *CE_{50,i}* la toxicité aiguë de ce pesticide pour *D. magna*.

Pour chaque date de prélèvement, nous avons comparé les valeurs moyennes de *LSPEAR* calculées pour les communautés benthiques des mésocosmes témoins et contaminés à l'aide d'une analyse de variance suivie d'un test post-hoc de Tukey. La Figure 1 présente les évolutions au cours du temps de la différence entre ces valeurs ($\square LSPEAR = LSPEAR_{traité} - LSPEAR_{témoin}$) et les bornes de l'intervalle de confiance à 95% de cette différence données par le test de Tukey. Les périodes critiques de contamination, c'est-à-dire les périodes où les valeurs d'UT étaient supérieures à 0,1, sont aussi indiquées.

L'indice *LSPEAR* a permis de mettre en évidence des impacts des traitements sur les communautés pour les deux types d'itinéraires techniques, notamment lorsque le niveau de contamination dépassait 0,1 TU (1/10^{ème} de la *CE₅₀* pour *D. magna*). Ceci a été observé pour plusieurs insecticides pyréthrinoides et pour le cyprodynil. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus avec l'analyse de l'abondance des différents groupes taxonomiques par la méthode de la première courbe de réponse principale (Auber *et al.*, 2011). Ceci suggère que le choix, *a priori*, de critères de vulnérabilité recoupe bien la réalité des impacts mesurés sur les communautés dans cette expérimentation.

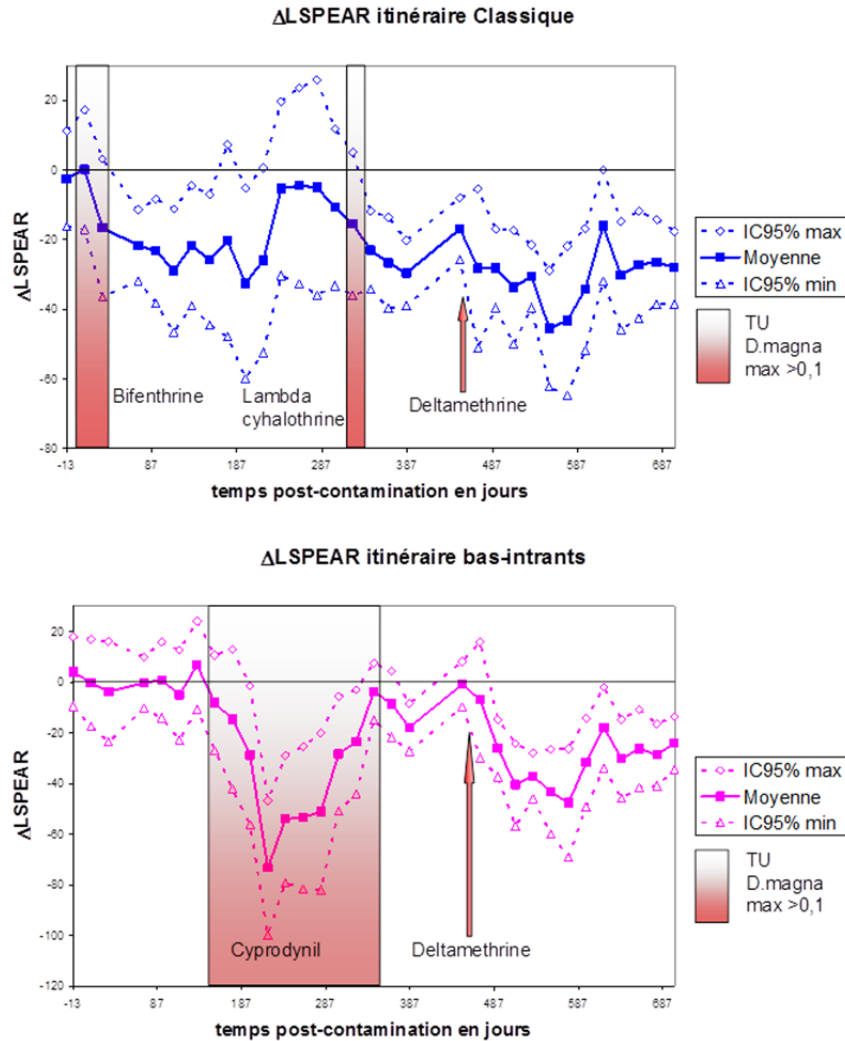


Figure 1. Evolutions de la moyenne et des bornes de l'intervalle de confiance à 95% de la différence entre les valeurs de LSPEAR calculées pour les mésocosmes contaminés et la valeur moyenne mesurée pour les mésocosmes témoins. Les périodes critiques de contamination et les substances correspondantes sont aussi indiquées.

L'application future de cet indice en milieu naturel, suivant un gradient de contamination de milieux stagnants, permettra de mieux positionner les systèmes expérimentaux par rapport à la vulnérabilité de leurs homologues naturels, et de disposer d'un outil de diagnostic de l'exposition des milieux naturels aux pesticides. Enfin, cette étude souligne l'importance dans les approches en mésocosmes de favoriser l'installation et le développement d'une communauté d'invertébrés qui renferme une proportion significative de groupes vulnérables pour pouvoir mieux détecter l'impact, à court et à long terme, des pesticides.

Mots-clés : Traits, invertébrés, mésocosmes, vulnérabilité, bioindication, pesticides

Références

- Auber A., Roucaute M, Togola A. & Caquet Th., 2011, Structural and functional effects of conventional and low pesticide input crop-protection programs on benthic macroinvertebrate communities in outdoor pond mesocosms. *Ecotoxicology* doi:10.1007/s10646-011-0747-5..
- Liess M. & von der Ohe P.C., 2005. Analysing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environ. Toxicol. Chem.*, **24**, 954-965.

Des bioindicateurs pour évaluer l'impact des pesticides sur les milieux aquatiques

Agnès BOUCHEZ¹, Frédéric. RIMET¹, Marc ROUCAUTE², Rémy. MARCEL¹, Carole. GERET² & Thierry CAQUET²

¹INRA, UMR CARTELE, Equipe RITOXE, 75 av. de Corzent, BP 511, 74203 Thonon-les-Bains Cedex

²INRA, UMR0985 Écologie et Santé des Écosystèmes, Équipe Écotoxicologie et Qualité des Milieux Aquatiques, Agrocampus Ouest, 65 rue de Saint Brieuc, 35042 Rennes Cedex
thierry.caquet@rennes.inra.fr

Bien qu'indispensable, l'analyse chimique ne peut suffire à la surveillance de la qualité des milieux aquatiques vis-à-vis de la "pression pesticides". Les limites de l'approche analytique conduisent rapidement à la proposition d'outils complémentaires susceptibles d'intégrer les effets des stress environnementaux, et notamment d'outils biologiques basés sur l'analyse des communautés. Les outils de bioindication de la qualité des milieux aquatiques utilisés actuellement n'ont pas été mis au point pour mettre en évidence de façon spécifique les impacts des pesticides et échouent souvent à le faire. Il est donc important de développer des outils de bioindication capables de caractériser spécifiquement l'impact des pesticides sur les milieux naturels, afin notamment de pouvoir quantifier les progrès obtenus dans le cadre des politiques de réduction de ces intrants (plan Ecophyto 2018 par exemple). Les travaux proposés par les équipes INRA de Thonon-les-Bains et de Rennes dans le cadre des actions de recherche et développement financées par l'Onema ont pour objectifs généraux d'adapter et de tester des métriques permettant de caractériser les effets de l'exposition du périphyton et des communautés d'invertébrés benthiques aux pesticides.

Au sein du périphyton, les diatomées sont sensibles à de nombreux facteurs abiotiques tels que la lumière, le pH, la température, la nature du substrat ou bien encore la saprobie (taux de matières organiques) et la trophie (taux de nutriments phosphorés et azotés). C'est cette sensibilité qui permet de les utiliser comme indicateurs biologiques de la qualité des cours d'eau. Les indices actuels de qualité basés sur les diatomées impliquent toutefois une détermination à l'espèce et sont surtout adaptés à la mise en évidence des effets de la saprobie et de la trophie. Certaines espèces prises en compte dans les calculs sont souvent rares et leur profil écologique est donc peu robuste et la détermination à l'espèce des diatomées demande l'expertise d'une main d'œuvre qualifiée. Il semble possible d'utiliser d'autres métriques, en utilisant notamment les traits biologiques et écologiques des diatomées. Trois types de traits sont considérés dans ce projet : formes de vie (mode d'attachement au substrat, vie en colonie, mobilité), classes de tailles et guildes écologiques. Les guildes écologiques caractérisées par Passy (2007) ont été complétées (Berthon *et al*, 2011) et utilisées : "high profile" (espèces souvent de grandes tailles et coloniales), "low profile" (espèces de petites tailles, accrochées au substrat, centriques solitaires ou lentes) et "motile" (capables de se déplacer rapidement).

En ce qui concerne les invertébrés, les indices actuels sont surtout sensibles au niveau d'oxygénation de l'eau et aux perturbations de l'habitat physique. Dans ce projet, les travaux portent sur l'évaluation de nouveaux outils basés au moins en partie sur des informations relatives aux traits biologiques et écologiques des espèces ou groupes taxonomiques présents au sein de la communauté. Deux approches complémentaires sont explorées :

- la méthode SPEAR (Liess & von der Ohe, 2005), qui intègre la sensibilité aux toxiques organiques comme trait caractéristique des différents taxons,
- le calcul d'indices de diversité fonctionnelle basés sur différents traits (taille maximale théorique, ressources alimentaires, mode de nutrition).

Un suivi spécifique de sites représentatifs du paysage agricole local en termes de pratiques agricoles et présentant des caractéristiques différentes du point de vue de la pression en pesticides a démarré en 2010. Trois rivières ont été sélectionnées, le Cluquempoix (Manche,

Cotentin) avec un bassin versant maraîcher, le Général (Ille-et-Vilaine) avec un bassin dominé par la polyculture et l'élevage et la Loëze (Ain), avec un bassin dominé par le maraîchage (polyculture et élevage en amont). La même démarche a été appliquée dans plusieurs stations réparties selon un gradient amont-aval : analyses physico-chimiques et de micropolluants sur eau brute, analyses de micropolluants sur sédiments, prélèvements de diatomées selon le protocole standardisé IBD et en utilisant des substrats artificiels (lames de verre) et prélèvements de macroinvertébrés selon la méthode de Usseglio-Polatera *et al.* (2007).

Les analyses de résidus de pesticides ont été réalisées à l'aide de méthodes multi-résidus par le Laboratoire Départemental d'Analyses de la Drôme. Les données de concentration en résidus ont été utilisées pour calculer les valeurs d'Unités Toxiques correspondantes pour *Daphnia magna* ou les microalgues selon la formule :

$$UT = \log \left(\frac{C_{i,t}}{CE_{50,i}} \right)$$

Avec $C_{i,t}$ la concentration dans l'eau du pesticide i au temps t et $CE_{50,i}$ la toxicité aiguë de ce pesticide pour *D. magna* ou pour les microalgues.

