



HAL
open science

Evaluation des risques et écotoxicologie : le cas des pesticides

Thierry Caquet

► **To cite this version:**

Thierry Caquet. Evaluation des risques et écotoxicologie : le cas des pesticides. Innovations Agronomiques, 2012, 23, pp.29-54. hal-01210157

HAL Id: hal-01210157

<https://hal.science/hal-01210157>

Submitted on 28 May 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.



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

Evaluation des risques et écotoxicologie : le cas des pesticides

Thierry Caquet ¹

¹ INRA, UMR 985 INRA-Agrocampus Ouest, Ecologie et Santé des Ecosystèmes, 65, rue de Saint-Brieuc, F-35042 Rennes Cedex

Correspondance : Thierry.Caquet@rennes.inra.fr

Résumé

L'évaluation des risques écotoxicologiques associés aux substances chimiques représente l'une des applications de l'écotoxicologie. Afin d'apporter aux décideurs et gestionnaires les éléments nécessaires à une évaluation raisonnée et objective des risques liés à la présence dans l'environnement de substances toxiques issues des activités humaines, il est indispensable de mettre au point et de diffuser des outils validés et performants d'évaluation et d'alimenter la base des connaissances disponibles par la réalisation d'expérimentations ou de suivis de terrain dédiés. Après un bref rappel de ce que sont les pesticides et la présentation d'une synthèse des connaissances sur leur devenir et leurs effets dans les milieux aquatiques, nous présentons ici les principes généraux de l'évaluation des risques écotoxicologiques et son application aux pesticides, que ce soit avant leur mise sur le marché (évaluation *a priori*) ou après celle-ci (évaluation *a posteriori*).

Mots-clés : produits phytosanitaires, devenir, effets écotoxicologiques, expérimentation, biosurveillance

Abstract: Ecotoxicology and risk assessment: the case of pesticides

The assessment of the ecological risks associated with chemicals is one of the applied issues in ecotoxicology. Environmental managers need appropriate tools for the assessment of the fate and effects of toxic compounds in order to support regulatory decisions. Corresponding studies may be performed under controlled or field conditions. After a brief review of the available knowledge on the fate and effects of pesticides in aquatic ecosystems, we present the general framework and principles of ecological risk assessment. Details on their application to *a priori* or *a fortiori* pesticide risk assessment are given.

Keywords: plant protection products, fate, ecotoxicological effects, experiments, biomonitoring

Introduction

Les recherches en écotoxicologie concernent l'étude du devenir et des effets des substances toxiques dans les écosystèmes, avec comme caractéristique essentielle de s'intéresser à des continuums, qu'il s'agisse des niveaux d'organisation biologique (de l'échelle moléculaire à la biosphère) et des effets associés, ou de continuums spatio-temporels (dispersion des toxiques, interactions avec les dynamiques écologiques, etc.). Ces recherches mettent en œuvre des approches variées et complémentaires qui combinent l'expérimentation (*in vitro* mais aussi *in situ*), l'observation et la modélisation.

L'évaluation du risque écotoxicologique associé aux substances chimiques représente l'une des applications de l'écotoxicologie. Le risque correspond à la probabilité que l'introduction d'un contaminant (d'origine naturelle ou anthropique) dans un écosystème produise des effets néfastes sur les différents compartiments de cet écosystème (US EPA, 1998 ; ECB, 2003). Pour une cible donnée (consommateurs, utilisateurs, faune sauvage, ...), le risque dépend à la fois des propriétés intrinsèques de la substance considérée (= danger) et de la concentration ou de la dose à laquelle la cible est exposée (= exposition).

L'intégration de l'évaluation des risques écotoxicologiques dans la politique environnementale des pays industrialisés a une origine relativement récente (Suter, 1993). Elle contribue à une prise de décisions scientifiquement fondées pour la protection des populations humaines et de l'environnement. La distinction entre l'évaluation des risques (partie scientifique) et la gestion des risques (partie décisionnelle) constitue le cœur de cette démarche, qui n'a pas cessé d'évoluer et qui occupe actuellement une place importante au sein des politiques de gestion de l'environnement. Dans le cas des substances chimiques utilisées pour la protection des cultures par exemple, l'Union Européenne s'est progressivement dotée de législations visant à protéger la santé des consommateurs et l'environnement. Ces textes concernent notamment la définition de normes de contamination (potabilité de l'eau, résidus dans les produits alimentaires, ...), le renforcement des critères toxicologiques et écotoxicologiques pour l'homologation des produits (Directive 91/414/CE suivie du Règlement (CE) n°1107/2009) et, plus récemment, des obligations concernant l'état écologique des milieux avec la Directive cadre sur l'eau (2000/60/CE ; DCE). Adoptée en 2000, celle-ci fait obligation aux Etats-membres d'atteindre en 2015 un "bon état" chimique et écologique de leurs masses d'eau superficielles ainsi qu'un "bon état" chimique des masses d'eau souterraines. Elle ne concerne pas uniquement les pesticides mais certains d'entre eux, pour la plupart interdits aujourd'hui, font partie des substances prioritaires pour lesquelles des normes de qualité environnementale (NQE ; Directive 2008/105/CE) ont été définies. Des efforts ont aussi été accomplis afin que les milieux aquatiques qui jouxtent les parcelles agricoles soient davantage protégés, notamment en rendant obligatoire la mise en place de Zones Non Traitées (ZNT) d'une largeur minimale de 5 m en bordure des milieux aquatiques pour tous les produits. Différentes mesures complémentaires ont été prises comme le retrait de certaines substances ou l'interdiction de traiter par pulvérisation ou poudrage en cas de vent trop important. Une des mesures phares issues du Grenelle de l'Environnement est de diviser par deux la quantité totale de pesticides utilisés par l'agriculture française d'ici 2018, si possible, tout en maintenant un niveau élevé de production. Elle s'est traduite par la proposition du plan Ecophyto 2018 qui vise notamment à réduire la dépendance des exploitations agricoles aux produits phytosanitaires, tout en maintenant un niveau élevé de production en quantité et en qualité. En complément du retrait du marché des produits phytopharmaceutiques comprenant les substances actives les plus préoccupantes, le plan Ecophyto 2018 a vocation à généraliser dans l'immédiat les meilleures pratiques agricoles économes en pesticides et à mettre en place de nouveaux systèmes de production viables et diffusables permettant d'aller plus loin dans la réduction de l'utilisation en produits phytosanitaires. L'enjeu de réduction de l'utilisation de produits phytosanitaires dépassant la sphère agricole, un axe stratégique du plan est spécifiquement consacré aux enjeux de réduction et de sécurisation de l'usage des pesticides en zone

non agricole. Toutes ces nouvelles pratiques, dont certaines comportent toujours le recours à l'utilisation de pesticides, devront elles-aussi faire l'objet d'une évaluation.

Dans ce contexte, et afin d'apporter aux décideurs et gestionnaires les éléments nécessaires à une évaluation raisonnée et objective des risques associés à la présence dans l'environnement de substances toxiques issues des activités humaines, il est indispensable de mettre au point et de diffuser des outils performants et valider et d'alimenter la base des connaissances disponibles par la réalisation d'expérimentations ou de suivis de terrain dédiés. Après avoir passé brièvement en revue les principales caractéristiques des pesticides en termes de devenir et d'effets dans les milieux aquatiques, nous présentons dans ce qui suit les principes généraux de l'évaluation des risques écotoxicologiques et son application aux pesticides dans le cas des milieux aquatiques.

1. Les pesticides et leurs usages

Le terme de "pesticide" provient directement de la langue anglaise où il désigne littéralement une substance destinée à tuer les *pests*, c'est à dire les organismes nuisibles et plus particulièrement, mais pas uniquement, les organismes nuisibles aux activités agricoles. A partir du même suffixe, tout un ensemble de catégories de substances a été défini en fonction de leur cible : insecticides, herbicides, fongicides, etc. L'utilisation de substances toxiques pour éliminer des espèces indésirables est très ancienne puisque Homère et Pline le Jeune mentionnent l'emploi du soufre ou de l'arsenic et qu'en Chine le sulfure d'arsenic était utilisé au XVI^e siècle. La recherche systématique de substances organiques de synthèse remonte aux années 1930, et c'est en 1940 que fut déposé le premier brevet pour un insecticide de synthèse, le Dichloro Diphényl Trichloroéthane ou DDT. Depuis, plusieurs centaines de molécules ont été proposées comme substances actives (= responsables de l'effet toxique recherché). Une part importante des progrès en rendement de l'agriculture dans la seconde moitié du XX^e siècle a été liée à l'intensification du recours à ces substances afin de lutter contre les bioagresseurs (insectes, champignons pathogènes) ou pour réduire la compétition avec les plantes adventices. Faciles d'accès et d'emploi, relativement peu chers, les pesticides de synthèse se sont révélés très efficaces et fiables dans un nombre important de cas en dépit de l'apparition parfois rapide de résistance chez les espèces cibles. Toutefois, leur utilisation à grande échelle s'est accompagnée d'une contamination involontaire de tous les compartiments de l'environnement, qu'il s'agisse des sols, des eaux des rivières et des nappes phréatiques, de l'air ou des eaux de pluie. En France par exemple, l'IFEN (Institut Français de l'ENVironnement) a réalisé en 1998 à la demande du ministère chargé de l'environnement le premier bilan national relatif à la présence de pesticides dans les eaux. Celui-ci établissait sans conteste la présence de pesticides dans les eaux de surface et souterraines à des concentrations parfois supérieures aux normes légales. Ces résultats ont été confirmés par les études ultérieures de l'IFEN puis du Service de l'Observation Environnementale et de la Statistique (SOES) du ministère de l'écologie (voir les synthèses correspondantes sur le site de l'ORP ; <http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr>).

D'un point de vue réglementaire, on distingue les pesticides utilisés principalement pour la protection des végétaux que l'on appelle produits phytopharmaceutiques (Directive 91/414/CEE) ou plus communément produits phytosanitaires, les produits biocides (définis dans la directive 98/8/CE), et les antiparasitaires à usage humain et vétérinaire (Directives 2004/27/CE et 2004/28/CE). Les produits utilisés en protection des cultures ou pour d'autres usages sont dénommés "spécialités commerciales" ou "préparations commerciales". Celles-ci contiennent une ou plusieurs substances actives auxquelles sont ajoutés des co-formulants (= substance ou préparation dépourvue d'activité biologique propre, incluse dans une préparation lors de la formulation afin de lui conférer les propriétés nécessaires à sa mise en œuvre). D'autres produits (= adjuvants) peuvent être mélangés avec les préparations commerciales avant leur application en vue de renforcer l'efficacité des produits phytosanitaires. A

l'heure actuelle en France, il y a un peu plus de 300 matières actives homologuées qui rentrent dans la composition de près de 3000 spécialités commerciales utilisées en agriculture. Ces substances sont aussi utilisées pour divers usages non-agricoles tels que l'entretien des espaces verts et des infrastructures ferroviaires ou routières, ou bien encore certains usages domestiques (jardins amateurs, etc.). Pour les usages en jardins amateurs par exemple, une centaine de matière active et plus de 500 spécialités commerciales sont autorisées. En termes de tonnage commercialisé annuellement, la France est le 1^{er} consommateur européen de produits phytosanitaires et le 4^e consommateur mondial derrière les États-Unis, le Brésil et le Japon avec environ 78 000 tonnes de matières actives utilisées en 2008 (ORP, 2012). Ces chiffres doivent être mis en perspective par rapport à la surface agricole utile (SAU) des différents pays. Lorsque la quantité commercialisée est exprimée par hectare cultivé et sur la base des données de 2000, la France se classe au 3^{ème} rang européen derrière les Pays-Bas et le Portugal. Les usages non agricoles ne concernent qu'environ 10% des tonnages totaux en pesticides utilisés annuellement dans notre pays.

Compte tenu de la toxicité intrinsèque des pesticides et face à cette contamination généralisée, il y a une inquiétude croissante de la société vis-à-vis des dommages qu'ils peuvent causer à la santé humaine (applicateurs, consommateurs, riverains) et à l'environnement (organismes non-cibles comme les abeilles et les autres insectes pollinisateurs par exemple). Les conclusions de l'Expertise Scientifique Collective menée par l'INRA et le Cemagref ont montré que la réduction du recours aux produits phytopharmaceutiques constitue le moyen le plus efficace pour réduire l'exposition des populations humaines et de l'environnement à ces substances. En effet, dès lors que les pesticides sont utilisés, une proportion variable de la quantité appliquée tend à se disperser, immédiatement ou après un temps de latence de durée variable, en dehors de la zone visée, vers le sol, les écosystèmes aquatiques ou l'atmosphère. Les contaminations qui en découlent peuvent alors entraîner des effets néfastes sur les écosystèmes et les services écosystémiques associés, ainsi que sur la santé publique (Aubertot *et al.*, 2005).