La Loëze est la rivière la plus contaminée par les pesticides. Il y a un très net gradient amont-aval du nombre de substances détectées et quantifiées (nombre moyen $\pm$ e.s. = $9,2 \pm 2,2$, $16,1 \pm 1,7$ et $21,1 \pm 2,2$, pour les stations amont, médiane et aval, respectivement). Les substances les plus fréquemment détectées et quantifiées sont des herbicides (2,4-D, atrazine, diméthénamide, glyphosate, linuron, métolachlore, triclopyr) des métabolites d'herbicides (AMPA, DEA) et des fongicides (azoxystrobine, boscalid, oxadixyl, tébuconazole). C'est dans ce cours d'eau que la valeur d'UT la plus élevée a été observée (UT *D. magna* = 13,6 pour le chlorfenvinphos en mai 2011 dans la station médiane). En ce qui concerne le Cluain, le nombre de substances détectées et quantifiées est plus élevé en moyenne dans les stations médiane et aval que dans la station amont (nombre moyen $\pm$ e.s. = $3,4 \pm 0,6$, $11,1 \pm 2,1$, $11,8 \pm 2,0$ et, pour les stations amont, médiane et aval, respectivement). Les substances les plus fréquemment détectées et quantifiées sont des herbicides (atrazine, bentazone, linuron, métazachlore), des métabolites d'herbicides (DEA) et des fongicides (azoxystrobine, boscalid, oxadixyl, tébuconazole). Pour le Général, le nombre de substances détectées et quantifiées est plus élevé dans la station aval que dans la station amont (nombre moyen $\pm$ e.s. = $5,2 \pm 0,9$ et $8,2 \pm 1,5$ pour les stations amont et aval, respectivement). Les substances les plus fréquemment détectées et quantifiées sont des herbicides (atrazine, diméthénamide, diuron, mecoprop, triclopyr) et des métabolites d'herbicides (DEA, AMPA).

En ce qui concerne les diatomées, l'analyse de l'abondance relative des différentes guildes écologiques dans les différentes stations a montré, notamment sur la Loëze, que lorsque la pression de contamination par les pesticides augmente, l'abondance relative de la guildes "motile" augmente tandis que l'abondance des espèces de la guildes "high-profile" montre une tendance inverse. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus expérimentalement à l'INRA de Thonon dans des mésocosmes lotiques exposés à un mélange de diuron et de tébuconazole (Rimet & Bouchez, 2010) : pour l'impact des pesticides, les guildes écologiques sont plus sensibles que la composition en espèces, avec un accroissement de l'abondance des guildes "motile" et "low-profile" et des diatomées en tube muqueux dans les canaux contaminés et une tendance inverse pour l'abondance des espèces de la guildes "high-profile".

Dans le cas des macroinvertébrés, l'abondance relative des espèces SPEAR est négativement corrélée à la pression toxique, exprimée par la valeur maximale d'UT pour *D. magna* mesurée lorsque l'on considère l'ensemble des données (ρ de Spearman = -0,78, $p < 0,001$; Figure 1). Lorsque l'on considère séparément les trois rivières, la corrélation est toujours significative pour le Cluain (ρ de Spearman = -0,68, $p = 0,015$) mais elle n'est plus pour la Loëze (ρ de Spearman = -0,57, $p = 0,14$) et le Général (ρ de Spearman = 0,4, $p = 0,32$). Ceci suggère que sous sa forme actuelle cet indicateur est pertinent surtout lorsqu'il

existe un gradient important de pression toxique. Des analyses sont en cours pour étudier l'influence des autres facteurs du milieu et pour tester d'autres métriques.

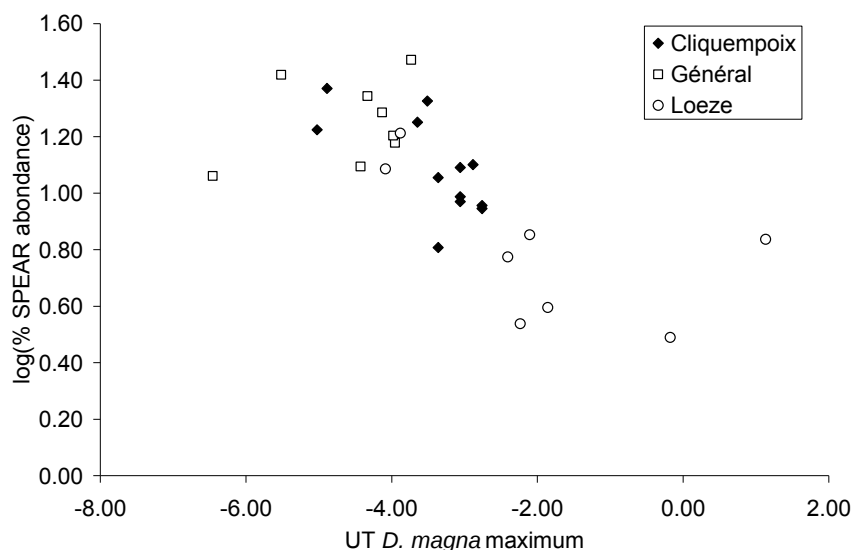


Figure 1. Relation entre le logarithme de l'abondance relative des individus appartenant à des espèces à risque (% SPEAR abondance) et la valeur maximale d'UT pour *D. magna*.

Les analyses des données obtenues au cours des deux années de suivi se poursuivent. Si l'utilisation d'indicateurs ou de métriques basés sur les traits des diatomées ou des macroinvertébrés semble pouvoir fournir des informations intéressantes, il reste encore de nombreuses étapes de développement et de validation à franchir avant d'envisager de les utiliser en routine pour la mise en évidence des effets des pesticides dans les milieux naturels.

Mots-clés : Pesticides, Bioindication, Diatomées, Invertébrés, Traits biologiques et écologiques, Rivières

Références

- Berthon V., Bouchez A. & Rimet F., 2011. Use of diatom life forms and ecological guilds to assess organic and nutrient concentrations in rivers: case study of south-eastern French rivers. *Hydrobiologia*, **673**, 259-271.
- Liess M. & von der Ohe P.C., 2005. Analysing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environ. Toxicol. Chem.*, **24**, 954-965.
- Passy S.I., 2007. Diatom ecological guilds display distinct and predictable behavior along nutrient and disturbance gradients in running waters. *Aquat. Bot.*, **86**, 171-178.
- Rimet F. & Bouchez A., 2011. Use of diatom life-forms and ecological guilds to assess pesticide contamination in rivers: lotic mesocosm approaches. *Ecol. Indic.*, **11**, 489-499.
- Usseglio-Polatera P, Wasson J.-G. & Archaimbault V., 2007. Protocole de prélèvement et de traitement des échantillons des invertébrés sur le réseau de contrôle de surveillance. Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, Direction de l'Eau, Paris, 31 p.

BETSI : développements conceptuels et utilisations du concept de trait fonctionnel en écotoxicologie des sols

Mickael HEDDE¹, Johanne NAHMANI², Jérôme CORTET³, Isabelle LAMY¹

¹UR 251 PESSAC, INRA, Route de St-Cyr, F-78026 Versailles cedex

²UMR 7146 LIEBE - UPV-M – CNRS, Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, F-57070 Metz

³Laboratoire Sols et Environnement, ENSAIA, 2 avenue de la Forêt de Haye, BP 172, F-54505 Vandœuvre lès Nancy

mickael.hedde@versailles.inra.fr

A l'heure actuelle, l'évaluation de l'impact des contaminations des sols tiennent peu compte de la composante biologique alors que de nombreux travaux ont démontré que les organismes du sol réagissent rapidement aux perturbations. Les traits fonctionnels des organismes correspondent aux caractéristiques des individus qui gouvernent leur relations avec l'environnement en termes de réponses et d'effets. Il s'agit de champs de recherche très actifs en écologie végétale ou aquatique. Dans cette intervention nous présentons les objectifs conceptuels et opérationnels du projet BETSI ainsi que des applications sur des situations contaminées. L'objectif du projet BETSI est d'identifier les bases biologiques et écologiques de la réponse des invertébrés des sols aux contraintes et aux perturbations exercées sur le sol. Les traits seront définis à l'aide des résultats de la littérature et seront utilisés pour élucider l'effet de stress sur les invertébrés. Le concept a été appliqué pour évaluer la chaîne de causalité entre teneurs (totales, biodisponibles) des ETM, exposition, bioaccumulation et impacts sur les communautés sur un gradient de contamination métallique. Une autre application concerne l'étude de la (re)colonisation d'un sol par les macro-invertébrés après restauration ou réhabilitation. Elle met en jeu un nombre restreint de traits fonctionnels, identifiés par un suivi pluriannuel.

Mots-clés : macro-invertébrés, micropolluants, traits fonctionnels

Intérêts et limites des organismes sentinelles : cas des escargots *Xeropicta derbentina* dans les vergers de pommiers en Provence

Christophe MAZZIA¹, Magali RAULT¹, Juan SANCHEZ-HERNANDEZ¹,
Yvan CAPOWIEZ²

¹UMR 406 Abeille et Environnement, INRA/UAPV Domaine Saint-Paul, Site Agroparc, F-84914
Avignon Cedex 9

²UR 1115 PSH INRA, Domaine Saint-Paul, Site Agroparc, F-84914 Avignon Cedex 9
yvan.capowiez@avignon.inra.fr

Etudier les effets *in situ* des types de protection phytosanitaires (agriculture biologique, protection « raisonnée » ou conventionnelle) sur des organismes prélevés est toujours difficile à cause des facteurs de confusion et de l'histoire de ces organismes. L'utilisation d'espèces sentinelles transplantées (dans notre cas, des escargots encagés) permet de lever beaucoup ces incertitudes et de s'affranchir de ces difficultés. Nous présenterons des résultats de différente nature : (i) le suivi de marqueurs biochimiques (de type esterase) des escargots encagés 8 semaines au printemps dans les vergers qui permet de différencier les 3 types de protection phytosanitaires, (ii) la confirmation en conditions contrôlées des effets d'application répétées d'insecticide organophosphoré sur les esterase de *X. derbentina*, (iii) une étude complémentaire basée sur la modification du comportement de ces escargots suite à des applications d'insecticides de nature différente et (iv) une étude intégrative réalisant la corrélation entre biomarqueurs comportemental et biochimique.

Mots-clés : protection phytosanitaire, arboriculture, doses répétées, *Xeropicta*

Le paysage module le transfert et les effets de polluants métalliques chez les micromammifères

Clémentine FRITSCH^{1,2}, Patrick GIRAUDOUX¹, Michaël COEURDASSIER¹, Francis RAOUL¹, Amélie VANISCOTTE³, Renaud SCHEIFLER¹

¹Laboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249 Université de Franche-Comté/CNRS Usc INRA, Place Leclerc, 25030 Besançon Cedex, France

²Alterra, Wageningen UR, PO-Box 47, 6700 AA Wageningen, Pays-Bas

³Department of Arctic and Marine Biology, University of Tromsø, NO-9037 Tromsø, Norvège
clementine.fritsch@univ-fcomte.fr

Introduction

Les concepts et les implications pour le développement d'une nouvelle thématique en écotoxicologie, nommée « écotoxicologie du paysage » ont été proposés dans les années 90 (Cairns & Niderlehner, 1996). Cependant, jusqu'à présent, très peu d'études ont été menées dans ce champ scientifique émergent. Comprendre les effets de l'arrangement spatial des habitats et des communautés en interaction sur les mécanismes de transfert et d'effets des polluants est pourtant essentiel pour évaluer l'exposition des organismes et le risque écotoxicologique associé. L'objectif de ce travail était d'étudier les transferts et les effets de polluants métalliques (ETMs, Cd et Pb) chez les micromammifères, en examinant l'influence du paysage sur ces processus.

Matériels et méthodes

Le site d'étude se situe sur une zone de 40 km² autour d'une ancienne fonderie, où les sols sont très fortement contaminés par des ETMs (Fritsch et al, 2010). La zone a été divisée en 160 mailles virtuelles de 500 m de côté, et le paysage a été caractérisé dans chacune d'entre elles. Les types paysagers ont été nommés sur la base de leur classe d'occupation du sol dominante. Parmi ces 160 mailles, 30 ont été sélectionnées, sur la base de leur paysage et des niveaux de pollution métallique des sols d'après des études antérieures (Sterckeman et al, 2002 ; Douay et al, 2008), l'objectif étant de définir un gradient de pollution des sols dans 4 types de paysages (agricole, urbain, enfriché, forestier). Les animaux ont été capturés dans ces 30 mailles en automne (10 lignes de 10 pièges / maille durant 3 nuits, total=8640 nuits-pièges), dans des habitats boisés (bois, haies, plantations,...) (Fritsch et al, 2011). Les concentrations en ETMs dans les sols ont été mesurées aux endroits où les micromammifères ont été capturés. Les animaux ont été identifiés à l'espèce et disséqués.

La bioaccumulation du Cd et du Pb a été étudiée chez une espèce herbivore/granivore, le campagnol roussâtre *Myodes glareolus* (n=243), et une espèce insectivore, la musaraigne crocure musette *Crocidura russula* (n=163), par la mesure des concentrations en Cd et Pb dans le foie des animaux. L'influence de la pollution métallique sur les communautés de micromammifères (1338 individus appartenant à 11 espèces) a été étudiée en considérant à la fois la structure (abondance totale, richesse et équitabilité basée sur l'indice de Shannon) et la composition (densités spécifiques relatives) des assemblages.

Les relations entre concentrations en métaux dans les animaux et dans les sols et l'influence du paysage sur ces relations ont été analysées grâce à des modèles linéaires généraux (Zuur et al, 2009). Les relations entre les paramètres de structure / composition des assemblages et la pollution du sol (les concentrations en Pb dans les sols ont été utilisées comme proxy de la pollution) ont été analysées en prenant en compte l'habitat et le paysage. Les paramètres de structure ont été analysés grâce à des modèles additifs généralisés (Zuur et al, 2009), et la composition grâce à des modèles multinomiaux (Vaniscotte et al, 2009).

Résultats, discussion et conclusion

Les concentrations hépatiques en Cd et Pb chez les micromammifères montrent une augmentation significative avec la pollution du sol, et cette augmentation est plus forte chez les musaraignes que chez les campagnols (Figure 1a). Les résultats montrent que les niveaux des concentrations en ETMs et leur augmentation le long du gradient de pollution sont influencés par le paysage (Figure 1a). L'influence du paysage est espèce- et métal-spécifique. Les résultats suggèrent que les traits écologiques des espèces (préférences d'habitat, mobilité spatiale, régime alimentaire) modulent les effets du paysage sur le transfert. Récemment, des travaux ont montré l'influence de l'habitat sur l'accumulation du Cd chez les micromammifères (van den Brink et al, 2011). Il apparaît par conséquent que l'exposition des vertébrés terrestres aux polluants est déterminée par des variables agissant à différentes échelles spatiales : contamination du sol, habitat et mosaïque d'habitats.

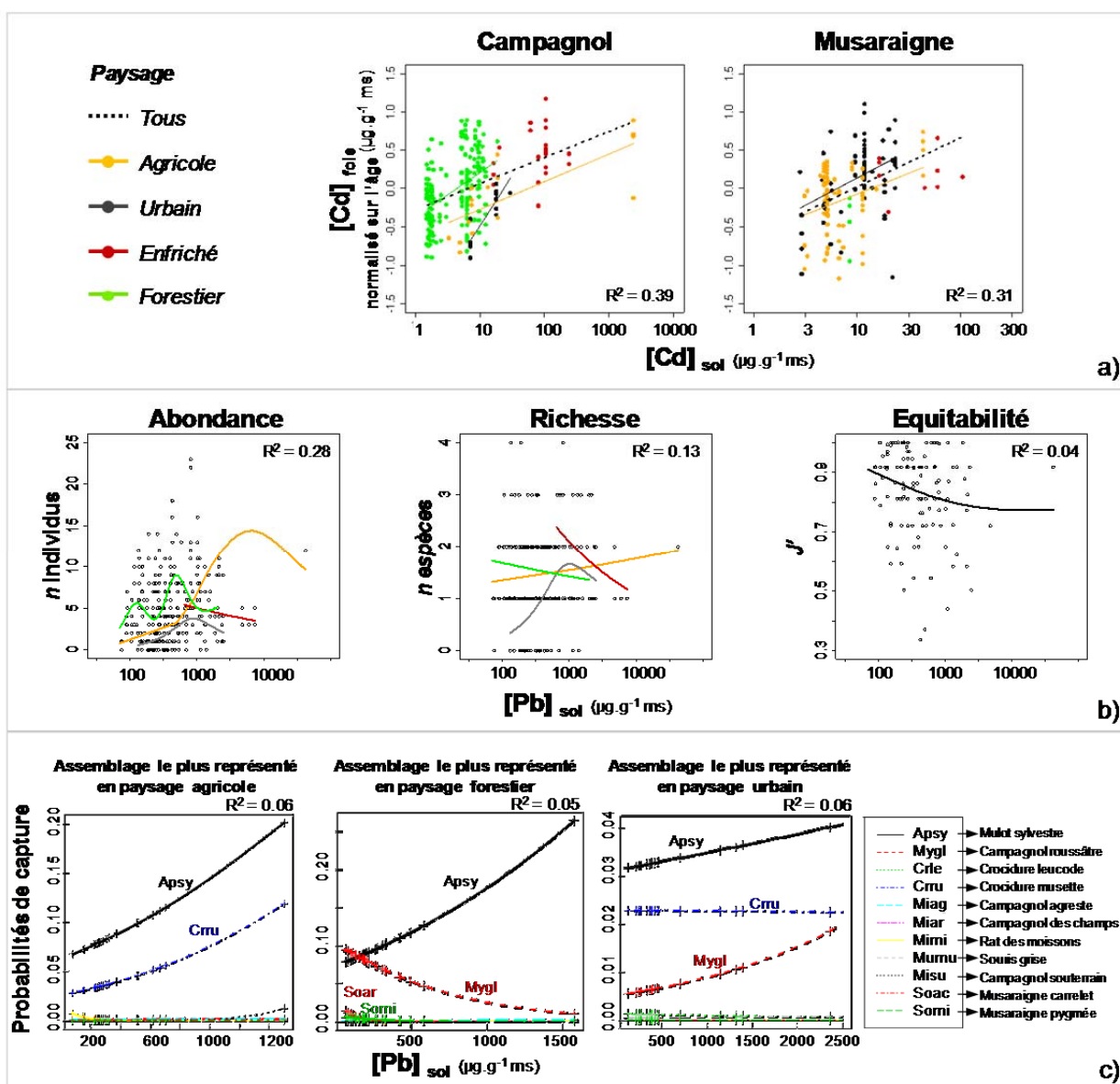


Figure 1. Influence du paysage sur les réponses des micromammifères à la pollution métallique des sols. a) Relations entre concentrations internes et dans les sols chez le campagnol roussâtre et la musaraigne crocidure musette : exemple du Cd. b) Variations de la structure des communautés de micromammifères le long du gradient de pollution ; la légende des paysages est la même que pour (a). c) Variations de la composition des communautés le long du gradient de pollution dans 3 paysages.

Concernant les effets sur les communautés, les variations d'abondance et de richesse sont paysage-spécifiques (Figure 1b). Globalement, on observe une augmentation de ces 2 variables de structure jusqu'à 1000 ppm de Pb dans le sol environ, puis une diminution. L'équitabilité varie seulement avec la pollution, elle diminue le long du gradient (Figure 1b). Les densités relatives des espèces diffèrent entre paysages, et entre habitats au sein d'un même paysage (excepté dans le paysage enfriché) (Figure 1c). La pollution du sol influence la probabilité d'occurrence des différents assemblages, excepté dans le paysage enfriché (lequel n'est présent qu'en milieu très pollué). Les densités relatives des espèces opportunistes/généralistes (mulot sylvestre, crocidure musette) augmentent le long du gradient de pollution (Figure 1c). Dans certains paysages, les densités relatives d'espèces spécialistes (campagnol roussâtre, musaraignes carrelet et pygmée) diminuent le long du gradient de pollution (Figure 1c). Les effets de la pollution métallique à l'échelle des communautés de micromammifères sont donc paysage-dépendants. Cependant, une homogénéisation générale des assemblages avec la pollution (dominance des espèces généralistes/opportunistes), et par conséquent une diminution de la biodiversité, est observée. Les résultats ne montrent pas de disparition des espèces sensibles au stress métallique ou hyper-accumulatrices dans les zones très polluées.

Cette étude terrain à large échelle met en évidence une influence du paysage à la fois sur le transfert et les impacts des polluants métalliques dans les écosystèmes terrestres. De plus, ces travaux apportent des résultats et ouvrent des perspectives pour la définition de « paysages à risque », problématique essentielle dans le cadre de la gestion des terrains contaminés. Enfin, cette étude souligne l'intérêt et le besoin de développer une « écotoxicologie du paysage », et ce à travers des approches multi-échelles. Il serait sans doute pertinent de poursuivre ces recherches en étudiant l'influence d'autres caractéristiques du paysage (structure, diversité), et sur les mécanismes écologiques à l'origine de l'influence du paysage sur le transfert et les effets des polluants dans les écosystèmes terrestres.