2. La contamination des milieux aquatiques par les pesticides

La contamination des eaux souterraines et superficielles par les pesticides peut se produire à différentes étapes de leur utilisation comme par exemple lors du remplissage ou du rinçage des appareils de pulvérisation ou de l'élimination des emballages (= contamination ponctuelle), lors de l'application au champ ou après celle-ci (= contamination diffuse). Si la résolution des problèmes de contamination ponctuelle est assez facilement envisageable (construction de locaux de stockage dédiés, mise en place d'aires de remplissage ou de lavage des pulvérisateurs équipées de dispositifs de collecte et de traitement des effluents, etc.), il est beaucoup plus difficile de contrôler les phénomènes de contamination diffuse. L'ensemble des mécanismes impliqués ainsi que leurs facteurs déterminants sont relativement bien connus mais leur expression et leur importance relative sont très dépendantes des substances et des conditions environnementales.

En règle générale, la contamination des eaux de surface est maximale, en termes de concentration, dans le cas du ruissellement, moyenne pour le drainage artificiel des sols, moyenne à faible pour la percolation et le dépôt. En termes de flux, cette hiérarchisation dépend des systèmes hydrologiques. Lorsque le transport des substances a lieu par l'eau, celles-ci peuvent se trouver soit sous forme dissoute, soit être adsorbées sur les matières en suspension. Deux facteurs principaux contrôlent les proportions relatives de ces deux formes, le coefficient de partage sol-eau (K_d) de la substance et la charge en matières en suspension de l'eau d'écoulement. La valeur de K_d varie en fonction de la nature chimique des molécules, mais aussi en fonction des caractéristiques de la phase solide et en particulier

de sa teneur en matière organique (Barriuso *et al.*, 1996). Les molécules à fortes propriétés d'adsorption sont peu mobiles et présentent des risques plus restreints de contamination des eaux. De nombreux écoulements présentent des teneurs en matières en suspension réduites, notamment les écoulements de subsurface, ce qui conduit à un transport majoritairement en phase soluble (Leonard, 1990).

La contamination des eaux présente des variations importantes dans le temps. Lorsqu'un temps suffisamment long s'écoule entre deux épandages, elle présente le plus souvent une décroissance quasi-exponentielle quelle que soit la voie d'écoulement (Heydel *et al.*, 1999). La diminution de la disponibilité des pesticides dans le sol est un facteur majeur de contrôle de l'évolution de la contamination de l'eau. Elle n'est pas seulement fonction du stock en molécules dans le sol, qui varie avec leur dégradation, mais également de l'intensité de la rétention (formation éventuelle de résidus liés pour certaines substances, pouvant représenter jusqu'à 90 % des quantités initialement appliquées ; Barriuso *et al.*, 2004).

La rétention des substances sur la phase solide du sol est un processus favorable à court terme car elle diminue la disponibilité au transfert des molécules, mais la rétention et la formation de résidus liés n'éliminent pas les molécules et posent donc le problème de leur éventuelle libération à long terme si les conditions environnementales du sol se modifient (Loiseau et Barriuso, 2002). Ceci peut conduire à une contamination à long terme des eaux, y compris après qu'une substance ne soit plus utilisée (contamination chronique d'eaux de drainage par de l'atrazine sept ans après l'arrêt des traitements par exemple ; Novak *et al.*, 1998). L'intensité des écoulements influence aussi fortement leur niveau de contamination (Lennartz *et al.*, 1997). Quelle que soit la substance concernée, le risque maximal de contamination correspond généralement au cas d'une forte averse qui se produirait quand la disponibilité de la substance est maximale dans le sol, c'est à dire juste après l'application ou l'arrivée du produit au sol. Dans le cas de molécules peu ou moyennement persistantes dans le sol, un seul événement de pluie peut provoquer la majeure partie des pertes annuelles (Lennartz *et al.*, 1997).

Les apports de pesticides dans les milieux aquatiques situés en zone rurale se caractérisent par une importante hétérogénéité temporelle, des pics de pollution se produisant par exemple juste après des épisodes pluvieux ou lors de crues (Neumann *et al.*, 2003). Les concentrations les plus élevées sont mesurées dans les fossés et canaux de drainage (Neumann *et al.*, 2003), les pesticides étant alors apportés par les drains (Gentry *et al.*, 2000) et/ou par ruissellement (Schulz *et al.*, 1998). En règle générale, la contamination des eaux de surface est d'autant plus élevée que la surface des bassins versants est faible (Schulz, 2004).

Les différentes voies de transfert sont parfois difficiles à formaliser, en particulier quand il s'agit de prendre en compte les phénomènes biologiques de dégradation, l'interaction entre ces voies, l'échelle supérieure à celle de la parcelle, etc. Les niveaux de contamination des milieux aquatiques dépendent en outre d'autres processus qui interviennent dans le devenir des molécules en phase aqueuse tels que la photolyse, l'hydrolyse, l'adsorption sur les matières en suspension ou les sédiments et la biodégradation (Arts *et al.*, 2005).

Il est aussi très difficile de tenir compte de la rémanence de certaines substances appliquées il y a longtemps. Certains pesticides peuvent en effet persister longtemps après leur utilisation et passer d'un compartiment à l'autre, soit passivement (*e.g.*, désorption, évaporation, érosion), soit activement via des processus biologiques (métabolisation, bioturbation, bioconcentration, etc.). Ceci a conduit au développement de modèles qui permettent parfois de prendre en compte la variabilité des mesures de terrain et de la complexité des processus, afin de quantifier et prédire les niveaux d'exposition des différents compartiments de l'environnement. Des progrès considérables ont été accomplis ces dernières années concernant ce type de modèles, même si certaines améliorations pour prédire les évolutions à long terme des contaminations à des échelles plus larges que celle de la parcelle sont encore nécessaires (pour une revue voir Voltz *et al.*, 2005).

3. Les effets des pesticides sur les écosystèmes aquatiques

Des impacts significatifs des pesticides ont été mis en évidence en milieu naturel ou lors d'expérimentations dans des écosystèmes expérimentaux pour tous les compartiments biologiques des milieux aquatiques. Par le jeu des relations alimentaires entre espèces, les impacts observés aux niveaux inférieurs des réseaux trophiques peuvent se propager ("*bottom-up*") jusqu'aux niveaux les plus élevés (prédateurs, superprédateurs). Des modifications de la compétition entre consommateurs peuvent aussi avoir des conséquences non seulement au sein du niveau auxquels ils appartiennent mais aussi sur les autres compartiments du réseau, par des mécanismes de type "*bottom-up*" ou au contraire "*top-down*". Exploitant les résultats d'études menées dans des écosystèmes aquatiques expérimentaux, Brock *et al.* (2000a, 2000b) ont fait une synthèse des effets connus des herbicides et des insecticides en milieu aquatique en identifiant les enchaînements probables d'effets directs et indirects (Figure 1).

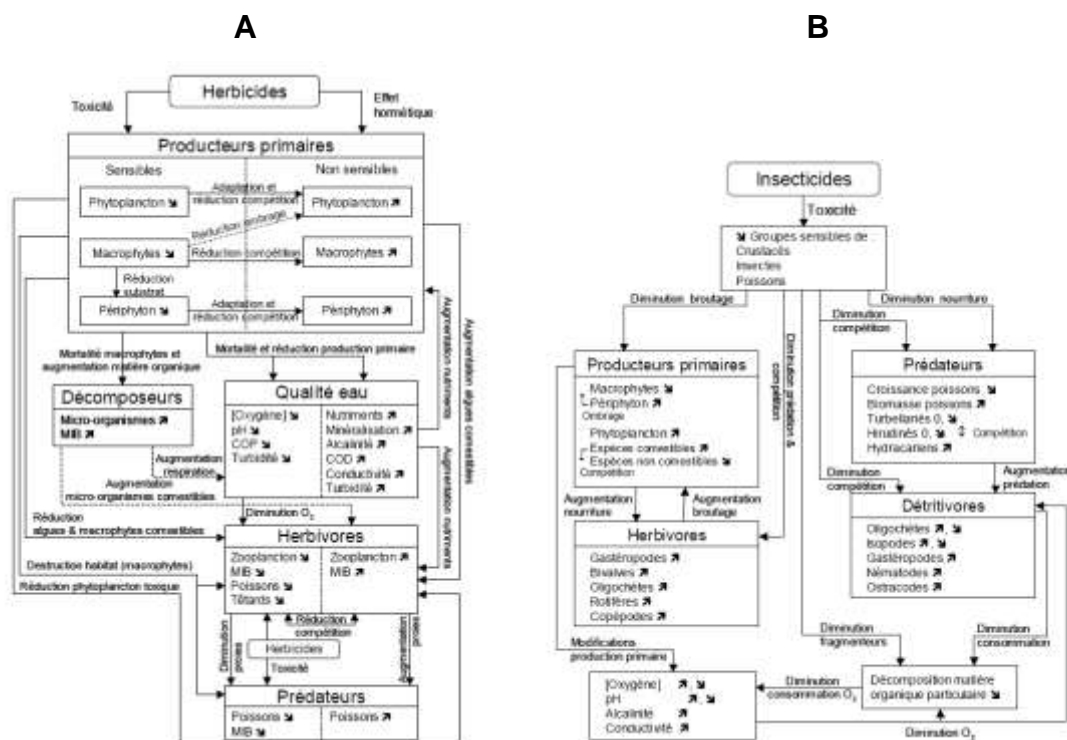


Figure 1 : Synthèse des connaissances disponibles sur les effets possibles des pesticides au sein des réseaux trophiques aquatiques. A. Herbicides (d'après Brock *et al.*, 2000a in Voltz *et al.*, 2005 ; COD : carbone organique dissous, COP : carbone organique particulaire, MIB : macro-invertébrés benthiques). B. Insecticides (d'après Brock *et al.*, 2000b in Voltz *et al.*, 2005).

Dans le cas des herbicides (Figure 1A), les modifications d'abondance et/ou de biodiversité des producteurs primaires peuvent entraîner des altérations des conditions de vie pour les autres espèces (baisse de la concentration en oxygène dissous et/ou du pH par exemple). La mort de certains végétaux et les conséquences négatives sur la production primaire peuvent aussi entraîner des modifications d'autres paramètres physico-chimiques (augmentation de la concentration en nutriments, de l'alcalinité, de la conductivité, etc.) qui découlent du relargage de substances présentes dans les tissus des organismes tués par les herbicides. L'augmentation de la concentration en nutriments peut alors avoir un effet stimulant sur les espèces les moins sensibles, avec des conséquences positives en cascade sur les herbivores qui s'en nourrissent, voire sur les prédateurs de ces herbivores.

Lorsque les macrophytes sont fortement affectés, les effets indirects sont généralement très importants, en particulier du fait de la disparition de certains habitats pour le périphyton et de nombreuses espèces animales. Les algues du plancton peuvent parfois profiter de la diminution de l'abondance des macrophytes, en raison d'une diminution de l'ombrage et du relargage de nutriments suite à la décomposition des macrophytes morts. Enfin, la destruction des macrophytes peut avoir un effet positif temporaire sur les décomposeurs (micro-organismes et macro-invertébrés), qui se traduit par une augmentation de la consommation d'oxygène dissous et de l'abondance de nourriture pour les espèces qui se nourrissent de décomposeurs.

Dans le cas des insecticides, il existe de très nombreux exemples d'effets directs et indirects dans les milieux aquatiques (Figure 1B). Ces effets sont fonction de divers paramètres tels que la température, les caractéristiques des molécules, la structure de la communauté et la saison d'étude. La sensibilité de différents groupes d'arthropodes (crustacés, insectes) et de poissons est connue et parfois confirmée lors d'études réalisées en milieu naturel. Ces organismes peuvent appartenir à différents groupes fonctionnels trophiques (herbivores, prédateurs, détritivores, etc.) et la mort de certains d'entre eux peut avoir des conséquences importantes sur les relations de compétition ou de prédation : prolifération des producteurs primaires en raison de la diminution de la pression de broutage par les crustacés et les insectes, augmentation de l'abondance des rotifères et parfois des mollusques gastéropodes du fait de la diminution de la compétition avec les arthropodes herbivores et de l'augmentation des ressources alimentaires disponibles. Les insecticides peuvent aussi affecter directement ou indirectement les organismes détritivores, et notamment les déchiqueteurs. Ce groupe fonctionnel est fréquemment constitué en milieu naturel par des crustacés amphipodes (gammare) et isopodes (aselles) et par diverses larves d'insectes (larves de trichoptères par exemple) qui sont particulièrement sensibles aux insecticides. En présence d'insecticides, une diminution de l'activité de ces organismes (évaluée par exemple par la mesure de la dégradation de la litière) est attendue. L'augmentation de l'abondance d'autres types de détritivores comme les annélides Oligochètes par exemple, est souvent observée, du fait d'une réduction de la compétition avec les arthropodes sensibles. La conséquence la plus fréquente aux niveaux supérieurs des réseaux trophiques est une diminution de la disponibilité des ressources alimentaires pour les prédateurs dont certains s'attaquent alors parfois à d'autres espèces plus tolérantes. L'élimination ou la réduction de la densité des proies par des insecticides peuvent avoir des effets négatifs sur les prédateurs, tels qu'une réduction de la croissance ou un accroissement de leur propre vulnérabilité vis-à-vis de la prédation. Inversement, la réduction des effectifs de certains prédateurs peut parfois s'accompagner d'une augmentation de l'abondance de certaines de leurs proies.

Les effets des pesticides peuvent aussi se manifester à long terme via par exemple un impact sur la diversité génétique des populations de certaines espèces. La prise en compte d'une dimension évolutive dans l'analyse des effets des pesticides sur les organismes non cibles constitue une évolution relativement récente des travaux de recherche en écotoxicologie (Forbes, 1999 ; Coutellec et Lagadic, 2006). Elle reflète la prise de conscience de l'impact à long terme de l'exposition chronique des organismes à des polluants, et des processus adaptatifs ou d'extinction qui peuvent se développer au fil des générations (Bickham *et al.*, 2000 ; Medina *et al.*, 2007). Ces processus sont bien connus en ce qui concerne les espèces cibles, notamment du fait de l'analyse des phénomènes de résistance aux pesticides chez divers types d'organismes (plantes adventices, bioagresseurs, insectes vecteurs, ...; Aubertot *et al.*, 2005), qui apparaissent parfois très rapidement. Ils sont difficiles à prédire, car ils dépendent des mécanismes physiologiques et moléculaires de défense sollicités (Morgan *et al.*, 2007), de leurs éventuelles interactions, de leur relation avec les traits liés à la valeur sélective (Coustau *et al.*, 2000 ; Silbermann et Tatar, 2000 ; van Straalen et Hoffmann, 2000), ainsi que de l'histoire d'exposition de la population, de sa variabilité génétique et de son effectif (Willi *et al.*, 2006). L'impact écologique négatif (coût) de l'évolution d'une adaptation à un toxique peut s'exprimer lorsque les conditions environnementales redeviennent normales. De plus, la baisse de diversité génétique accompagnant

l'adaptation a en théorie des conséquences négatives sur la capacité des populations à faire face à d'autres perturbations environnementales, y compris d'origine naturelle. A l'échelle évolutive, on s'attend également à une moins bonne capacité de réponse à d'autres pressions de sélection.

4. L'évaluation des risques écotoxicologiques

L'évaluation des risques écotoxicologiques peut s'envisager :

- de manière **prospective** (*a priori*) avant que les substances concernées soient mises sur le marché. Dans l'Union Européenne, cette démarche *a priori* est actuellement mise en œuvre pour les pesticides (Directive 91/414/EEC ; EC, 1991), les biocides (Directive 98/8/EC ; EC, 1998) et certaines substances chimiques existantes (Règlement de la Commission 1488/94 ; EC, 1994) ou nouvelles (Directive 93/67/EEC ; EC, 1993). Dans le cas des pesticides l'évaluation des risques comprend plusieurs circuits. Le **circuit européen** comporte l'évaluation de chaque substance active et d'une préparation commerciale représentative de l'utilisation dans les états membres. Le dossier d'évaluation est constitué par la société qui souhaite commercialiser la substance. L'évaluation est coordonnée par l'EFSA (*European Food Safety Agency*). Un état membre est désigné comme rapporteur. C'est lui qui examine le dossier d'homologation et rédige un projet de monographie sur la substance active. Les autres états membres examinent ensuite le projet de monographie et consolident l'évaluation des risques (PRAPeR : *Pesticide Risk Assessment Peer Review*). Le résultat est ensuite publié au journal de l'EFSA. La Commission Européenne examine ensuite le journal de l'EFSA et propose une décision d'inclusion ou de non inclusion dans la liste des substances actives autorisées en Europe, qui est votée au Comité Permanent de la Chaîne Alimentaire et Santé Animale (CP CASA). La durée totale du processus est généralement de 2 à 3 ans. Le circuit de **l'évaluation nationale** a été mis en place pour traiter divers dossiers : demande d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour les nouvelles préparations, demande d'extension d'usage, dossiers de ré-examen de préparations déjà sur le marché, demande de changement mineur de composition (remplacement d'un co-formulant par un autre, augmentation ou diminution de la teneur en un formulant), demande d'autorisation de distribution pour expérimentation (ADE ; pour les produits en développement pour lesquels l'industriel souhaite procéder à des expérimentations au champ). En France c'est la Direction des Produits Réglementés (DPR) de l'ANSES qui coordonne et réalise l'évaluation. Les Comités d'Experts Spécialisés (CES) de l'ANSES réalisent l'évaluation ou valident des rapports d'évaluation réalisés en interne. La DPR a pour mission de consolider les rapports d'évaluation, de préparer les avis de l'ANSES, les propositions de décision et les *Registration Reports*. La décision finale est prise par le Ministère de l'Agriculture après une consultation interministérielle. La durée totale de ce circuit est de l'ordre de 10 mois. **L'évaluation zonale**, nouvelle procédure issue du Règlement (CE) n°1107/2009, trouve son origine dans le découpage du territoire de l'UE en trois zones (Nord, Centre et Sud, zone à laquelle appartient la France). Ces zones reflètent les gradients climatiques et environnementaux au sein du territoire de l'Union. Dans une zone donnée, un des pays évalue le dossier pour une préparation phytopharmaceutique (*Zonal RMS*). Il établit un rapport d'évaluation (*Zonal Registration Report*) qui est envoyé à tous les autres états de la Zone. Ceux-ci commentent le rapport et contribuent éventuellement à la rédaction d'Addendum nationaux pour répondre aux exigences nationales des différents états. Le *Zonal Registration Report* est finalisé en prenant en compte les commentaires, à la suite de quoi le produit est autorisé ou non-autorisé dans l'ensemble de la zone.
- de manière **rétrospective** ou diagnostique (*a posteriori*), une fois que les substances ont été commercialisées et utilisées. L'évaluation *a posteriori* repose sur des informations principalement recueillies dans un écosystème donné. Il s'agit, à l'issue de l'étude, de décrire les voies de transfert

du ou des contaminant(s) considérés, et de mettre en évidence les effets éventuels de la contamination sur les différents compartiments biotiques. Cette démarche diagnostique au cas par cas peut aussi s'envisager comme un complément obligatoire à l'évaluation *a priori*. Dans le cas des pesticides par exemple, la réglementation européenne prévoit qu'un suivi post-homologation de certaines substances actives, qui correspond de fait à une évaluation *a posteriori*, peut être exigé une fois que ces substances ont reçu leur autorisation de mise en marché (AMM). Toutefois, il n'y a pas à l'heure actuelle d'indications précises sur la forme que doit prendre ce suivi (Liess *et al.*, 2005).

L'évaluation des risques écotoxicologiques est réalisée selon un protocole itératif bien défini (Figure 2), qui est commun à toutes les procédures développées dans les pays industrialisés et qui correspond en fait à une adaptation de protocoles proposés initialement pour l'évaluation des risques pour la santé humaine (Suter *et al.*, 2003). Elle comporte trois phases : (i) formulation du problème, (ii) analyse et (iii) caractérisation du risque.

La phase de formulation du problème repose sur quatre étapes :

- L'intégration des informations disponibles.
- Le choix des cibles (= *endpoints*) pour l'évaluation des risques, qui reflète fréquemment les objectifs de gestion.
- L'élaboration du modèle conceptuel décrivant les relations existantes entre le toxique et les cibles.
- Le développement du plan d'analyse et de caractérisation du risque.

La phase d'analyse comporte deux étapes principales : la caractérisation de l'exposition et celle des effets. L'analyse vise également à décrire les relations entre l'exposition et les effets, et les caractéristiques de l'écosystème à l'étude. L'objectif de cette phase est de fournir les éléments nécessaires à la détermination ou à la prévision de réponses écologiques pouvant être engendrées par l'exposition à la substance considérée.

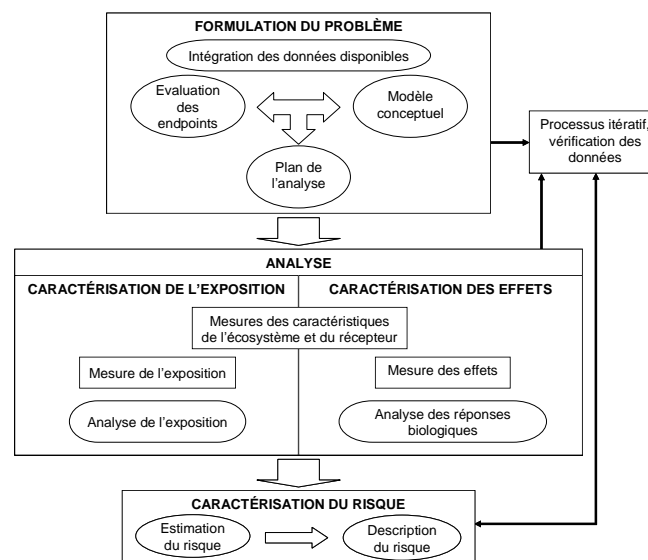


Figure 2 : Représentation schématique des procédures mises en œuvre pour l'évaluation des risques écotoxicologiques pour les écosystèmes (d'après US EPA, 1998 ; ECB, 2003).

4.1 Caractérisation de l'exposition

Dans le cas de l'évaluation *a priori*, la caractérisation de l'exposition consiste dans un premier temps à définir les caractéristiques des émissions potentielles d'une ou de plusieurs substance(s). Elle vise ensuite à déterminer les voies et les vitesses de transfert, et les phénomènes de transformation ou de dégradation caractéristiques de ces substances (biodégradation, hydrolyse, adsorption, ...). Dans le cas des pesticides, les groupes de travail européens FOCUS (*FORum for the Coordination of pesticide fate models and their USE*) ont permis des avancées importantes dans la prise en compte de la modélisation en évaluation du risque. Constitués de chercheurs et de représentants de l'industrie et des autorités d'homologation des pesticides, ils ont travaillé à la synthèse des connaissances et à la formulation de propositions d'amélioration des démarches d'évaluation de risque mettant en jeu des modèles de transfert des pesticides. C'est ainsi qu'on a été élaborés divers scénarios qui concernent la contamination des eaux souterraines (FOCUS GW ; <http://focus.jrc.ec.europa.eu/gw/index.html>) et des eaux de surface (FOCUS SW ; <http://focus.jrc.ec.europa.eu/sw/index.html>). Les groupes FOCUS se sont aussi intéressés à la contamination de l'air (FOCUS Air ; <http://focus.jrc.ec.europa.eu/ai/index.html>), ainsi qu'à la problématique de la mitigation du risque (FOCUS Landscape and Mitigation ; <http://focus.jrc.ec.europa.eu/lm/>). La mise en commun des connaissances et le développement de la modélisation des transferts ont aussi été favorisés par certains programmes de recherche européens dont le programme Footprint (www.eu-footprint.org/fr/). Il est maintenant possible, à partir des connaissances disponibles sur les caractéristiques de l'itinéraire de protection phytosanitaire mis en œuvre par un agriculteur et sur les conditions édaphiques et climatiques, de mettre en œuvre des modèles de transfert qui permettent de prédire les dates auxquelles chacune des substances appliquées est susceptible d'être transférée dans un milieu aquatique situé à proximité d'une parcelle traitée, ainsi que les valeurs des flux correspondants. L'objectif final est d'évaluer les concentrations auxquelles les communautés animales et végétales sont exposées ou susceptibles d'être exposées afin de déterminer une concentration prédite dans l'environnement (*Predicted Environmental Concentration* ou PEC).