Mots-clés : contaminant, transfert, assemblage, vertébrés, écotoxicologie de la faune sauvage.

Références

- Cairns Jr J., Niederlehner BR. 1996. Developing a field of landscape ecotoxicology. *Ecological Applications* 6: 790-796.
- Douay F., Pruvot C., Roussel H., Ciesielski H., Fourrier H., Proix N., Waterlot C. 2008. Contamination of urban soils in an area of Northern France polluted by dust emissions of two smelters. *Water Air and Soil Pollution* 188: 247-260.
- Fritsch C., Giraudoux P., Cœurdassier M., Douay F., Raoul F., Pruvot C., Waterlot C., de Vaufléury A., Scheifler R. 2010. Spatial distribution of metals in smelter-impacted soils of woody habitats: Influence of landscape and soil properties, and risk for wildlife. *Chemosphere* 81: 141-155.
- Fritsch C., Cœurdassier M., Giraudoux P., Raoul F., Douay F., Rieffel D., de Vaufléury A., Scheifler R. 2011. Spatially explicit analysis of metal transfer to biota: Influence of soil contamination and landscape. *PLoS ONE* 6: e20682.
- Sterckeman T., Douay F., Proix N., Fourrier H., Perdrix E. 2002. Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water Air and Soil Pollution* 135: 173-194.
- van den Brink N.W., Lammertsma D.R., Dimmers W.J., Boerwinkel M.C. 2011. Cadmium accumulation in small mammals: species traits, soil properties, and spatial habitat use. *Environmental Science & Technology* 45: 7497-7502.
- Vaniscotte A., Pleydell D.R.J., Raoul F., Quéré J.P., Qiu J.M., Qian W., Li T.Y., Bernard N., Cœurdassier M., Delattre P., Takahashi K., Weidmann J.C., Giraudoux P. 2009. Modelling and spatial discrimination of small mammal assemblages: An example from western Sichuan (China). *Ecological Modelling* 220: 1218-1231.
- Zuur A.F., Ieno E.N., Walker N.J., Saveliev A.A., Smith G.M. 2009. *Mixed Effects Models and Extensions with R*. Springer, New York, NY, USA.



4^{ème} Séminaire d'Ecotoxicologie
7-9 novembre 2011 – St Lager

Communications affichées

Analyse multi-résidus de contaminants organiques exogènes dans des sols

Cédric REPINCAY, Kahina MOUSSI, Ghislaine DELARUE, Sylvie NELIEU

UR 251 PESSAC, INRA, Route de st-Cyr, F-78026 Versailles
cedric.repincay@versailles.inra.fr

Le recyclage en agriculture des produits résiduels constitue une voie d'élimination et de valorisation, mais peut contribuer à la dispersion de produits organiques xénobiotiques ou de leurs produits de transformation. De plus, des pesticides sont souvent utilisés sur ces mêmes sites.

Pour effectuer une analyse pertinente des risques associés, l'identification de ces produits et la quantification de leurs niveaux de concentration constituent des éléments de base. Afin d'évaluer la présence et le devenir de ces composés, le développement de méthodes permettant l'analyse de nombreux composés présents à des concentrations généralement en trace dans des matrices complexes (typiquement de l'ordre du ppb) est nécessaire.

Nos travaux ont porté sur le développement et la validation d'une méthode d'analyse multi-résidus de 48 polluants organiques dans des sols. La méthode implique les étapes suivantes : extraction, purification et analyse par UPLC-MS/MS. Elle permet simultanément la quantification d'antibiotiques et d'autres produits pharmaceutiques, d'hormones stéroïdiennes, de plastifiants, de pesticides et de quelques sous-produits.

Cette méthode a été appliquée sur des échantillons de sols provenant de parcelles agricoles ayant reçu des eaux usées de la ville de Paris. 21 pesticides et 5 composés pharmaceutiques à des concentrations allant de la dizaine de ppb au ppb ont été quantifiés.

Mots-clés : analyse multi-résidus, sols, contaminants organiques, antibiotiques, pesticides

Modélisation de la volatilisation et du dépôt gazeux de pesticides sur des eaux de surface

Carole BEDOS¹, Benjamin LOUBET¹, Azzedine SAMEUT BOUHAÏK¹, Amir FEIZ¹,
Enrique BARRIUSO¹

¹INRA-AgroParisTech UMR 1091 EGC, F-78850 Thiverval-Grignon
Carole.Bedos@grignon.inra.fr

La contamination des eaux de surface par les pesticides est avérée (mesures dans des lacs, eaux des rivières, etc) et la contribution des voies atmosphériques à cette contamination a été démontrée. A l'échelle locale, des estimations théoriques (par modélisation) montrent l'existence de situations pour lesquelles les dépôts gazeux faisant suite à la volatilisation des pesticides depuis la surface traitée en post application peuvent s'avérer supérieurs aux dépôts par dérive ayant lieu lors de l'application, notamment en lien avec une durée de flux de volatilisation plus longue que celle de la dérive (Asman et al., 2003, Siebers et al., 2003). Or, à l'heure actuelle, lors de l'évaluation des risques de contamination des eaux de surface, seule la dérive est prise en compte. Il y a donc un besoin d'outils validés pour estimer la contribution des dépôts secs à l'échelle locale. Il s'agit d'une préoccupation au niveau européen affectant directement les démarches d'évaluation des risques lors de l'homologation.

Les principaux facteurs influençant la volatilisation depuis le sol sont : les propriétés physico-chimiques de la matière active (par ex. la constante de Henry), la persistance du composé dans le sol, les conditions ambiantes (température du sol et de l'air, l'humidité du sol et son contenu en matière organique). Le dépôt sec est quant à lui gouverné par les concentrations en pesticides dans l'atmosphère (et donc les émissions), les conditions ambiantes, la distance à la source, (et la configuration spatiale locale), les propriétés des pesticides ainsi que la nature de la surface (eau, plante, sol).

L'approche ici sélectionnée consiste à estimer : i) la volatilisation d'un composé depuis une parcelle traitée, ii) sa dispersion atmosphérique, et iii) son dépôt gazeux sur une surface aquatique située à proximité (<1 km).

Pour se faire, un modèle 1D décrivant la volatilisation depuis une parcelle traitée en sol nu (Volt'Air-Pesticides, Bedos et al., 2009) est couplé à un modèle de dispersion atmosphérique et de dépôt gazeux (FIDES-2D, Loubet et al., 2001), modèle adapté aux pesticides (Sameut, 2010). Le dépôt gazeux est paramétrisé selon une approche résistive proposée par Liss and Slater (1974) and appliquée par Asman et al. (2003) aux pesticides.

$$Rb = 1 / (0,066 \text{ } Sca - 0.61 \text{ } u^*) \quad \text{and} \quad Rs = Kh(Twater) / [1,25.10^{-6} (600 / Scw) - 0.5 \text{ } U(10)1.6]$$

Un couplage simple entre Volt'Air et Fides est réalisé: le flux de pesticides volatilisé et les conditions micrométéorologiques locales calculés par Volt'Air sont utilisées par Fides.

Cinq pesticides de caractéristiques physico-chimiques variées ont été choisis (Tableau 1) et des simulations de 13 jours ont été réalisées dans des conditions pédoclimatiques représentatives de la région Picardie. La dimension de la parcelle traitée est de 100 m et la dose appliquée est de 1 kg ha⁻¹.

Substance	Henry's law constant Kh [-]	Vapour pressure [Pa]	Water solubility [mg L ⁻¹]	Koc [m ³ kg ⁻¹]	DT50 soil [day]	Rs [s m ⁻¹]	Rs/Rb [-]
Bentazone	2.00E-13	1.70E-04	570	0.051	14.0	2.06E-3	2.22E-05
Ethofumesate	9.00E-08	6.50E-04	50	0.147	56.0	2.15E-2	2.31E-04
Acetochlor	8.64E-09	2.20E-05	282	0.156	12.1	1.31E-1	1.41E-03
Chlorothalonil	1.36E-05	7.60E-05	0.81	0.850	44.0	7.61E-1	8.18E-03
Fenpropimorph	5.50E-05	3.90E-03	4.32	2.401	25.5	8.95E-0	9.62E-02

Tableau 1. Caractéristiques physico-chimiques des pesticides sélectionnés et résistances de surface associées.

La Figure 1 montre que pour certains pesticides les dépôts gazeux cumulés peuvent s'avérer similaires voire supérieurs aux dépôts par dérive. En effet, les dépôts gazeux de l'Acetochlor, le Chlorothalonil, et le Fenpropimorph s'élevant à 0.5%, 1% and 2% de la quantité appliquée à 250 m sont supérieurs à la dérive qui s'élève à environ 0.15%. Dans les conditions ici simulées et les pesticides choisis, la résistance de surface Rs est négligeable comparée à Rb (89 s.m-1 ≤ Rb ≤ 97 s.m-1). Ainsi, dans ce cas, l'émission par volatilisation semble être le principal facteur gouvernant le dépôt sec sur des surfaces aquatiques.

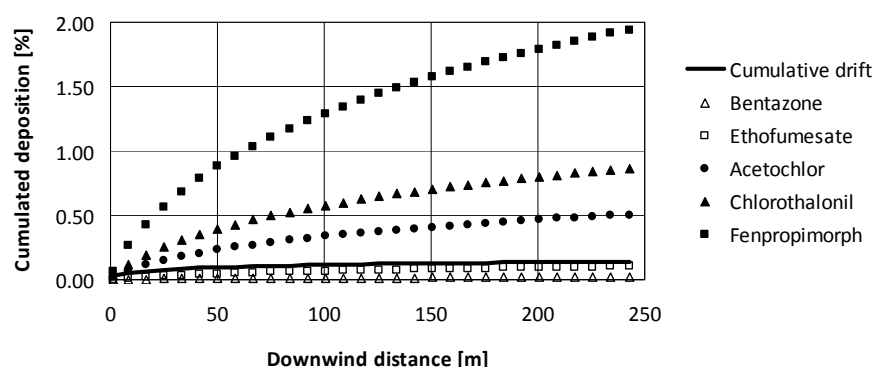


Figure 1. Comparaison des flux de dépôt cumulés (après 13 jours) et des dépôts par dérive selon Rautmann et al. (2001). Les flux sont normalisés par la dose appliquée

Cette étude doit être étendue à d'autres conditions pédoclimatiques et d'autres pesticides. Des simulations sur une plus large gamme de scénarios permettront d'approfondir l'analyse du processus et de construire un outil opérationnel d'évaluation des risques de contamination des eaux de surface. Il faudra néanmoins introduire la description de la volatilisation depuis un couvert végétal. Une validation à l'aide de jeux de données est aussi requise.