Dans le cas d'une évaluation de risque *a posteriori*, les concentrations ou doses peuvent être directement mesurées *in situ*, dans le cas de réseaux de surveillance de la qualité de l'environnement ou par la mise en place de campagnes de mesures spécifiques. Les analyses peuvent être effectuées dans diverses matrices environnementales (eau, sédiments, organismes). L'échantillonnage doit être réalisé en fonction des caractéristiques connues ou suspectées de la pollution (chronique ou ponctuelle, localisée ou diffuse, etc.). C'est vraisemblablement dans les cas de pollution diffuse que la définition du plan d'échantillonnage pour l'analyse chimique est la plus délicate. Les prélèvements doivent alors être réalisés de façon couplée avec certains événements (application des substances, précipitations, etc.). Dans le cas des apports par ruissellement ou drainage dans les milieux aquatiques, il est aussi utile de disposer d'échantillons prélevés après le pic de pollution, afin de bien caractériser le patron d'exposition des organismes. L'interprétation des résultats de l'analyse chimique se fait le plus souvent par comparaison des valeurs obtenues avec des valeurs de référence (NQE par exemple pour les substances prioritaires de la DCE). La détermination d'Unités Toxiques (*Toxic Units*) constitue une autre façon d'exploiter les résultats de l'analyse chimique. Elle repose sur le calcul de rapports entre la concentration mesurée pour une substance dans le milieu étudié et une valeur de référence, généralement dérivée de tests de toxicité aiguë (Peterson, 1994) :

$$UT(X, i) = \log \left(\frac{C_i}{CL50_{X,i}} \right)$$

Où C_i est la concentration de la substance i dans le milieu étudié, X est une espèce de référence (la daphnie *Daphnia magna* par exemple) et $CL50_{X,i}$ est la concentration létale pour 50 % des individus de l'espèce X .

4.2 Caractérisation des effets

Dans certains cas, l'exposition des organismes peut se traduire par des effets qui, selon l'importance et la nature de la contamination, peuvent affecter les individus, les populations ou les communautés. A terme, c'est l'intégrité même des écosystèmes qui peut être menacée (Figure 3).

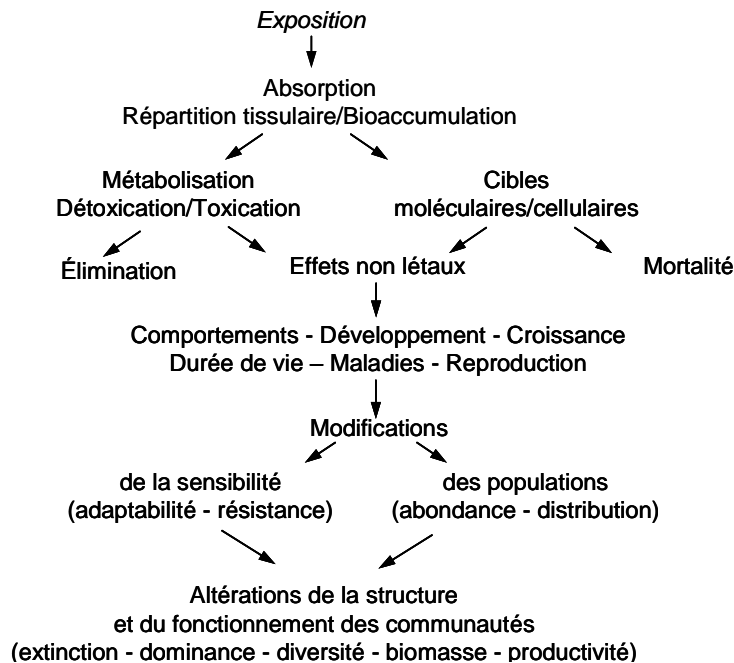


Figure 3 : Enchaînement théorique des effets induits à différents niveaux d'organisation biologique en présence d'une substance toxique (d'après Caquet et Lagadic, 1998).

Deux grandes catégories d'effets peuvent être distinguées :

- Des effets directs, qui apparaissent à la suite de l'exposition d'un compartiment biotique à une substance toxique (Hanazato, 2001) ;
- Des effets indirects, qui concernent des espèces *a priori* non sensibles et qui découlent le plus souvent de l'élimination de certaines espèces, ou tout du moins de la réduction de leurs effectifs, qui entraînent des modifications des relations trophiques ou de compétition (Fleeger *et al.*, 2003). Ils se produisent notamment lorsque certaines substances affectent directement des espèces importantes pour le fonctionnement des écosystèmes (plantes supérieures, herbivores dominants, prédateurs, etc.). Il est parfois difficile de faire une distinction entre les deux types d'effets lorsque les seules données disponibles sont des observations de terrain.

La caractérisation des effets des substances toxiques sur les organismes et les écosystèmes aquatiques peut être réalisée soit *via* la réalisation d'expérimentations dédiées (évaluation *a priori* ou *a posteriori*), soit grâce à des observations de terrain (évaluation *a posteriori*).

4.2.1. Approches expérimentales

La Figure 4 présente une synthèse des différents outils utilisables pour l'acquisition de données expérimentales sur les effets des substances toxiques pour les organismes aquatiques. Des études en

laboratoire aux expérimentations conduites en conditions naturelles, la complexité des interactions entre les différents niveaux d'organisation biologique s'accroît, en même temps que la représentativité écologique des systèmes expérimentaux.

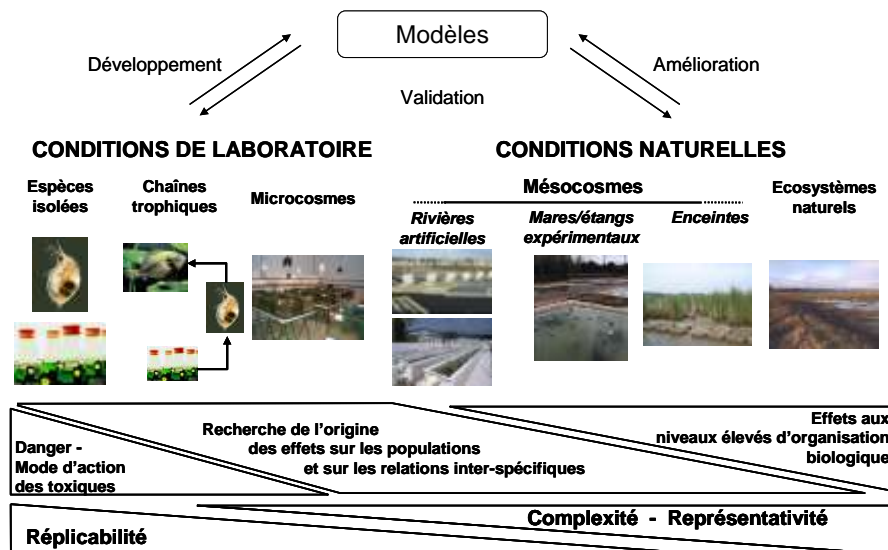


Figure 4 : Outils expérimentaux utilisés en écotoxicologie aquatique (modifié d'après Caquet *et al.*, 2000).

- *Expérimentations en laboratoire*

Pour estimer les concentrations susceptibles d'engendrer un effet sur un organisme, des biotests (bioessais) sont généralement réalisés sur des espèces modèles. Au laboratoire, il est possible de procéder à des tests de toxicité mono- ou plurispécifiques. Ces tests, souvent normalisés, permettent d'évaluer le potentiel toxique intrinsèque d'une substance (danger). Ils permettent également de comparer la toxicité de plusieurs substances. Ils sont le plus souvent conduits sur des espèces représentatives de différents niveaux trophiques (microalgue, herbivore, poisson). Les espèces testées doivent également pouvoir être facilement élevées en laboratoire. Ces tests ont pour objectif d'estimer diverses grandeurs : concentrations létales (CL) ou efficaces (CE) dans le cas de tests de toxicité aiguë (notamment la CL50 qui est la concentration létale pour 50% des individus exposés), concentrations sans effets prédits (*No Observed Effect Concentrations* ou NOEC) ou plus basse concentration à laquelle un effet est observé (*Lowest Observed Effect Concentration* ou LOEC) dans le cas de tests de toxicité chronique (critère d'effet : croissance ou reproduction par exemple). Cependant, les tests de toxicité conduits en laboratoire dans des conditions simplifiées ne permettent d'évaluer que certains effets directs des substances toxiques. La simplicité des conditions expérimentales ne permet pas de prendre en compte les phénomènes qui, au sein des écosystèmes, peuvent augmenter (présence de stades ou d'espèces plus sensibles, (bio)accumulation, bioturbation) ou au contraire réduire (adsorption sur les sédiments ou les matières en suspension, dégradation accélérée) la biodisponibilité et/ou la toxicité des contaminants.

L'utilisation de chaînes trophiques expérimentales peut permettre de mettre en évidence des phénomènes de contamination à partir de la nourriture et éventuellement de bioamplification. L'emploi de microcosmes, écosystèmes miniatures de laboratoire avec de l'eau, du sédiment et une ou plusieurs espèces animales ou végétales, permet de se rapprocher des conditions environnementales naturelles et de prendre en compte divers phénomènes telle que l'adsorption des substances toxiques sur les sédiments ou les interactions entre espèces par exemple.

- *Expérimentations en conditions naturelles*

En conditions naturelles, les moyens d'investigation vont de la mise en place d'écosystèmes expérimentaux (canaux, mares, étangs) à la contamination de milieux naturels, en passant par l'emploi d'enceintes qui délimitent une portion d'un écosystème naturel. Le terme de mésocosmes (écosystèmes artificiels placés en conditions environnementales naturelles ; Odum, 1984) est utilisé pour désigner des canaux ou rivières artificielles, des mares ou étangs expérimentaux ou bien encore des enclos. Ces systèmes représentent un degré d'organisation intermédiaire entre la simplicité des essais de laboratoire et la complexité des milieux naturels. S'ils ont dans un premier temps été conçus pour des études écologiques, il est apparu très rapidement qu'ils pouvaient aussi fournir des informations pertinentes pour l'évaluation du devenir et des effets des polluants dans les milieux aquatiques (Perceval *et al.*, 2010). Les caractéristiques de base des mésocosmes utilisés en écotoxicologie ont été largement décrites dans la littérature scientifique (Caquet *et al.*, 2000). Ils permettent d'évaluer les effets des substances testées à des niveaux d'organisation biologiques variés grâce à la mesure de différentes réponses qualitatives et/ou quantitatives. Il est aussi possible de mettre en évidence les effets directs et indirects des substances toxiques sur les différents compartiments des écosystèmes aquatiques. De plus, les phénomènes qui réduisent (adsorption sur les matières en suspension ou sur les sédiments) ou augmentent (bioturbation) la biodisponibilité des contaminants, et peuvent donc influencer éventuellement sur leur toxicité, peuvent être pris en compte. L'objectif des mésocosmes n'est pas de mimer un écosystème naturel précis. Il s'agit en fait de constituer des systèmes ayant des caractéristiques propres, dans lesquels vont pouvoir être mis en place des scénarios variés (organismes présents, nature de la contamination, etc.) et réalistes du point de vue écologique. Grâce à leur durée de vie, ces outils permettent aussi d'aborder la question des effets liés non plus à une substance isolée mais à l'ensemble des produits utilisés dans un itinéraire de protection phytosanitaire, en réalisant des expérimentations de plusieurs mois, voire plusieurs années (Arts *et al.*, 2005). Ceci peut notamment permettre de comparer plusieurs types d'itinéraires techniques et d'évaluer par exemple les progrès associés à la mise en œuvre d'itinéraires "bas intrants pesticides" (Auber *et al.*, 2011). Ils rendent aussi possible la réalisation d'études d'écotoxicologie évolutive (Coutellec et Caquet, 2011 ; Coutellec *et al.*, 2011). Les installations de l'Unité Expérimentale d'Ecologie et d'Ecotoxicologie aquatique (U3E) de l'INRA de Rennes récemment labellisées dans le cadre du projet d'Infrastructure en Biologie et Santé ANAEE-Services constituent un exemple remarquable d'outils de ce type.

Au cours des dernières décennies, la manipulation d'écosystèmes entiers a été un moyen d'investigation très utile pour l'étude du fonctionnement des écosystèmes en conditions normales et perturbées. Dans le domaine des applications en écotoxicologie figurent la contamination à long terme de lacs par du mercure, du cadmium ou des hormones de synthèse (Findlay *et al.*, 1996 ; Malley, 1996 ; Kidd *et al.*, 2007). Bien que théoriquement très représentative d'un point de vue écologique, la contamination volontaire des écosystèmes naturels présente diverses difficultés (absence d'un témoin fiable, fluctuations naturelles incontrôlées de nombreux paramètres qui peuvent influencer sur le devenir ou les effets des toxiques, ...) et soulève des problèmes éthiques.