Mots-clés : Dépôt sec, échange eau-atmosphère, volatilisation, dispersion atmosphérique, échelle locale, évaluation des risques

Remerciements : La région Picardie, A. Gouzy (Ineris) et l'Onema pour leur contribution.

References

- Asman W., Jorgensen A., Jensen P. (2003) – Technical Report, Danish Environ. Protection Agency.
Bedos C., Générumont S., LeCadre E., Barriuso E., Cellier P. (2009) – Atmos. Env., 43, 3630-3669.
Bedos C., Loubet B., Feiz A., Barriuso E. (2010) – Progress Report, Onema project, 96 p.
Liss P.S., Slater P.G. (1974) – Nature, 247, 181-184.
Loubet B., Milford C., Sutton M. A., Cellier P. (2001) – JGR Atmospheres, 106, 24183-24195.
Sameut Bouhaik A. (2010) – Internship Report, 39 p.
Rautmann D., Streloke M., Winkler R. (2001) – Mittl. Biol. Bund. Land- Forstwirtschaft, 383, 133-141.

Effet du tassement et de l'apport de compost sur le devenir et l'impact écotoxicologique de l'isoproturon dans le sol

Laure MAMY¹, Laure VIEUBLE-GONOD², Pierre BENOIT², Véronique CHAPLAIN¹,
Sabine HOUOT², Christian MOUGIN¹

¹INRA UR 251 PESSAC, route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles cedex

²INRA-AgroParisTech UMR 1091 EGC, F-78850 Thiverval-Grignon

laure.mamy@versailles.inra.fr

Le tassement et la diminution de la teneur en matières organiques sont deux des principaux processus de dégradation des sols. Le tassement modifie les propriétés physiques des sols avec des conséquences sur leur fonctionnement biologique. L'apport de composts permet de compenser les déficits en matières organiques et peut contribuer à augmenter la stabilité de la structure des sols et à limiter le tassement. Mais les composts modifient aussi les propriétés biologiques et chimiques des sols. Ainsi, le tassement et l'apport de compost peuvent affecter le devenir et l'impact des pesticides dans les sols. Cependant, ceci est peu documenté.

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets du tassement et des composts sur le devenir dans le sol et l'impact écotoxicologique de l'isoproturon (herbicide des céréales).

Des cylindres de sol non perturbés (5 cm de diamètre, 2 cm de hauteur) ont été prélevés sur le site expérimental de Feucherolles (INRA) dans les interbandes d'une parcelle témoin et d'une parcelle ayant reçu des composts de déchets verts et boues pendant plusieurs années. Les échantillons de sol ont été tassés ou non (de 1.30 g cm⁻³ à 1.60 g cm⁻³ pour le sol témoin et de 1.15 à 1.45 g cm⁻³ pour le sol amendé), traités ou non avec de l'isoproturon marqué au ¹⁴C et incubés à 28°C. Le devenir de l'isoproturon a été suivi pendant 49 jours (minéralisation, fractions extractible et non extractible). En parallèle, l'impact écotoxicologique a été étudié grâce à la mesure de deux activités enzymatiques impliquées dans les cycles du carbone (β -glucosidase) et de l'azote (uréase).

Les résultats montrent qu'il n'y a pas d'effet du tassement ni de l'apport de compost sur le devenir de l'isoproturon, probablement parce que la réduction de la porosité n'affecte pas les habitats des micro-organismes dégradants (Mamy et al., 2011) et parce que le compost a été apporté au sol un an avant l'échantillonnage. Or l'effet des composts sur l'activité des micro-organismes peut être fugace. L'absence d'effet des composts peut aussi être dû à leurs caractéristiques physico-chimiques et biologiques particulières (Vieublé-Gonod et al., 2009).

Le tassement et l'apport de compost ne modifient pas l'impact de l'isoproturon sur l'uréase, peut-être parce que les conditions d'incubation n'étaient pas limitantes pour l'activité biologique. En revanche, des effets sur la β -glucosidase ont été observés, sauf dans le sol amendé. Le compost pourrait jouer un rôle de tampon par rapport aux effets du tassement.

Mots-clés : Boues, Déchets verts, Pesticide, Dégradation, Activités enzymatiques.

Références

- Mamy L., Vrignaud P., Cheviron N., Perreau F., Belkacem M., Brault A., Breuil S., Delarue G., Pétraud J.P., Touton I., Mougin C., Chaplain V. 2011. No evidence for effect of soil compaction on the degradation and impact of isoproturon. *Environmental Chemistry Letters* 9:145-150.
- Vieublé-Gonod L., Benoit P., Cohen N., Houot S. 2009. Spatial and temporal heterogeneity of soil microorganisms and isoproturon degrading activity in a tilled soil amended with urban waste composts. *Soil Biology and Biochemistry* 41:2558-2567.

Spéciation et mobilité du cadmium et du zinc dans un sol contaminé par une approche multiple : micro-caractérisation, extraction chimique et cinétique d'échange isotopique

Valérie SAPPIN-DIDIER, Yann SIVRY, Marguerite MUNOZ, Jean RIOTTE, Bernard DUPRE, Laurence DENAIX

UMR 1220 TCEM, INRA, Avenue E. Bourleaux, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon
valerie.sappin@bordeaux.inra.fr

La distribution et la mobilité du zinc et du cadmium ont été étudiés dans un sol pollué en combinant différentes approches physiques et chimiques (micro-caractérisation, extraction chimiques et isotopiques). L'étude a été menée sur un fluvisol, pollué par des activités métallurgiques. Les résultats ont montré de grandes quantités de métaux dans les phases minérales résultant de l'activité industrielle. Les phases minérales principales détectées sont le charbon, le coke, des oxydes multi-métalliques, des alliages de métaux purs, des sulfures et du verre.

Le zinc est principalement extrait de la fraction réductible du sol (64 %). Cette fraction est composée d'oxydes réductibles FeIII et d'oxy-hydroxyde, notamment hématite, goethite, magnétite et oxydes multi-métalliques (franklinite). Seulement 10 % de Zn est extrait de la fraction échangeable. Par contre, 40 % du Cd est extrait de la fraction échangeable et 46 % de la fraction réductible.

La cinétique d'échange isotopique, réalisée avec des isotopes stables et radioactifs, a montré que 60 % du Cd est échangeable, contre 11 % du Zn. L'échangeabilité du Zn est plus rapide que celle du Cd. Le Zn est préférentiellement dans les phases minérales d'origine anthropique, impliquant un échange faible. L'échangeabilité forte du Cd semble liée à sa présence dans les argiles, le charbon et la matière organique, ce qui peut expliquer des échanges rapides.

Mots-clés : cadmium, spéciation, disponibilité, isotope, sol

Impact d'un perturbateur endocrinien, le pyriproxyfène, sur l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) : effets d'une exposition chronique au stade larvaire sur le comportement de l'ouvrière adulte

Julie FOURRIER¹, Matthieu DESCHAMPS¹, James DEVILLERS², Pierrick AUPINEL³, Dominique FORTINI³, Axel DECOURTYE⁴

¹ACTA, ICB-VetAgroSup, 1 avenue Bourgelat, F-69280 Marcy l'Etoile

²CTIS, 3 chemin de la gravière, F-69140 Rillieux La Pape

³INRA, Unité expérimentale d'entomologie, Le Magneraud, F-17700 Surgères

⁴ACTA, UMT PrADE, INRA - Abeilles et environnement, Site AgroParc, F-84914 Avignon Cedex 9
axel.decourtye@acta.asso.fr

Alors que l'importance écologique et économique de l'abeille (*Apis mellifera* L.) n'est plus à démontrer, les effets de xénobiotiques sur le système endocrinien de cet insecte sont encore peu connus. L'impact du pyriproxyfène, insecticide régulateur de croissance analogue de l'hormone juvénile, a été étudié tout au long de la vie de l'abeille ouvrière grâce à une approche méthodologique combinant la technique d'élevage de larves au laboratoire et des études comportementales réalisés en conditions semi-naturelles. Les effets d'une exposition orale et chronique au stade larvaire avec les doses cumulées de 54 ng ou 18 ng de pyriproxyfène par individu ont été mesurés sur la répartition des tâches des ouvrières au sein de la colonie. Les abeilles exposées aux deux doses de pyriproxyfène ont émergé plus précocement que les abeilles témoins. La plus forte dose a entraîné un taux de malformations (ailes atrophiées) plus élevé. De même, les ouvrières exposées ont été rapidement rejetées par les congénères après leur introduction dans la colonie receveuse. Enfin, les abeilles exposées ont exprimé moins de comportements participant à la cohésion sociale de la colonie. Notre travail souligne l'importance d'étudier les effets d'une exposition chronique, plus proche des conditions réelles d'exposition des larves d'abeilles, dans la prise en compte de l'action des perturbateurs endocriniens sur les colonies.

Mots-clés : *Apis mellifera* L., perturbateur endocrinien, larve, exposition chronique, effets comportementaux

Application d'un essai des comètes modifié sur des lignées cellulaires de poisson : un outil sensible d'évaluation de la génotoxicité

Aude KIENZLER, Xavier TRONCHERE, Alain DEVAUX et Sylvie BONY

USC INRA Impact Génotoxique sur les Hydrosystèmes, UMR LEHNA 5023,
ENTPE, rue Maurice Audin, F-69518 Vaulx en Velin
sylvie.bony@entpe.fr

De nombreux contaminants aquatiques présentent un potentiel génotoxique. En écotoxicologie, les approches *in vitro* utilisant des lignées cellulaires sont encore rares et leur sensibilité nécessite d'être améliorée. Pour ce faire, la mesure des dommages primaires à l'ADN par l'essai des comètes modifié par une étape de digestion enzymatique (Formamido pyrimidine glycosylase), visant à augmenter sa sensibilité et son exhaustivité, a été appliquée sur trois lignées cellulaires possédant des capacités métaboliques contrastées (épithélium branchial et hépatique de truite arc en ciel et hépatocarcinome de *P. lucida*). Dans un premier temps, des génotoxiques modèles (MMS et H₂O₂) ont été utilisés puis des contaminants de diverses natures (herbicides, cadmium et B[a]P) ont été testés. Les résultats montrent qu'un tel système permet à l'aide d'un protocole unique, de mettre en évidence divers types de lésions génotoxiques (oxydations, alkylations, adduits volumineux), ceci à des doses d'exposition suffisamment basses pour être réalistes au plan environnemental. Ainsi, ce type d'approche peut être envisagé comme un outil fiable et sensible de caractérisation du danger dans une démarche d'évaluation du risque.