Une situation intermédiaire consiste à identifier dans des espaces naturels des zones témoins (= non exposées) et des zones traitées (= dans lesquelles la substance testée est introduite selon un protocole défini précisément) renfermant chacune plusieurs écosystèmes de même nature. L'analyse comparative des systèmes écologiques témoins et exposés aux toxiques et la mesure simultanée de diverses variables environnementales naturelles permettent d'extraire le signal lié aux toxiques du bruit de fond naturel. Cette stratégie est par exemple mise en œuvre de manière opérationnelle depuis plus de 10 ans pour l'évaluation de l'impact des traitements de démoustication dans les zones humides littorales du Morbihan (Caquet *et al.*, 2011) et elle a été récemment étendue à d'autres zones du littoral Atlantique dans le cadre des études d'incidence obligatoires en zone Natura 2000, et dans d'autres secteurs

soumis à la démoustication sur le territoire métropolitain et dans les DOM (Programme Life + *Integrated Mosquitoes Control Management*, coordonné par l'EID Méditerranée ; <http://www.lifeplusmoustique.eu/>).

4.2.2. Observations en milieu naturel

La mise en évidence d'une relation de causalité entre la présence de substances toxiques dans les milieux naturels et leurs effets impose de réaliser en parallèle l'analyse du niveau de contamination des écosystèmes (voir plus haut) et celles des effets biologiques. L'une des principales difficultés à résoudre réside dans la collecte des données (échantillonnage) qui doit souscrire à divers principes fondamentaux (Lévêque, 2001) :

- La définition des objectifs implique un choix des variables à étudier pour répondre aux questions posées.
- Les questions de l'échantillonnage et du traitement des données ne doivent pas être traitées séparément.
- Le caractère dynamique des écosystèmes naturels implique de considérer simultanément plusieurs échelles d'observation.

Toutefois, les moyens d'investigation sont, la plupart du temps, limités. En particulier, l'échantillonnage est soumis à des contraintes naturelles (diversité des habitats, hétérogénéité des peuplements, etc.), techniques (adéquation des moyens d'échantillonnage au comportement des organismes), humaines et financières (fréquence et nombre des échantillons par exemple).

Les critères les plus fréquemment mesurés dans les études de terrain sont :

- Au niveau individuel : survie, croissance, biomarqueurs, performances reproductives, réponses comportementales.
- Au niveau des populations : abondance, distribution spatiale, dynamique, taux de croissance, recolonisation et restauration, structure d'âge, structure génétique, consanguinité, biomasse.
- Au niveau des communautés : diversité et/ou richesse spécifique, dominance, biomasse des différentes espèces, présence/absence d'espèces indicatrices, indices numériques, critères fonctionnels.

Bien que de très nombreux outils biologiques d'évaluation de la qualité des milieux aquatiques aient été proposés, leur utilisation opérationnelle pour la mise en évidence des effets des substances toxiques dans les milieux naturels se heurte à diverses difficultés. C'est notamment le cas pour trois catégories d'outils très utilisés, les biomarqueurs, les bioindicateurs et les critères fonctionnels (Voltz *et al.*, 2005).

- Les **biomarqueurs** sont des *changements observables et/ou mesurables au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèlent l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant* (Lagadic *et al.*, 1997). Ces outils peuvent en théorie permettre de montrer que des organismes ont été exposés à des contaminants et/ou que cette exposition est associée à une dégradation de l'état de santé des individus (y compris des effets sur des fonctions essentielles comme la croissance et la reproduction). La stratégie à mettre en œuvre consiste à utiliser une palette de biomarqueurs, et non pas un biomarqueur unique. Si l'objectif est de mettre en évidence des effets délétères de l'exposition, il convient alors d'utiliser préférentiellement des biomarqueurs qui sont impliqués dans des processus essentiels à la survie de l'organisme (activité acétylcholinestérase ou AChE par exemple).

L'une des principales limites à l'utilisation pratique des biomarqueurs est leur variabilité, qui peut être due à des facteurs abiotiques (température, salinité, oxygénation, etc.) ou biotiques (génotype, plasticité

phénotypique, âge, sexe, taille, état reproducteur, état nutritionnel, etc.). Tous ces facteurs peuvent eux même varier dans le temps et dans l'espace, ajoutant ainsi des sources supplémentaires de variabilité. Certains facteurs peuvent être contrôlés lors de la définition des plans d'échantillonnage (âge et sexe des individus échantillonnés par exemple) mais il est de toute façon nécessaire de disposer d'une connaissance approfondie des sources endogènes et exogènes de variation de ces paramètres. Il est aussi indispensable d'examiner la force de l'association entre contaminant et réponse du biomarqueur, la constance de cette association, le caractère plausible des liens toxicologiques et biologiques impliqués, l'enchaînement temporel des phénomènes, l'existence d'un gradient de réponse en présence d'un gradient de contamination, etc.

En l'état actuel des connaissances, les biomarqueurs sont surtout considérés comme des indicateurs de la présence (actuelle ou passée) de polluants dans le milieu et/ou dans les organismes (Triebkorn *et al.*, 2002). En revanche, l'estimation de l'impact des polluants sur les performances individuelles à partir de mesures de l'état de santé des individus reste problématique. La majorité des études réalisées jusqu'à présent n'ont permis d'établir que des corrélations entre l'expression des biomarqueurs et la valeur de traits biologiques mesurés chez des individus stressés (Jumel *et al.*, 2002 ; Servia *et al.*, 2006 ; Duchet *et al.*, 2011). Certains travaux ont permis d'établir des relations de cause à effet entre l'expression d'un biomarqueur (activité de l'ACHé) et la survie de différentes espèces aquatiques suite à une contamination aiguë (Jager et Kooijman, 2005) mais ce type de résultats reste rare. L'établissement de relations mécanistes entre les réactions physiologiques fines (échelle des biomarqueurs) et les fonctions qui en résultent (survie, croissance, reproduction des individus) apparaît encore comme un verrou méthodologique.

La présence (ou l'absence) et/ou l'abondance de certains organismes (espèces ou groupes d'espèces bioindicatrices) fournissent des informations sur la qualité des écosystèmes. Depuis le début du XX^e siècle, pratiquement tous les groupes vivants ont fait l'objet d'études destinées à identifier des espèces bioindicatrices de la qualité des écosystèmes. La mise au point d'un outil de **bioindication** peut être réalisée selon deux approches. Dans la première, la présence et/ou l'abondance des différents taxons sont utilisées pour déterminer la valeur d'un indice (basé sur une seule métrique ou sur plusieurs métriques ; Barbour *et al.*, 1999 ; Mondy *et al.*, 2012). Dans la seconde, la communauté observée dans une station donnée est comparée avec la communauté que cette station devrait théoriquement héberger (Norris et Hawkins, 2000). La communauté théorique est déterminée en utilisant les données disponibles sur la distribution géographique, l'abondance, et les exigences écologiques des différentes espèces et les conditions environnementales locales (hors pollution). Le fait de prendre en compte les communautés dans leur ensemble maximalise la probabilité de mettre en évidence des effets sur les espèces sensibles ainsi que les perturbations globales de la structure des communautés. La plupart des outils de bioindication développés pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques n'ont pas été mis au point pour mettre en évidence de façon spécifique les impacts des substances toxiques mais certaines méthodes semblent apporter des réponses relativement pertinentes dans ce domaine. Par exemple, Liess et Von der Ohe (2005) ont développé une approche de bioindication (SPEAR-SPEciesAt Risk) reposant pour partie sur les traits des macroinvertébrés aquatiques afin de caractériser l'état de contamination des cours d'eau par les pesticides. Les métriques basées sur ce concept ont déjà été employées avec succès lors d'études de terrain (Schäfer *et al.*, 2007). (Figure 5).

L'étude de Schäfer *et al.* (2007) a été menée dans 47 stations réparties dans trois régions d'Europe présentant des niveaux de pression agricole contrastés, le sud de la Finlande (faible pression), la région de Braunschweig en Allemagne (très forte pression), et la Bretagne avec le bassin de Rennes (forte pression) et la vallée du Scorff (faible pression). Les résultats mettent en évidence l'existence d'une relation négative significative entre l'abondance des taxons SPEAR (exprimée en pourcentage de l'abondance totale des macro-invertébrés) et la pression toxique d'une part et celle d'une relation positive significative entre cette métrique et le taux de dégradation de la litière d'aulne d'autre part. Les possibilités de son utilisation à plus grande échelle ainsi que le développement d'autres approches de

bioindication appliquées aux pesticides basées sur les diatomées et les macro-invertébrés font actuellement l'objet d'investigations dans le cadre de projets menés en partenariat entre l'INRA et l'Onema (Bouchez *et al.*, 2012).

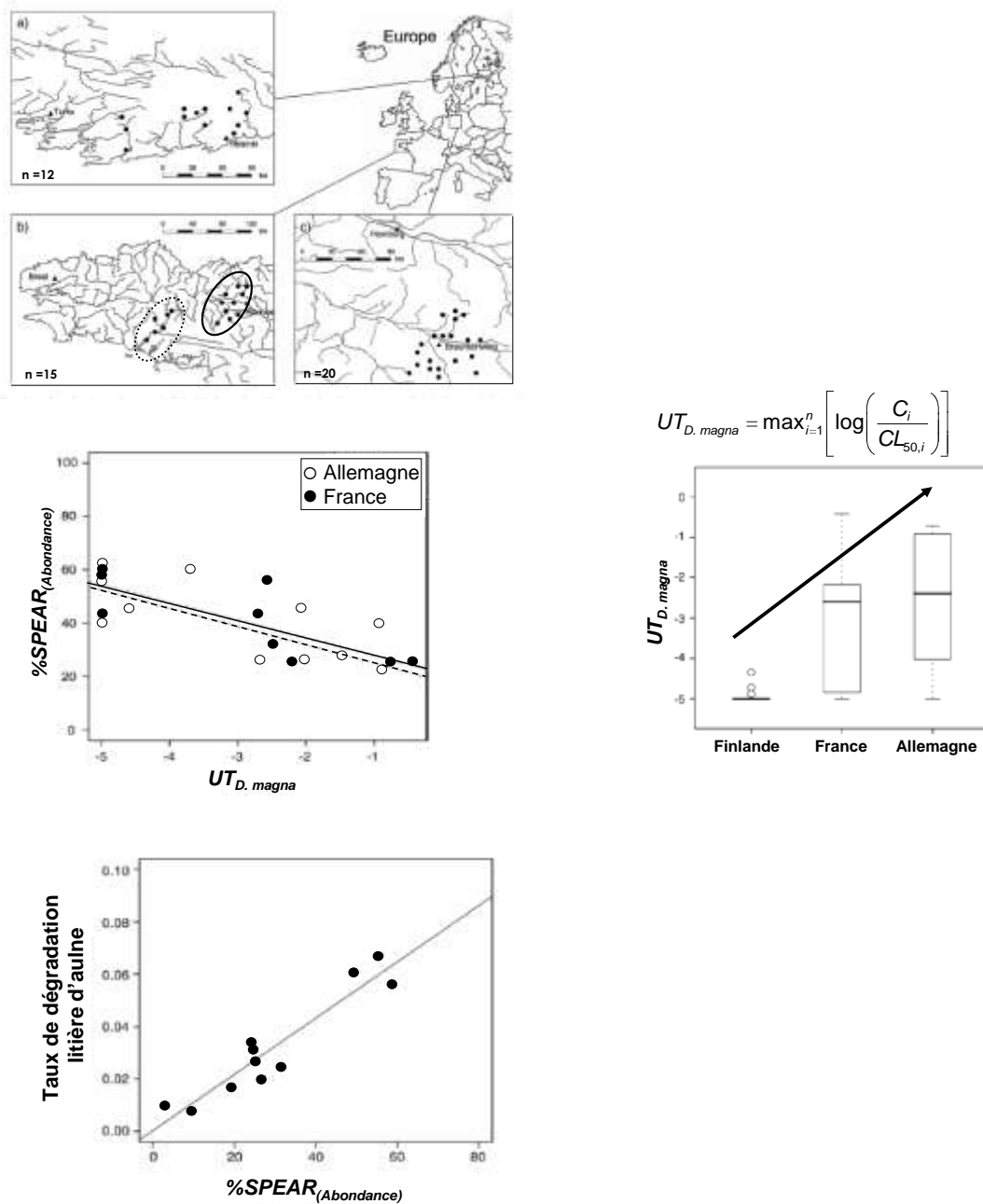


Figure 5 : Relations entre les valeurs de l'une des métriques du système SPEAR et la contamination par les pesticides dans des rivières de trois régions européennes (à gauche) et entre le taux de dégradation de la litière d'aulne et les valeurs de l'une des métriques SPEAR (à droite ; d'après Schäfer *et al.*, 2007).

La mesure de **paramètres fonctionnels** (par exemple décomposition de la litière ; Gessner et Chauvet, 2002) fournit des informations importantes d'un point de vue écologique mais ils sont parfois moins sensibles que les paramètres de structure du fait de l'existence d'une redondance fonctionnelle au sein des communautés (Caquet *et al.*, 2007). Dans les cas de contamination en mésocosmes avec des cocktails de pesticides représentatifs de différentes pratiques agronomiques ou dans des suivis de

terrain dans des cours d'eau contaminés par des résidus des pesticides issus des activités agricoles, des relations claires entre perturbations de la structure des communautés d'invertébrés benthiques et inhibition de la fragmentation de la litière ont toutefois été mises en évidence (Schäfer *et al.*, 2007 ; Auber *et al.*, 2011 ; Figures 5 et 6).

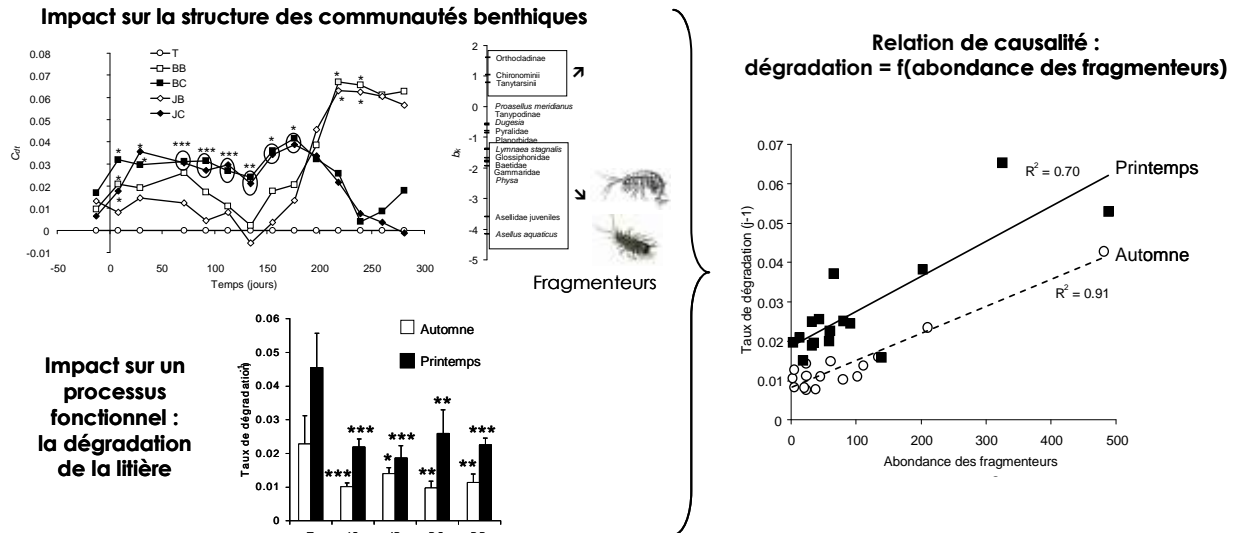


Figure 6 : Exemple de résultats mettant en évidence les relations entre structure des communautés d'invertébrés et processus fonctionnels et impact des pesticides sur ces relations (d'après Auber *et al.*, 2011). Au cours du programme EMERITAT financé par le programme "Pesticides" du Ministère de l'Ecologie, les impacts sur les communautés de macroinvertébrés d'itinéraires techniques contrastés ("classiques" vs. "bas intrants pesticides") ont été évalués en mésocosmes. L'application de la PRC (*Principal Response Curve*) aux données d'abondances (en haut à gauche) a mis en évidence un impact significatif des deux types de traitements : "classiques" (JC et BC) en automne, "bas intrants pesticides" (JB et BB) au printemps suivant. Certains groupes ont été négativement impactés, notamment les gammares et les aselles. Un impact négatif des deux types de traitements sur la vitesse de dégradation de la litière d'aulne a été mis en évidence en automne et au printemps (en bas à gauche). Il existe une relation significative entre l'intensité de ce processus et l'abondance des fragmenteurs (aselles + gammares ; à droite), qui confirme la relation de causalité entre impact structurel et conséquences fonctionnelles des traitements.

L'interprétation des résultats des études de biosurveillance implique avant tout de disposer de bonnes connaissances sur les voies d'exposition des organismes. De nombreux facteurs de confusion et la variabilité naturelle peuvent rendre l'identification des effets des substances toxiques difficile. Ces sources d'erreur doivent être identifiées et caractérisées convenablement pour les prendre en compte dans l'élaboration de l'étude et dans l'interprétation des résultats, afin de réduire l'incertitude et d'accroître la puissance de détection des effets.

L'interprétation des résultats de ces études impose notamment d'identifier des sites témoins non contaminés afin :

- De connaître la variabilité naturelle des communautés étudiées et des paramètres mesurés. La variabilité naturelle d'une communauté est due à la combinaison des variations de différents paramètres environnementaux avec celles des caractéristiques biologiques des espèces présentes. Une partie de cette variabilité naturelle peut être prise en compte en regroupant les espèces selon divers traits biologiques ou écologiques (par exemple, sensibilité aux toxiques, caractéristiques d'histoire de vie, capacités de dispersion, etc.) et en comparant les effets des substances sur les différents groupes ainsi constitués.

- De minimiser l'influence des autres paramètres environnementaux et de différents facteurs de confusion en choisissant des sites témoins et contaminés qui, dans la mesure du possible, ne diffèrent entre eux que par la présence de substances toxiques dans les seconds. Les facteurs de confusion peuvent être de nature physique (structure des habitats aquatiques), chimique (présence de nutriments ou d'autres toxiques) ou biologique (présence de certaines espèces).

Le plus souvent, des sites non contaminés ou non perturbés n'existent pas et il faut se contenter d'utiliser les écosystèmes les moins perturbés comme témoins. Dans certains cas, des effets peuvent être détectés (mais souvent quantifiés de façon non satisfaisante) en analysant un même site à des dates différentes (approche diachronique) ou une série de sites différents choisis selon un gradient de contamination (approche synchronique). Par ailleurs, il est important de prendre en compte les phénomènes de restauration aux différents niveaux d'organisation biologique (individus, populations, communautés) pour pouvoir interpréter de façon convenable les effets des substances toxiques. Comme cela a été démontré par des approches expérimentales en mésocosmes, cette restauration peut avoir une origine interne (c'est-à-dire à partir du système perturbé lui-même) ou externe (par immigration d'individus à partir de sources extérieures ; Caquet *et al.*, 2007 ; Hanson *et al.*, 2007). Dans la mesure du possible, il est souhaitable de pouvoir faire la part des choses entre les deux mécanismes. Ceci est très difficile et implique la prise en compte des caractéristiques locales de la dynamique des populations et de l'éventuelle dynamique des métapopulations au niveau du paysage. La caractérisation de la connectivité des écosystèmes au niveau local ou à celui des paysages est à ce niveau très utile.

Dans les études *in situ*, la caractérisation de l'exposition implique le recours à l'analyse chimique d'échantillons de nature variée. Cette approche présente toutefois de nombreuses limites (Voltz *et al.*, 2005) :

- L'analyse d'un échantillon prélevé dans un site et à un moment particuliers n'a qu'une valeur ponctuelle dans le temps et dans l'espace ; lors d'une pollution localisée et/ou de courte durée, un prélèvement peut être réalisé au mauvais endroit ou trop tard pour que l'identification et/ou la quantification des substances en cause soit possible. Le développement de capteurs passifs qui intègrent les évolutions de la contamination du milieu sur plusieurs semaines permet d'envisager une meilleure caractérisation du patron d'exposition des organismes (Thomatou *et al.*, 2011).
- Aucune méthode ne permet de détecter et de quantifier simultanément toutes les substances présentes dans un échantillon, notamment du fait de leur grande diversité chimique, de la présence éventuelle de produits de dégradation inconnus ou d'interférences dues aux caractéristiques des matrices analysées (Peijnenburg et Jager, 2003).
- Les limites de détection ou de quantification des méthodes analytiques sont parfois supérieures aux concentrations pour lesquelles des effets biologiques peuvent être observés.
- La non détection d'une substance ne signifie pas obligatoirement qu'elle ne pose pas de problème environnemental. Il peut s'agir de la conséquence d'un plan d'échantillonnage et/ou de méthodes d'analyse inadaptés.
- Il est difficile voire impossible de déduire l'origine spatiale et temporelle des contaminations (sources ponctuelles ou diffuses) des résultats de l'analyse.
- La mise en évidence de la présence d'une substance ne fournit pas nécessairement d'informations sur les effets toxiques qu'elle est susceptible d'entraîner, car la biodisponibilité de certaines substances (et donc leur capacité à pénétrer dans les organismes et à exercer un éventuel effet toxique) varie en fonction des conditions environnementales (Verge *et al.*, 2001).
- Les interactions entre les substances ou entre les substances et les autres facteurs du milieu peuvent parfois se traduire par une exacerbation (synergie) ou au contraire une réduction

(antagonisme) de leur toxicité. De ce fait, l'information sur la présence des substances considérées isolément n'est pas nécessairement suffisante pour évaluer les conséquences de la contamination.

- Pour une même concentration d'une substance, les effets biologiques peuvent être très différents d'une espèce à une autre, ou dépendre, pour une même espèce, du stade de développement ou de l'état physiologique des individus.

La mise en évidence de relations de causalité entre la présence de substances toxiques dans l'environnement et leurs effets biologiques peut être envisagée de diverses manières :

- Études en conditions contrôlées ou réalisation de bioessais *in situ* ou sur des échantillons prélevés sur le site étudié.
- Études de terrain pour identifier des relations de causalité plausibles.
- Utilisation de critères écoépidémiologiques et de l'abondance des faits.

L'écoépidémiologie recouvre la description des effets, l'identification des causes, et la détermination des liens et des enchaînements entre causes et effets chez les individus, les populations et les communautés en cas de dysfonctionnement des systèmes écologiques. Le raisonnement écoépidémiologique est basé sur la même démarche que l'analyse épidémiologique humaine. Il fait appel à différents critères destinés à conforter l'hypothèse d'une relation de causalité entre exposition et effet (Tableau 1).

| Critères | Description |
|------------------------------------|---|
| Force de l'association | L'effet coïncide avec la présence du toxique. Une proportion plus importante des individus est affectée dans les zones perturbées que dans les zones de référence |
| Constance de l'association | L'association entre le toxique et l'effet a été observée par d'autres auteurs dans des études similaires réalisées à d'autres périodes et dans d'autres zones |
| Spécificité de l'association | L'effet est caractéristique d'un toxique particulier ou d'un groupe de toxiques similaires |
| Chronologie | La présence du toxique précède l'effet ou l'effet diminue lorsque la concentration en toxique baisse ou devient nulle |
| Existence d'un gradient de réponse | Une relation dose-réponse peut être établie soit d'un point de vue chronologique, soit spatialement |
| Preuve expérimentale | Des expérimentations valides (laboratoires, mésocosmes) confirment la relation toxique-effet supposée |
| Plausibilité biologique | Il y a une base biologique et/ou toxicologique crédible ou raisonnable au mécanisme invoqué pour expliquer la relation entre le toxique et l'effet |

Tableau 1 : Critères écoépidémiologiques nécessaires à la mise en relation des effets observés avec la présence d'un toxique (simplifié d'après Hewitt *et al.*, 2003).

L'intégration des informations disponibles sur les différents aspects du problème nécessite de faire appel à des procédures spécifiques, afin de pouvoir utiliser l'ensemble des données disponibles : c'est l'approche par abondance des faits (*Weight-Of-Evidence* ou WOE ; Forbes et Calow, 2004).

Quelle que soit la méthode utilisée pour l'agrégation des données, l'analyse finale relève du jugement d'expert, notamment lorsqu'il s'agit de prendre des mesures de gestion du risque.

5. Caractérisation du risque écotoxicologique

Dans le cas d'une évaluation *a priori*, le risque pour les organismes aquatiques est caractérisé par le calcul de *Toxicity Exposure Ratios* (TER). Ceux-ci sont définis comme étant le rapport entre la valeur d'une concentration toxique de référence (CL50 ou CE50 pour la toxicité aiguë, NOEC pour la toxicité chronique) et celle de la concentration prédite dans l'eau (PEC). Les valeurs de TER sont calculées

pour chacun des groupes d'organismes jugés représentatifs des écosystèmes aquatiques (microalgues, lentilles d'eau, daphnie, poisson, ...). Des seuils réglementaires ont été définis afin de se prononcer sur la nature du risque. Si $TER_{\text{aiguë}} < 100$ ou $TER_{\text{chronique}} < 10$, alors il est nécessaire de poursuivre l'évaluation du risque afin de l'affiner et/ou d'envisager la proposition de mesures de mitigation du risque (augmentation de la largeur des ZNT par exemple). Si à la fin de cette procédure, les valeurs seuils sont toujours dépassées, alors le risque est considéré comme inacceptable.