Mots-clés : génotoxicité, *in vitro*, lignée cellulaire, poisson

Etude de la sécrétion d'enzymes fongiques dans les sols - Application au développement de biomarqueurs d'écotoxicité des sols et déchets

Achref ALOUI¹, Nathalie CHEVIRON¹, Didier CHEVRET² et Christian MOUGIN¹

¹Unité PESSAC, Route de St-Cyr, INRA, F-78026 Versailles cedex

²Plateforme PAPPSO, Unité MICALIS, INRA, F-78352 Jouy en Josas cedex

nathalie.cheviron@versailles.inra.fr

L'évaluation du risque écotoxique nécessite le développement d'outils sensibles et sélectifs pour évaluer d'éventuels effets néfastes de contaminants chimiques en faibles doses. Dans ce contexte, les champignons filamenteux présentent de nombreux atouts dans la mesure où ils produisent des systèmes enzymatiques variés dont l'activité et la production peuvent être affectées à la suite de leur exposition à des contaminants chimiques (Lebrun *et al.* 2010, 2011). Notre objectif est d'étudier les profils de sécrétion des protéines exocellulaires du champignon filamenteux *Trametes versicolor* exposé à un contaminant organique, la 2,5-diméthylaniline (xylidine) et à un contaminant métallique, le cuivre, dans des cultures liquides.

Les cultures de *T. versicolor* sont traitées avec la xylidine à 0,3 mM ou le cuivre à 20 ppm. Après 7 jours d'exposition, les protéines du milieu sont concentrées et séparées par électrophorèse 2D. La première dimension électrophorétique est obtenue par isofocalisation IEF, la seconde est réalisée sur gel SDS-PAGE. Les protéines du secrétome fongique sont identifiées par spectrométrie de masse (LC-MS/MS Orbitrap), et leurs séquences comparées à celles des bases de données.

L'analyse comparative des données permet de retenir 46 protéines candidates, classées en 3 groupes. Le groupe I est caractérisé par des spots protéiques spécifiquement augmentés en présence de xylidine. Le groupe IIa comprend les spots réprimés en présence de l'un ou l'autre des effecteurs. Le groupe IIb comprend les spots spécifiquement augmentés en présence de Cu. Cependant, peu de séquences protéiques sont répertoriées dans les bases de données. Seules des laccases ont été clairement identifiées.

Nos résultats montrent la pertinence de la démarche mise en place, mais le manque de données disponibles dans les bases de données sur les séquences protéiques fongiques, limite actuellement l'utilisation des profils de sécrétion comme biomarqueurs. Ces résultats obtenus à l'échelle protéomique confirment ceux obtenus précédemment au niveau transcriptomique ou fonctionnel. Enfin, il reste nécessaire de développer les protocoles d'extraction des protéines à partir des sols agricoles contaminés.

Mots-clés : champignons, protéomique, biomarqueurs, sols, métaux, contaminants organiques

Références

Lebrun J.D., Trinsoutrot-Gattin I., Laval K. and Mougin C. 2010. Environ Toxicol Chem 29:902-908

Lebrun J.D., Demont-Caulet N., Cheviron N., Laval K., Trinsoutrot-Gattin I., Mougin C. 2011. Chemosphere 82:340-345

Evaluation de l'impact à long terme de boues STEP sur les microorganismes du sol : zoom sur l'abondance et l'activité de la communauté microbienne dégradant l'atrazine

Jérémie BEGUET¹, David BRU, Jérôme CORTET², Christophe SCHWARTZ², Jean-Louis MOREL² et Fabrice MARTIN-LAURENT¹

¹UMR 1229 MSE, INRA, 17 Rue Sully, BP 86510, F-21065 DIJON Cedex

²Laboratoire Sols et Environnement, ENSAIA, 2 avenue de la Forêt de Haye, B.P. 172, F-54505

Vandœuvre lès Nancy

jeremie.beguet@dijon.inra.fr

Les plans d'épandage permettent de valoriser les boues STEP comme source de matières organiques pour amender des sols agricoles. Le bénéfice apporté par l'apport des boues STEP est mitigé par l'apport d'éléments traces métalliques et HAPs les contaminants et dont l'impact sur la qualité des sols restent difficile à évaluer. Dans ce contexte, à la demande de l'ADEME, le Laboratoire Sol et Environnement (LSE, INRA, ENSAIA, Nancy) a mis en place un essai longue-durée sur le site de la Bouzule pour tester à long terme l'apport de boues STEP sur la qualité des sols agricoles. Parmi, les fonctions ciblées, la fonction filtre, responsable de la biodégradation d'intrants chimiques, a été retenue pour évaluer l'impact de boues STEP. Les parcelles de la Bouzule ayant été fréquemment cultivées avec du maïs et en conséquence traités avec l'herbicide atrazine, présentent une microflore capable de minéraliser cet herbicide. L'impact des boues sur la communauté microbienne dégradant l'atrazine a été évalué en mesurant la structure, l'abondance, et l'activité des populations microbiennes dégradant l'atrazine ont été mesurées pour évaluer 10 ans après le dernier épandage de boues STEP, la résilience éventuelle de l'impact causé. Les résultats de cette étude seront présentés

Mots-clés : boue STEP, impact, biodégradation

Les réponses écotoxicologiques des escargots *Cantareus aspersus* exposés à des sols fertilisés par des boues urbaines

Mohamed BOURIOUG¹, Frédéric GIMBERT¹, Laurence ALAOUI-SOSSE¹,
Mohamed BENBRAHIM², Pierre-Marie BADOT¹, Badr ALAOUI-SOSSE¹

¹Laboratoire de Chrono-environnement, UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA, Université de Franche-Comté, Place Leclerc, F-25030 Besançon cedex

²RITMO Agroenvironnement, ZA Biopôle, 37 rue de Herrlisheim, CS 80023, F-68025 Colmar Cedex
mohamed.bourioug@univ-fcomte.fr

L'épandage forestier est une alternative complémentaire au recyclage agricole des boues urbaines permettant un apport d'azote et de phosphore très bénéfique pour les sols forestiers pauvres. Cependant, les contaminants présents dans certaines boues, et en particulier les éléments traces métalliques (ETM), présentent un risque d'accumulation dans les sols et de transfert à l'ensemble de l'écosystème via la chaîne trophique.

Les escargots ont une grande capacité d'accumuler les ETM et sont largement utilisés comme organismes tests de bioaccumulation et de toxicité des contaminants. Ce travail, mené en conditions contrôlées, a pour objectif d'évaluer l'impact d'un apport de boues (3, 30 et 60t MS ha⁻¹) sur le continuum sol-plante (*Lactuca sativa*)-escargot (*Cantareus aspersus*) et les taux de transfert éventuels des ETM (Zn, Cu, Cd et Pb).

L'apport de boues enrichit le sol en ETM mais améliore fortement la croissance de la laitue. On note une augmentation de la croissance des escargots exposés à des sols amendés et nourris avec de la laitue ayant poussé sur ces sols. Ce résultat suggérerait que la valeur nutritive de ces plants de salades est nettement améliorée. Les résultats de la bioaccumulation des ETM observée chez l'escargot seront discutés.

Mots-clés : *Cantareus aspersus*, chaîne trophique, boues liquides, éléments traces métalliques, transfert

Impact de la bromadiolone sur les populations de Renard roux

Marion JACQUOT¹, Michaël CŒURDASSIER¹, Geoffroy COUVAL², Régis RENAUDE³, Denis TRUCHETET⁴, Francis RAOUL¹, Patrick GIRAUDOUX¹

¹Chrono-environnement, UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA, Place Leclerc, F-25030 Besançon cedex

²FREDON Franche-Comté, 12 rue de Franche-Comté, Espace Valentin Est, F-25048 Besançon cedex

³Fédération Départementale Des Chasseurs Du Doubs, rue Chatelard, F-25360 Gonsans

⁴DRAAF/SRAL Franche-Comté, 191 rue de Belfort, F-25043 Besançon cedex

marion.jacquot@univ-fcomte.fr

Les rodenticides (AVKs) sont responsables d'empoisonnements de faune non-cible partout dans le monde (USA, Mongolie, Royaume-Uni, France...). Dans les années 90 suite aux contrôles des pullulations de campagnols terrestres avec un AVK (bromadiolone) sur plus de 60 000 ha, des centaines de cadavres de prédateurs (buses, renards...) ont été découverts dans le Doubs. Ceci a entraîné une évolution réglementaire dans l'utilisation de la bromadiolone imposant notamment la réalisation des traitements à faible densité de campagnols. Notre objectif est d'évaluer si les opérations de contrôle du campagnol terrestre ont eu un effet négatif à long terme (6 ans) sur les populations de renard roux dans le Doubs (5230 km²) et si les nouvelles dispositions réglementaires ont permis de limiter les impacts.

Pour l'ensemble du Doubs, l'intensité des traitements a été évaluée par la quantité d'appâts empoisonnés (en tonnes) utilisée par commune et par an entre 2003 et 2008. Un secteur non traité et un secteur traité (englobant les communes traitées au moins une fois entre 2003 et 2008) ont été définis. Depuis 2004, les densités relatives de renards, exprimées sous forme d'indice kilométrique d'abondance (IKA), sont estimées par comptages nocturnes réalisés sur 472 transects. Afin de mettre en relation les traitements et les densités de renards, les IKA ont été interpolés au niveau du centroïde des communes par krigeage ordinaire. Les comptages étant effectués au printemps et les traitements à la bromadiolone réalisés principalement en automne, les densités de renards de l'année n (2004 à 2009) ont été mises en relation avec les quantités communales d'appâts utilisées l'année n-1 et n-2 (2003 à 2008).

Globalement, les dynamiques de populations de renard sont différentes entre les secteurs traité et non traité. Dans le secteur non traité et en dehors des grandes agglomérations, les IKA varient entre 0,75 et 1,5 renards/km. Les années à forte intensité de traitements, les densités de renards sont plus faibles dans le secteur traité alors que quand les traitements sont nuls à faibles, les renards y sont plus abondants. Dans le secteur traité, les traitements réalisés les années n-1 et n-2 entraînent une diminution des IKA. Les impacts les plus sévères sont mesurés en 2004 dans une zone où les intensités de traitements en 2003 sont maximales (quantités communales d'appâts comprises entre 1 et 12 tonnes), les densités de renards y sont proches de 0 sur plus 120 km². En 2004 et 2005, les traitements sont quasi-nuls et on note une résilience des populations de renards ($0,5 < \text{IKA} < 1$ dans la zone de 120 km² sus-citée). A partir de 2006, des traitements sont réalisés tous les ans dans différentes zones du secteur traité, les quantités totales d'appâts utilisées étant 2 à 3 fois plus faibles que celles de 2003. Des impacts sont évidents en 2007 ($0,25 < \text{IKA} < 0,5$) alors qu'en 2008 et 2009, si les zones traitées ($0,5 < \text{IKA} < 1$) présentent globalement des IKA inférieurs au reste du département ($1 < \text{IKA} < 1,5$), les effets des traitements sont plus faibles que ceux de 2003.