Dans le cas des études de terrain, lorsqu'il existe suffisamment de données pour quantifier les expositions et estimer les effets, l'approche la plus simple est le calcul d'un "quotient de risque" (QR) qui est défini comme étant égal au rapport entre la concentration mesurée (*Measured Environmental Concentration* ou MEC) et la concentration prédite sans effet (*Predicted No Effect Concentration* ou PNEC, ou toute autre valeur de référence) ou une norme de qualité environnementale, qu'il s'agisse d'une moyenne annuelle (*Annual Average Environmental Quality Standard* - AA-EQS) ou d'une concentration maximale acceptable (*Maximum Allowable Concentration Environmental Quality Standard* - MAC-EQS).

L'interprétation des résultats obtenus est basée sur les règles suivantes :

- $QR < 1$: aucun effet néfaste n'est prévu et l'écosystème est considéré comme protégé.
- $QR = 1$: des effets néfastes pourraient survenir.
- $QR > 1$: des effets néfastes surviendront probablement.

Les principaux avantages de cette méthode sont sa simplicité et sa rapidité de mise en œuvre. Certains inconvénients restreignent cependant son application. En effet, bien qu'elle permette de définir le niveau du risque, elle n'est pas suffisante lorsqu'un gestionnaire souhaite connaître l'évolution quantitative du risque. Si une courbe représentant la relation concentration-réponse est disponible, alors l'évaluation du risque permettra d'estimer le risque associé à différents niveaux de contamination. Il est à noter que si ces courbes décrivent la variabilité de l'exposition ou des effets, alors plusieurs estimations du risque pourront être réalisées. Une autre des limites de la méthode des quotients peut provenir de défauts dans la formulation du problème et lors de la phase d'analyse. Cette méthode ne permet pas de prendre explicitement en compte les effets indirects, ni les différentes sources d'incertitude associées aux résultats et elle peut s'avérer inadaptée dans les cas de pollution par un mélange de substances dont les effets peuvent être synergiques ou antagonistes et ainsi modifier le quotient de risque préalablement calculé pour une substance considérée isolément.

Deux approches sont préconisées pour déterminer les valeurs des concentrations prédites sans effet à partir de données d'écotoxicité (ECB, 2003) :

- Utilisation de facteurs d'extrapolation (lorsqu'un nombre restreint de données est disponible).
- Utilisation d'une méthode statistique (lorsqu'un grand nombre de données est disponible).

La démarche qui permet d'utiliser des données obtenues lors de bioessais d'écotoxicité pour en inférer des effets au niveau de l'écosystème repose sur deux hypothèses fortes :

- La sensibilité de l'écosystème dépend de l'espèce la plus sensible.
- La protection de la structure de l'écosystème assure celle de sa fonctionnalité.

5.1 Méthode des facteurs d'extrapolation

Cette méthode consiste à utiliser les résultats des tests de toxicité effectués sur l'espèce (ou les espèces) la (les) plus sensibles pour la substance considérée pour calculer une PNEC, en appliquant un facteur de pondération dont la valeur varie en fonction de la nature et de la quantité des données disponibles. L'objectif est de pouvoir extrapoler à l'ensemble d'un écosystème (ou d'un compartiment de l'environnement) les effets observés sur une espèce sensible ou sur un nombre limité d'espèces sensibles. Il est aussi de prédire une concentration en dessous de laquelle il est probable qu'un effet inacceptable ne se produira pas. La valeur du facteur d'extrapolation est choisie afin de prendre en compte un certain nombre de sources d'incertitude : variabilité des données de toxicité au sein d'un laboratoire et entre laboratoires, variabilité intra- et inter-spécifiques, extrapolation des informations sur la toxicité à court terme à des effets à long terme, extrapolation des données de laboratoire à des impacts possibles en milieu naturel (y compris les interactions éventuelles entre substances).

Les valeurs des facteurs d'extrapolation dépendent de la quantité de données disponibles et de leur qualité et diverses stratégies de détermination de ces valeurs ont été proposées, qui sont parfois fortement critiquées (Chapman *et al.*, 1998).

Dans le cas particulier des pesticides, les facteurs d'extrapolation qui sont utilisés (Tableau 2) tiennent compte du fait que des résultats sont disponibles pour des essais d'écotoxicité aiguë et chronique réalisés pour l'ensemble des organismes faisant l'objet d'une évaluation du risque.

| Type d'essai / donnée | Facteur d'extrapolation |
|---------------------------------|-------------------------|
| CL50 poisson/CE50 daphnie | 100 |
| CE50 algues ou plante aquatique | 10 |
| NOEC poisson/daphnie labo | 10 |
| NOEC micro/mésocosme | 1-5 |

Tableau 2. Facteurs d'extrapolation (= facteurs de sécurité) pour la détermination d'une PNEC en milieu aquatique pour les pesticides.

5.2 Méthode statistique

Lorsqu'un grand nombre de données d'écotoxicité est disponible, une concentration prédite sans effet peut être déterminée statistiquement à partir de la courbe de distribution de la sensibilité des espèces (*Species Sensitivity Distribution* ou SSD ; Aldenberg et Slob, 1993). Cette procédure suppose que les données (NOEC, CE50, etc.) disponibles pour les différentes espèces sont distribuées suivant une loi statistique connue. Dans la mesure du possible, ce sont des NOEC qui sont utilisées. Lorsque plusieurs valeurs de NOEC sont disponibles pour une même espèce, c'est la moyenne géométrique de ces NOEC sur le critère d'effet le plus sensible qui est utilisée.

Au niveau européen, le TGD préconise de n'utiliser cette méthode que s'il existe au moins 10 (et de préférence 15) NOEC, correspondant à des effets à long terme et déterminées sur des espèces différentes appartenant à 8 groupes taxonomiques différents (ECB, 2003). Une valeur de référence est déterminée comme étant égale au 5^{ème} percentile de la distribution de ces données (HC₅ : *Hazardous Concentration for 5 % of species*. (Figure 7). Un intervalle de confiance pour cette concentration peut être déterminé, par exemple par rééchantillonnage (*bootstrap*). La PNEC correspond alors à cette valeur de référence divisée par un facteur d'extrapolation de 1 à 5 (ECB, 2003) qui est déterminé au cas par cas.

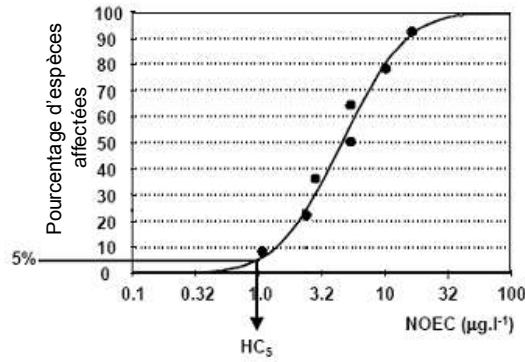


Figure 7 : Exemple de courbe de distribution de sensibilité des espèces pour une substance

Chèvre *et al.* (2006) ont proposé d'utiliser comme critère pour le calcul de quotient de risque pour des herbicides la borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95% de la HC₅ (HC_{5-95%}_i). Cette méthode permet de calculer des quotients de risque pour des substances isolées et pour des mélanges de substance possédant un même mode d'action (en partant de l'hypothèse de l'additivité des effets pour un mélange de substances aux modes d'action identiques) :

- Pour une substance isolée :
$$QR_i = \frac{MEC_{i_{eau}}}{HC_{5-95\%i}}$$

- Pour un mélange de substances ayant le même mode d'action :
$$QR_m = \sum_{i=1}^n QR_i = \sum_{i=1}^n \frac{MEC_{i_{eau}}}{HC_{5-95\%i}}$$

Cette approche a été récemment appliquée à la caractérisation du risque écotoxicologique présenté par les herbicides et les biocides antisalissures utilisées sur les coques de bateaux et les infrastructures maritimes pour les végétaux aquatiques dans la partie aval de la Vilaine (Figure 8). Les résultats ont montré une sensibilité comparable des espèces végétales d'eau douce et marine à certaines substances dont le diuron et l'Irgarol 1051 (Figure 8A) et l'existence d'un risque important pour ces organismes à certaines périodes de l'année (Figure 8B). Ce risque est notamment dû à la présence d'Irgarol 1051, un biocide de la famille des triazines utilisé dans certaines peintures antisalissures.

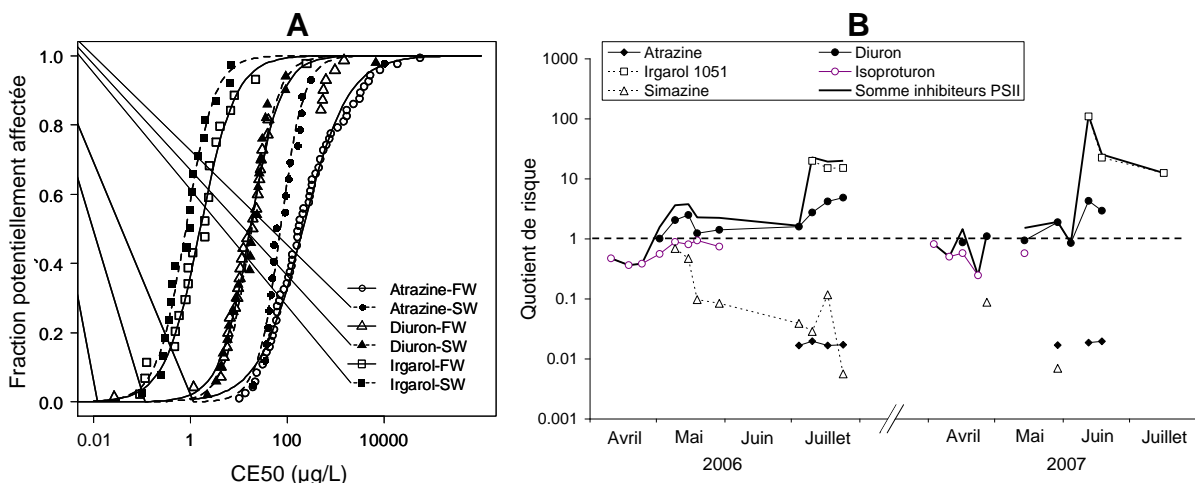


Figure 8 : A. Courbes de distribution de sensibilité obtenues pour l'atrazine, le diuron et l'Irgarol 1051 à partir de données de toxicité aiguë pour des espèces végétales d'eau douce (FW) et marines (SW). B. Evolutions au cours du temps des valeurs du Quotient de risque associées aux substances inhibitrices du photosystème II présentes en 2006 et 2007 dans l'eau de la retenue d'Arzal (zone aval de la Vilaine ; d'après Caquet *et al.*, sous presse).

Conclusion

Les pesticides sont par définition des produits toxiques (donc dangereux) pour au moins une catégorie d'organismes. Leur mise sur le marché est strictement encadrée par la législation européenne, ce qui conduit notamment à la mise en œuvre d'une procédure d'évaluation des risques détaillée. Quelle que soit la substance considérée et les mesures de gestion du risque préconisées, il y aura un risque si l'exposition dépasse un certain seuil d'effets. Les évaluations de risque réalisées dépendent donc avant tout des usages des produits, ce qui oblige à prendre des décisions usage par usage et non pas produit par produit. Par ailleurs, aussi sophistiquée soit-elle, l'évaluation *a priori* est toujours réalisée par substance ou par produit. Elle n'aboutit donc pas à une évaluation globale du risque dans un contexte de multi-contamination des écosystèmes et en aucun cas, elle ne peut conclure à une absence de risque. Le développement de méthodes d'évaluation *a posteriori* est nécessaire pour compléter le dispositif d'évaluation. Ceci implique de pouvoir extraire du bruit de fond environnemental le signal toxique associé à une substance donnée. Le renforcement des approches expérimentales dans lesquelles plusieurs facteurs de stress sont manipulés de façon contrôlée est l'une des possibilités pour avancer dans la compréhension des conséquences environnementales de ces stress multiples. Il s'agit aussi d'intégrer encore davantage les effets sublétaux des substances (y compris en termes de conséquences évolutives) dans les schémas d'évaluation des risques. Le couplage des approches expérimentales, des études de terrain et de modèles de devenir et d'effets est nécessaire pour progresser dans tous ces domaines. Il y a aussi nécessité de renforcer les interactions entre tous les acteurs concernés (agriculteurs et organisations agricoles, institut techniques, chercheurs, gestionnaires, ...) afin notamment de faire progresser les différentes étapes de l'évaluation et de la gestion des risques et de proposer des méthodes opérationnelles de suivi de la qualité des milieux.