Ce travail montre comment des suivis réalisés à long terme et à large échelle spatiale peuvent aider à évaluer les impacts de pesticides sur la faune sauvage et les changements de pratiques de traitements au niveau des populations. Sa poursuite peut aider à définir les nouvelles dispositions d'utilisation de la bromadiolone dans le cadre de sa récente ré-homologation au titre de la directive européenne 91/414/CE.

Mots-clés : rodenticides anticoagulants, monitoring, impact populationnel.



4^{ème} Séminaire d'Ecotoxicologie
7-9 novembre 2011 – St Lager

Tables rondes

Développement et application de l'échantillonneur passif POCIS pour le suivi des pesticides et l'estimation du potentiel toxique dans les cours d'eau

Nicolas MAZZELLA¹, Vincent FAUVELLE¹, Sophie LISSALDE², Soizic MORIN¹,
Christelle MARGOUM³, Stéphane PESCE³, Vincent ROUBEIX¹, François DELMAS¹

¹Cemagref, UR REBX, 50 avenue de Verdun, F-33612 Cestas

²GRESE, F-87060 Limoges Cedex

³Cemagref, UR MALY, F-69336 Lyon

Nicolas.Mazzella@cemagref.fr

Le suivi des pesticides dans les eaux, qu'elles soient de surface, souterraines, destinées à la consommation ou non, est devenu un enjeu primordial de ces dernières décennies. En effet, les nombreuses pollutions chroniques ou aiguës, que les activités humaines font subir aux masses d'eau de la planète, posent des problèmes environnementaux et/ou de santé publique. La recrudescence de ces événements conduit aujourd'hui les décideurs à mener une réflexion de fond sur les usages et la protection de cette ressource. Un volet important de cette réflexion est l'amélioration des connaissances concernant les pollutions, leur nature, leurs intensités et leur répartition. Le suivi des pollutions par les pesticides fait partie intégrante de ce volet et les efforts liés à leur caractérisation, notamment quantitative, ont essentiellement porté jusqu'ici sur les étapes de préparation des échantillons et d'analyse. Or, l'étape de l'échantillonnage, bien que primordiale, est encore insuffisamment prise en compte tant d'un point de vue de la caractérisation des fractions isolées que de la représentativité temporelle et spatiale des extraits.

L'échantillonnage des eaux se décline en deux catégories : l'échantillonnage actif (prélèvements ponctuels, prélèvements automatisés) et l'échantillonnage passif (échantillonneurs immergés dans les cours d'eau). Les techniques d'échantillonnage passif sont encore en développement et prometteuses car elles montrent, par rapport aux approches classiques (i.e. prélèvement ponctuels), de meilleurs résultats en termes d'intégration temporelle et d'abaissement des niveaux de contamination détectables, voire quantifiables.

Cette présentation abordera plus particulièrement le développement et l'utilisation du Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS) qui permet d'échantillonner les composés polaires. Les aspects métrologiques seront exposés dans un premier temps avec l'étalonnage du POCIS, son domaine d'application, les atouts et les limites connues lors des déploiements *in situ* et les derniers développements méthodologiques afin d'améliorer les aspects quantitatifs, notamment par rapport à l'échantillonnage des pesticides. Dans un second temps, nous ferons l'état des lieux des connaissances sur la fraction échantillonnée par cet outil, sa pertinence en termes de biodisponibilité des contaminants polaires vis-à-vis des biofilms de rivière, puis des applications possibles, lors de couplage avec des approches PICT, afin d'évaluer les risques écologiques sur ce même compartiment biologique.

Comment établir les liens entre exposition et effets biologiques en milieu contaminé ?

Stéphane PESCE

UR MALY, Cemagref, 3 bis quai Chauveau - CP 220, F-69336 Lyon
stephane.pesce@cemagref.fr

Parmi les principaux défis de l'écotoxicologie, le développement d'outils permettant d'établir les liens entre exposition aux toxiques et effets biologiques représente un enjeu particulièrement important en vue de réellement appréhender l'impact des contaminants sur la qualité écologique des milieux récepteurs. Cette tâche s'avère d'autant plus délicate que la pollution des sols et des eaux de surface s'inscrit dans un contexte de changement global et les écosystèmes sont généralement soumis à des situations de multi-stress qui découlent de la multiplicité des pressions chimiques (pollutions trophiques et toxiques) et/ou physiques. De ce fait, il est souvent délicat de réellement distinguer les effets des toxiques parmi les changements biologiques observés au sein des communautés exposées.

Parmi les biocénoses, les communautés microbiennes sont des acteurs clés dans le fonctionnement général des écosystèmes terrestres et aquatiques. En outre, ces communautés présentent une forte capacité à répondre rapidement à des changements environnementaux et à s'y adapter de manière transitoire ou irréversible. De ce fait, elles constituent potentiellement des indicateurs de perturbation particulièrement pertinents qui peuvent offrir un signal précoce de stress environnemental suite à une pollution chimique. Deux approches, ciblées sur l'étude des capacités adaptatives des communautés microbiennes suite à une exposition prolongée aux toxiques, semblent actuellement particulièrement prometteuses pour établir *in situ* des liens entre exposition et effets. Il s'agit i) des approches de type PICT (Pollution Induced Community Tolerance) qui visent à mesurer et à suivre l'évolution du niveau de tolérance des communautés microbiennes aux toxiques et ii) des approches focalisant sur les capacités de biodégradation des pesticides organiques par les microorganismes hétérotrophes. Cependant, ces approches présentent encore de nombreuses limites. Parmi celles-ci, on peut notamment citer la nécessité de connaître *a priori* les molécules à cibler, ainsi que la difficulté de considérer des mélanges complexes.

Il est donc nécessaire de poursuivre les investigations, afin notamment de développer de nouveaux biomarqueurs microbiens. Parmi les pistes de recherche, l'utilisation de descripteurs moléculaires, ciblés notamment sur les gènes impliqués dans la résistance aux stress chimiques, pourrait permettre d'évaluer l'impact cellulaire de différents stress environnementaux et révéler des effets précoces et spécifiques.

Modèles d'exposition et modèles d'impacts : quels apports et quelles limites ?

Igor DUBUS, Stephan REICHENBERGER

Footways, 10 Avenue Buffon, F-45071 Orleans Cedex 2
i.dubus@footways.eu

L'évaluation des risques de contamination des eaux par les produits phytosanitaires et leurs métabolites, ainsi que l'évaluation des impacts associés sur les organismes aquatiques, est un enjeu majeur avant homologation de ces produits, mais également après leur mise sur le marché. L'évaluation des potentiels de contamination et d'impacts dans des conditions naturelles (expériences au champ visant à suivre les transferts de pesticides dans le milieu agricole, observations in situ d'effets dans les milieux aquatiques) se heurte fréquemment aux questions de la représentativité statistique des suivis, de la spécificité des résultats obtenus aux territoires et conditions annuelles des observations, et des coûts associés. Au vu de ses limitations, la modélisation des transferts a très tôt fait l'objet d'une utilisation dans le domaine de l'évaluation des risques pour l'homologation et on a pu assister ces dernières années à l'apparition de modèles permettant de simuler les impacts écotoxicologiques.

L'apparition de modèles opérationnels permettant de simuler le transfert environnemental des produits date du milieu des années 80, avec le modèle américain PRZM développé par l'US EPA (1985) et le modèle suédois MACRO (1989). L'utilisation concrète de ces premiers modèles en évaluation des risques s'est trouvée renforcée par la Directive européenne "homologation" signée en 1991 qui indiquait que les risques de contamination des milieux devaient être évalués à l'aide de modèles mathématiques "validés". Cette dénomination habile de la directive a amené à l'intensification des travaux collaboratifs sur les conditions d'utilisation des modèles de transfert, notamment à travers les groupes de travail européens FOCUS (FORum for the Coordination of pesticide fate models and their Use) qui produiront des documents guides sur différents aspects de la modélisation des transferts de pesticides dans l'environnement. La dernière initiative d'envergure dans le domaine de l'évaluation des risques de transfert tient dans le projet européen Footprint (2006-2009) qui a développé une méthodologie générique permettant de simuler les transferts de produits vers les eaux pour tous les territoires et exploitations agricoles en Europe. L'approche, qui a depuis été améliorée et rendue opérationnelle par la start-up Footways, permet de disposer des chroniques de concentrations rejetées vers les eaux souterraines et de surface pour toutes les combinaisons de molécules / dates d'application / cultures / types de sols / climats en Europe. Ces informations sur la présence de substances actives dans les milieux aquatiques peuvent être mises en regard de concentrations d'effets pour évaluer les risques d'impacts aussi bien à des échelles fines (bords de parcelles) qu'à des échelles larges (territoire national).

L'intervention présentera les dernières avancées dans le domaine de l'évaluation des risques de transfert de produits phytosanitaires et avancera des pistes de travaux pouvant s'appuyer sur cette connaissance, afin d'améliorer les méthodologies d'évaluation des risques d'impacts sur la vie aquatique. Nous aborderons également la question de la disponibilité et de la performance des modèles d'impacts.



4^{ème} Séminaire d'Ecotoxicologie
7-9 novembre 2011 – St Lager

Liste et adresse des participants

Nom Prénom	Adresse postale	Téléphone, fax et e-mail
Amichot Marcel	UMR 1301 IBSV, INRA 400 Route des Chappes 06903 Sophia-Antipolis	04 92 38 65 84 04 92 38 65 87 marcel.amichot@sophia.inra.fr
Ardo Sandy	UR 251 PESSAC, INRA Route de St-Cyr 78026 Versailles cedex	01 30 83 33 42 01 30 83 32 39 Sandy.Ardo@versailles.inra.fr
Aupinel Pierrick	UE Entomologie, INRA Le Magneraud Saint-Pierre-d'Amilly - BP 52 17700 Surgères	05 46 68 30 02 05 46 68 30 62 pierrick.aupinel@magneraud.inra.fr
Badot Pierre-Marie	UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA Chrono-Environnement Place Leclerc 25030 Besançon cedex	03 81 66 57 09 03 81 66 57 97 pierre-marie.badot@univ-fcomte.fr
Barriuso Enrique	UMR 1091 EGC, INRA- AgroParisTech Route de la Ferme 78850 Thiverval-Grignon	01 30 81 53 05 01 30 81 55 92 Enrique.Barriuso@grignon.inra.fr
Batissou Isabelle	UMR LMGE, UBP 24 Avenue des Landais - BP 26 63177 Aubière cedex	04 73 40 78 70 04 73 40 76 70 Isabelle.BATISSON@univ-bpclermont.fr
Bayona Yannick	UMR 0985 ESE, Équipe ÉQMA, INRA Agrocampus Ouest 65 rue de Saint Brieuc 35042 Rennes	02 23 48 64 48 02 23 48 54 40 Yannick.Bayona@rennes.inra.fr
Beaumelle Léa	UR 251 PESSAC, INRA Route de St-Cyr 78026 Versailles cedex	01 30 83 32 72 01 30 83 32 59 Lea.Beaumelle@versailles.inra.fr
Beguet Jérémie	UMR 1229 MSE, INRA 17 Rue Sully 21065 Dijon	03 80 69 33 84 03 80 69 32 24 jeremie.beguet@dijon.inra.fr
Benoit Pierre	UMR 1091 EGC, INRA- AgroParisTech Route de la Ferme 78850 Thiverval-Grignon	01 30 81 54 04 01 30 81 53 96 benoit@grignon.inra.fr
Bérard Annette	UMR 1114 EMMAH, INRA Domaine Saint-Paul Site Agroparc 84914 Avignon Cedex 9	04 32 72 22 28 04 32 72 22 12 annette.berard@avignon.inra.fr
Bony Sylvie	UMR LEHNA 5023, USC INRA Impact Génotoxique sur les Hydrosystèmes, ENTPE Rue Maurice Audin 69518 Vaulx en Velin	04 72 04 71 78 04 72 04 77 43 sylvie.bony@entpe.fr
Bourioug Mohamed	UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA Chrono-Environnement Place Leclerc 25030 Besançon cedex	03 81 66 57 30 03 81 66 57 97 mohamed.bourioug@univ-fcomte.fr

Nom Prénom	Adresse postale	Téléphone, fax et e-mail
Capowiez Yvan	UR 1115 PSH, INRA Domaine St Paul Site Agroparc 84914 Avignon cedex 9	04 32 72 24 38 04 32 72 24 32 yvan.capowiez@avignon.inra.fr
Caquet Thierry	Département EFPA, INRA UMR 0985 ESE, Équipe ÉQMA, INRA Agrocampus Ouest 65 rue de Saint Brieuc 35042 Rennes	02 23 48 57 66 02 23 48 54 40 Thierry.Caquet@rennes.inra.fr
Cheviron Nathalie	UR 251 PESSAC, INRA Route de St-Cyr 78026 Versailles cedex	01 30 83 39 87 01 30 83 32 59 nathalie.cheviron@versailles.inra.fr
Coeurdassier Michaël	UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA Chrono-Environnement Place Leclerc 25030 Besançon cedex	03 81 66 57 41 03 81 66 57 97 michael.coeurdassier@univ-fcomte.fr
Corbel Sylvain	UR 251 PESSAC, INRA Route de St-Cyr 78026 Versailles cedex	01 30 83 32 72 01 30 83 32 59 Sylvain.Corbel@versailles.inra.fr
Coutellec Marie-Agnès	UMR 0985 ESE, Équipe ÉQMA, INRA Agrocampus Ouest 65 rue de Saint Brieuc 35042 Rennes	02 23 48 52 48 02 23 48 54 40 Marie-Agnes.Coutellec@rennes.inra.fr
Crouzet Olivier	UR 251 PESSAC, INRA Route de St-Cyr 78026 Versailles cedex	01 30 83 32 36 01 30 83 32 59 Olivier.Crouzet@versailles.inra.fr
Decourtye Axel	UMT PRADÉ ACTA/INRA Domaine Saint-Paul Site Agroparc 84914 Avignon Cedex 9	04 32 72 26 54 04 32 72 26 02 axel.decourtye@acta.asso.fr
Denaix Laurence	UMR 1220 TCEM, INRA Avenue E. Bourleaux - BP 81 33883 Villenave d'Ornon	05 57 12 25 10 05 57 12 25 15 Laurence.Denaix@bordeaux.inra.fr
Devaux Alain	UMR LEHNA 5023, USC INRA Impact Génotoxique sur les Hydrosystèmes, ENTPE Rue Maurice Audin 69518 Vaulx en Velin	04 72 04 71 78 04 72 04 77 43 alain.devaux@entpe.fr
Dubus Igor	FOOTWAYS 10 avenue Buffon 45071 Orleans Cedex 2	02 38 63 64 65 02 38 63 64 60 i.dubus@footways.eu
Ducrot Virginie	UMR 0985 ESE, Équipe ÉQMA, INRA Agrocampus Ouest 65 rue de Saint Brieuc 35042 Rennes	02 23 48 56 25 02 23 48 54 40 Virginie.Ducrot@rennes.inra.fr
Friedel Irène	UMR 1229 MSE, INRA 17 Rue Sully 21065 Dijon	03 80 69 35 87 03 80 69 32 24 irene.friedel@dijon.inra.fr

Nom Prénom	Adresse postale	Téléphone, fax et e-mail
Fritsch Clémentine	UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA Chrono-Environnement Place Leclerc 25030 Besançon cedex	03 81 66 57 10 03 81 66 57 97 clementine.fritsch@univ-fcomte.fr
Gimbert Frédéric	UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA Chrono-Environnement Place Leclerc 25030 Besançon cedex	03 81 66 57 75 03 81 66 57 97 frederic.gimbert@univ-fcomte.fr
Hedde Mickaël	UR 251 PESSAC, INRA Route de St-Cyr 78026 Versailles cedex	01 30 83 32 70 01 30 83 32 59 Mickael.Hedde@versailles.inra.fr
Henner Pascale	IRSN/DEI/SECRE/LRE Cadarache, Bat 186, BP 3 13115 Saint Paul-lez-Durance	04 42 19 95 61 04 42 19 91 51 pascale.henner@irsn.fr
Joly Pierre	UMR LMGE, UBP 24 Avenue des Landais - BP 26 63177 Aubière cedex	04 73 40 74 53 04 73 40 76 70 Pierre.JOLY@univ-bpclermont.fr
Lagadic Laurent	UMR 0985 ESE, Équipe ÉQMA, INRA Agrocampus Ouest 65 rue de Saint Briec 35042 Rennes	02 23 48 52 37 02 23 48 54 40 Laurent.Lagadic@rennes.inra.fr
Lamy Isabelle	UR 251 PESSAC, INRA Route de St-Cyr 78026 Versailles cedex	01 30 83 32 66 01 30 83 32 59 isabelle.lamy@versailles.inra.fr
Lapchin Laurent	Direction Scientifique Environnement INRA 147 Rue de l'Université 75338 Paris Cedex 07	01 42 75 92 43 Laurent.Lapchin@sophia.inra.fr
Larras Floriane	UMR 0042 CARTEL, INRA 75 avenue de Corzent - BP 511 74203 Thonon-les-Bains Cedex	04 50 26 07 60 04 50 26 78 32 floriane.larras@thonon.inra.fr
Laurent François	UMR 5245 ECOLAB Xénobio/chimie Végétale, INRA 180 Chemin de Tournefeuille - BP 93173 31027 Toulouse	05 61 28 53 92 05 61 28 52 44 Francois.Laurent@toulouse.inra.fr
Le Gall Olivier	Département SPE, INRA 400 Route des Chappes - BP 167 06903 Sophia Antipolis Cedex	04 92 38 64 93 04 92 38 64 01 olegall@bordeaux.inra.fr
Létondor Clarisse	UMR 5245 ECOLAB Xénobio/chimie Végétale, INRA 180 Chemin de Tournefeuille - BP 93173 31027 Toulouse	05 61 28 57 17 05 61 28 52 44 Clarisse.Letondor@toulouse.inra.fr
Mamy Laure	UR 251 PESSAC, INRA Route de St-Cyr 78026 Versailles cedex	01 30 83 31 08 01 30 83 32 59 Laure.Mamy@versailles.inra.fr
Martin-Laurent Fabrice	UMR 1229 MSE, INRA 17 Rue Sully 21065 Dijon	03 80 69 34 06 03 80 69 32 24 fabrice.martin@dijon.inra.fr

Nom Prénom	Adresse postale	Téléphone, fax et e-mail
Mazella Nicolas	UR REBX, Cemagref 50 avenue de Verdun 33612 Cestas	05 57 89 27 18 05 57 89 08 01 nicolas.mazzella@cemagref.fr
Mougin Christian	UR 251 PESSAC, INRA Route de St-Cyr 78026 Versailles cedex	01 30 83 37 58 01 30 83 32 59 christian.mougin@versailles.inra.fr
Munier-Jolain Nathalie	Département EA, INRA UMR LEG, INRA 17 rue Sully - BP 86510 21065 Dijon Cedex	03 80 69 30 34 03 80 69 32 63 nathalie.munier-jolain@diijon.inra.fr
Nélieu Sylvie	UR 251 PESSAC, INRA Route de St-Cyr 78026 Versailles cedex	01 30 83 36 13 01 30 83 32 59 sylvie.nelieu@versailles.inra.fr
Nguyen Christophe	UMR 1220 TCEM, INRA Avenue E. Bourleaux - BP 81 33883 Villenave d'Ornon	05 57 12 25 07 05 57 12 25 15 Christophe.Nguyen@bordeaux.inra.fr
Pauget Benjamin	UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA Chrono-Environnement Place Leclerc 25030 Besançon cedex	03 81 66 57 10 03 81 66 57 97 benjamin.pauget@univ-fcomte.fr
Pauron David	UMR 1301 IBSV, INRA 400 Route des Chappes 06903 Sophia-Antipolis	04 92 38 65 19 04 92 38 65 87 David.Pauron@sophia.inra.fr
Pelosi Céline	UR 251 PESSAC, INRA Route de St-Cyr 78026 Versailles cedex	01 30 83 36 07 01 30 83 32 59 Celine.Pelosi@versailles.inra.fr
Pesce Stéphane	UR MALY, Cemagref 3 bis quai Chauveau - CP 220 69336 Lyon	04 72 20 87 95 04 78 47 78 75 stephane.pesce@cemagref.fr
Rault Magali	UMR 406 Abeille et Environnement, INRA/UAPV Domaine Saint-Paul Site Agroparc 84914 Avignon Cedex 9	04 32 72 26 16 04 32 72 26 02 magali.rault@avignon.inra.fr
Roucaute Marc	UMR 0985 ESE, Équipe ÉQMA, INRA Agrocampus Ouest 65 rue de Saint Briec 35042 Rennes	02 23 48 70 38 02 23 48 54 40 marc.roucaute@rennes.inra.fr
Sappin-Didier Valérie	UMR 1220 TCEM, INRA Avenue E. Bourleaux - BP 81 33883 Villenave d'Ornon	05 57 12 25 08 05 57 12 25 15 Valerie.Sappin@bordeaux.inra.fr
Vassaux Danièle	UMR 0985 ESE, Équipe ÉQMA, INRA Agrocampus Ouest 65 rue de Saint Briec 35042 Rennes	02 23 48 56 69 02 23 48 54 40 daniele.vassaux@rennes.inra.fr