Références bibliographiques

- Aldenberger T., Slob W., 1993. Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC toxicity data. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 25, 48-63.
- 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.
- 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* 20, 2042-2055.
- Aubertot J.N., Barbier J.M., Carpentier A., Gril J.J., Guichard L., Lucas P., Savary S., Voltz M., Savini I., 2005. Pesticides, agriculture et environnement - Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Expertise collective INRA-CEMAGREF, 66 p.
- Barbour M.T., Gerritsen J., Snyder B.D., Stribling J.B., 1999. Rapid Bioassessment Protocol for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish, Second Edition. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington D.C., USA.
- Barriuso E., Koskinen W.C., Sadowsky M.J., 2004. Solvent extraction characterization of bioavailability of atrazine residues in soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 6552-6556.
- Barriuso E., Calvet R., Schiavon M., Soulas G., 1996. Les pesticides et les polluants organiques des sols. *Etude et Gestion des Sols* 3, 279-296.
- Bickham J.W., Sandhu S., Hebert P.D.N., Chikhi L., Athwal R., 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research* 463, 33-51.

- Bouchez A., Rimet F., Marcel R., Caquet Th., Roucaute M., Geret C., 2012. Des bioindicateurs pour évaluer l'impact ou la restauration vis-à-vis des pesticides. Rapport final action INRA-ONEMA
- Brock T.C.M., Van Wijngaarden R.P.A., Van Geest G.J., 2000a. Ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems, Part 1-Herbicides. Alterra-Report 088. Wageningen, The Netherlands, 128 p.
- Brock T.C.M., Van Wijngaarden R.P.A., Van Geest G.J., 2000b. Ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems, Part 2-Insecticides. Alterra-Report 089. Wageningen, The Netherlands, 71 p.
- Caquet Th., Lagadic L., 1998. Conséquences d'atteintes individuelles précoces sur la dynamique des populations et la structuration des communautés et des écosystèmes. In : L. Lagadic, Th. Caquet, J.-C. Amiard et F. Ramade (Eds.), 1998. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier Tec & Doc, Paris, 265-298.
- Caquet Th., Lagadic L., Sheffield S.R., 2000. Mesocosms in ecotoxicology (1). Outdoor aquatic systems. Review of Environmental Contamination and Toxicology 165, 1-38.
- Caquet Th., Hanson M.L., Roucaute M., Graham D.W., Lagadic L., 2007. Influence of isolation on the recovery of pond mesocosms from the application of an insecticide. II. Benthic macroinvertebrate responses. Environmental Toxicology and Chemistry 26, 1280-1290.
- Caquet Th., Roucaute M., Le Goff P., Lagadic L., 2011. Effects of repeated field applications of two formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on non-target saltmarsh invertebrates in Atlantic coastal wetlands. Ecotoxicology and Environmental Safety 74, 1122-1130.
- Caquet Th., Roucaute M., Mazzella N., Delmas F., Madigou C., Farcy E., Burgeot Th., Allenou J.-P., Gabellec R. Risk assessment of herbicides and booster biocides along estuarine continuums in the Bay of Vilaine area (Brittany, France). Environmental Science and Pollution Research, DOI 10.1007/s11356-012-1171-y
- Chapman P.M., Fairbrother A., Brown D., 1998. A critical evaluation of safety (uncertainty) factors for ecological risk assessment. Environmental Toxicology and Chemistry 17, 99-108.
- Chèvre N., Loepfe C., Singer H., Stamm C., Fenner K., Escher B., 2006. Including mixtures in the determination of water quality criteria for herbicides in surface water. Environmental Science and Technology 40, 426-435.
- Coustau C., Chevillon C., French-Constant R., 2000. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost ? TREE 15, 378-383.
- Coutellec M.-A., Lagadic L., 2006. Effects of self-fertilization, environmental stress and exposure to xenobiotics on fitness-related traits of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. Ecotoxicology 15, 199-213.
- Coutellec M.-A., Caquet Th., 2011. Heterosis and inbreeding depression in bottlenecked populations : a test in the hermaphroditic freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. Journal of Evolutionary Biology 24, 2248-2257.
- Coutellec M.-A., Collinet M., Caquet Th., 2011. Parental exposure to pesticides and progeny reaction norm to a biotic stress gradient in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. Ecotoxicology 20, 524-534.
- Duchet C., Inafuku M.M., Caquet Th., Larroque M., Franquet E., Lagneau Ch., Lagadic L., 2011. Chitobiase activity as an indicator of altered survival, growth and reproduction in *Daphnia pulex* and *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) exposed to *Bacillus thuringiensis israelensis* spinosad and diflubenzuron. Ecotoxicology and Environmental Safety 74, 800-810.
- European Chemicals Bureau (ECB), 2003. *Technical Guidance Document (TGD) on Risk Assessment*. Part II. 337 pp.
- Findlay D.L., Kasian S.E.M., Schindler E.U., 1996. Long-term effects of low cadmium concentrations on phytoplankton. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53, 856-864.
- Fleeger J.W., Carman K.R., Nisbet R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. Science of the Total Environment 317, 207-233.
- Forbes V.E., 1999. Genetics and Ecotoxicology. Taylor & Francis, London.
- Forbes V.E., Calow P., 2004. Systematic approach to weight of evidence in sediment quality assessment: Challenges and opportunities. Aquatic Ecosystems Health and Management 7, 339-350.

- Gentry L.E., David M.B., Smith-Starks K.M., Kovacic D.A., 2000. Nitrogen fertilizer and herbicide transport from tile drained fields. *Journal of Environmental Quality* 29, 232-240.
- Gessner M.O., Chauvet E., 2002. A case for using litter breakdown to assess functional stream integrity. *Ecological Applications* 12, 498-510.
- Hanazato T., 2001. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environmental Pollution* 112, 1-10.
- 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. Study design and planktonic community responses. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 1265-1279.
- Hewitt L.M., Dubé M.G., Culp J.M., MacLatchy D.L., Munkittrick K.R., 2003. A proposed framework for investigation of cause for environmental effects monitoring. *Human and Ecological Risk Assessment* 9, 195-211.
- Heydel L., Benoit M., Schiavon M., 1999. Reducing atrazine leaching by integrating reduced herbicide use with mechanical weeding in corn (*Zea mays*). *European Journal of Agronomy* 11, 217-225.
- Jager T., Kooijman S.A.L.M., 2005. Modeling receptor kinetics in the analysis of survival data for organophosphorus pesticides. *Environmental Science and Technology* 39, 8307-8314.
- Jumel A., Coutellec M.-A., Cravedi J.-P., Lagadic L., 2002. Nonylphenol polyethoxylate adjuvant mitigates the reproductive toxicity of fomesafen to the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* in outdoor experimental ponds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1876-1888.
- Kidd K.A., Blanchfield P.J., Mills K.H., Palace V.P., Evans R.E., Lazorchak J.M., Flick R.W., 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104, 8897-8901.
- Lagadic L., Amiard J.-C., Caquet Th., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In : L. Lagadic, Th. Caquet, J.-C. Amiard et F. Ramade (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie : Aspects fondamentaux*. Masson, Paris, 1-9.
- Leonard R.A., 1990. Movement of pesticides into surface waters. In : H.H. Cheng (Ed.), *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin USA, 303-350.
- Lévêque C., 2001. *Ecologie. De l'écosystème à la biosphère*. Dunod, Paris. 502 p.
- Liess M., Von Der Ohe P.C., 2005. Analysing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 954-965.
- Loiseau L., Barriuso E. 2002. Characterization of the atrazine's bound (nonextractable) residues using fractionation techniques for soil organic matter. *Environmental Science and Technology* 36, 683-689.
- Lennartz M., Louchart X., Voltz M., Andrieux P., 1997. Diuron and simazine losses to runoff water in mediterranean vineyards as related to agricultural practices. *Journal of Environmental Quality* 26, 1493-1502.
- Liess M., Brown C., Dohmen P., Duquesne S., Hart A., Heimbach F., Kreuger J., Lagadic L., Reinert W., Maund S., Strelake M., Tarazona J., 2005. *Effects of Pesticides in the Field*. SETAC Press, Brussels, 136 p.
- Malley D.F., 1996. Cadmium whole-lake experiment at the Experimental Lakes Area: an anachronism? *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 53, 1862-1870.
- Medina M.H., Correa J.A., Barata C., 2007. Micro-evolution due to pollution: possible consequences for ecosystems responses to toxic stress. *Chemosphere* 67, 2105-2114.
- Mondy C.P., Villeneuve B., Archambault V., Usseglio-Polatera P., 2012. A new macroinvertebrate-based multimetric index (I_2M_2) to evaluate ecological quality of French wadeable streams fulfilling the WFD demands: A taxonomical and trait approach. *Ecological Indicators* 18, 452-467.
- Morgan A.J., Kille P., Stürzenbaum S.R., 2007. Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. *Environmental Science and Technology* 41, 1085-1096.

- Neumann M., Liess M., Schulz R., 2003. A qualitative method for monitoring water quality in temporary channels or point sources and its application to pesticide contamination. *Chemosphere* 51, 509-513.
- Norris R.H., Hawkins C.P., 2000. Monitoring river health. *Hydrobiologia* 435, 5-17.
- Novak S., Portal J.M., Morel J.L., Schiavon M., 1998. Mouvement de produits phytosanitaires dans le sol et dynamique de transfert par l'eau. *Comptes-Rendus de l'Académie d'Agriculture*, 119-132.
- Odum E.P., 1984. The mesocosm. *BioScience* 34, 558-562.
- ORP, Observatoire des résidus de pesticides. <http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/>
- Peijnenburg W.J.G.M., Jager T., 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 63-77.
- Perceval O., Caquet Th., Lagadic L., Bassères A., Azam D., Lacroix G., Poulsen V., 2010. Les mésocosmes : des outils pour les gestionnaires de la qualité des milieux aquatiques ? Actes du séminaire d'Ecotoxicologie organisé par l'Onema et l'INRA, en partenariat avec l'INERIS et Total, 14-16 Octobre 2009, Le Croisic. *Les Rencontres de l'Onema-Synthèse*, 72 p.
- Peterson D.R., 1994. Calculating the aquatic toxicity of hydrocarbon mixtures. *Chemosphere* 29, 2493-2506.
- Schäfer R.B., Caquet Th., Siimes K., Mueller R., Lagadic L., Liess M., 2007. Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. *Science of the Total Environment* 382, 272-285.
- Schulz R., 2004. Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint-source insecticide pollution: a review. *Journal of Environmental Quality* 33, 419-448.
- Schulz R., Hauschild M., Ebeling M., Nanko-Drees J., Wogram J., Liess M., 1998. A qualitative field method for monitoring pesticides in the edge-of-field runoff. *Chemosphere* 36, 3071-3082.
- Servia M.J., Péry A.R.R., Heydorff M., Garric J., Lagadic L., 2006. Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology* 15, 229-240.
- Silbermann R., Tatar M., 2000. Reproductive costs of heat shock protein in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 54, 2038-2045.
- Suter G.W. II., 1993. *Ecological Risk Assessment*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 538 p.
- Suter G.W. II, Vermeire T., Munns W.R. Jr., Sekizawa J., 2003. Framework for the integration of health and ecological risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment* 9, 281-301.
- Thomatou A.-A., Zacharias I., Hela D., Konstantinou I., 2011. Passive sampling of selected pesticides in aquatic environment using polar organic chemical integrative samplers. *Environmental Science and Pollution Research*, 18, 1222-1233.
- Triebkorn R., Adam S., Casper H., Honnen W., Pawert M., Schramm M., Schwaiger J., Köhler H.-R., 2002. Biomarkers as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms. *Ecotoxicology* 11, 451-465.
- U.S. Environmental Protection Agency (US EPA), 1998. *Guidelines for Ecological Risk Assessment*. Risk Assessment Forum, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, 172 p.
- Van Straalen N.M., Hoffmann A.A., 2000. Review of experimental evidence of physiological costs of tolerance to toxicants. In : J. Kammenga, R. Laskowski (Eds.), *Demography in Ecotoxicology*, John Wiley & Sons, Chichester, 147-161.
- Verge C., Moreno A., Bravo J., Berna J.L., 2001. Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of linear alkylbenzene sulphonate (LAS). *Chemosphere* 44, 1749-1757.
- Voltz M., Alix A., Barriuso E., Bedos C., Bonicelli B., Caquet Th., Dubus I., Gascuel C., Gril J.J., 2005. Devenir et transfert des pesticides dans l'environnement et impacts biologiques. Expertise scientifique collective INRA-Cemagref "Pesticides, agriculture et environnement", Chapitre 3, 219 p.
- Willi Y., van Buskirk J., Hoffmann A.A., 2006. Limits to the adaptive potential of small populations. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 37, 433-458.