HAL
open science

Effets des pesticides de la vigne sur le cycle biologique de l'escargot dans divers contextes d'exposition

Coline Druart

To cite this version:

Coline Druart. Effets des pesticides de la vigne sur le cycle biologique de l'escargot dans divers contextes d'exposition. Sciences de l'environnement. Université de Franche-Comté, 2011. Français. NNT : . tel-00662413

HAL Id: tel-00662413

https://theses.hal.science/tel-00662413

Submitted on 25 Jan 2012

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.

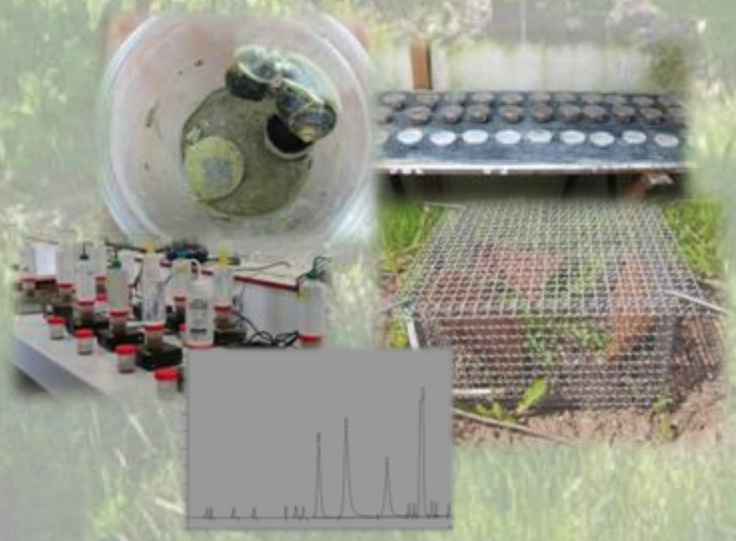
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de l'Université de Franche-Comté

Effets des pesticides de la vigne sur le cycle biologique de l'escargot dans divers contextes d'exposition

Coline DRUART

2011



UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ
U.F.R SCIENCES ET TECHNIQUES
Laboratoire Chrono-Environnement (UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA)

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE l'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ
Spécialité : Sciences de la Vie et de l'Environnement
École doctorale : Homme, Environnement, Santé

Effets des pesticides de la vigne sur le cycle biologique de l'escargot dans divers contextes d'exposition

Par

Coline DRUART

Soutenue le 4 mai 2011 devant le jury composé de :

Hélène BUDZINSKI (Directeur de Recherche, CNRS, Université Bordeaux I)	Rapporteur
Franck VANDENBULCKE (Professeur, Université Lille 1)	Rapporteur
Antonio BISPO (Dr, Ingénieur « Sols et Environnement », ADEME, Angers)	Examinateur
Annette DE VAUFLEURY (MCF HDR, Université de Franche-Comté, Besançon)	Directrice
Maurice MILLET (Professeur, Université de Strasbourg)	Directeur
Renaud SCHEIFLER (MCF, Université de Franche-Comté, Besançon)	Encadrant

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier mes directeurs de thèse et encadrants, Annette de Vaufleury, Maurice Millet et Renaud Scheifler. Annette a été particulièrement disponible et consciencieuse durant tout mon travail de thèse. Depuis le master, elle m'a donné le goût de la recherche et m'a incitée à poursuivre dans cette voie. Elle m'a accordé de son temps et de son soutien et m'a toujours encouragée. Elle m'a bien sûr transmis une partie de son savoir en écotoxicologie et m'a aidé à acquérir plus d'assurance et une plus grande confiance dans mon sujet. Un grand Merci à Maurice, déjà pour son accueil chaleureux au LPCA, sa bonne humeur et son accessibilité. En dehors des aspects scientifiques de la chimie analytique (qui m'étaient jusqu'alors totalement inconnus) qu'il m'a fait découvrir et apprécier, je le remercie vivement pour la confiance qu'il m'a attribuée dès mon arrivée et pour toutes les discussions agréables et enrichissantes autour de la réparation d'une GC-MS ou d'une HPLC. Merci à Renaud, la voix de la raison, qui a très souvent su me remettre dans la bonne direction quand « ça partait un peu dans tous les sens », qui a consacré du temps à la relecture des articles et qui m'a beaucoup aidée pour les statistiques.

Merci à Hélène Budzinski et Franck Vandenbulcke qui ont accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit, ainsi qu'à Antonio Bispo, membre du jury et également ingénieur en charge du suivi de ma thèse à l'ADEME, organisme financeur de cette thèse avec le Conseil Régional de Franche-Comté. Merci à ces deux partenaires de m'avoir permis de réaliser ce travail dans de bonnes conditions.

Merci aux membres de mon comité de pilotage, mes encadrants, Antonio Bispo et Christian Mougin qui m'ont fait part de leurs connaissances et qui ont su guider certaines expériences quand il était nécessaire.

Je voulais particulièrement remercier Matthieu Moser, propriétaire de la vigne de Bergbieten qui a constitué le point de départ de mon travail et de ma réflexion. Il a répondu avec attention à toutes mes questions, m'a fourni des échantillons de formulations et a surtout été très conciliant avec les contraintes que je lui ai imposées : prévoir les traitements (mais la météo n'est pas toujours d'accord), ne pas traiter tôt le matin (il faut le temps que j'arrive), slalomer avec son tracteur entre les boîtes de Pétri et faire attention aux microcosmes en passant la tondeuse sur son terrain… Je ne sais pas s'il retentera l'expérience mais un grand merci à cette personne très sympathique qui a collaboré avec nous et a contribué à notre recherche.

Merci aux personnes du labo et collègues qui ont contribué, par des aides techniques (Christiane, Nadia, Jean-Claude et Dom), de secrétariat (Brigitte, Françoise, Mariette, Marlène) ou tout simplement par des conseils avisés (Francis et Michaël) à ce travail.

Je tiens à remercier les membres de l'AFFDU (Association des Femmes Françaises Diplômées de l'Université) qui m'ont octroyé une bourse me permettant de me rendre à Strasbourg. J'ai pu, lors d'un diner au restaurant, présenter mon sujet et j'ai été agréablement surprise de leur intérêt pour mon travail.

Je remercie PE et Fabien, qui ont eu la chance de passer tout un été dans une salle entièrement climatisée avec radio. Ils ont pu en plus de cet agréable confort, participer à des activités variées et divertissantes (construction de cubes en paraffine, découpage, collage, coloriage, découverte des odeurs…) qui ont su éveiller leur curiosité. Trèves de plaisanterie et un grand merci à vous deux qui m'avez été d'une grande aide sur ce coup. Merci également à Ludovic, mon stagiaire en M1, qui m'a permis, le temps de quelques mois, de me soulager de quelques manips et d'exercer le rôle très intéressant et très formateur, d'encadrante.

Un immense merci aux « fous de l'atmosphère » : pour leur super accueil, d'abord Olivier qui m'a tout montré et expliqué bien des choses…les thésards déjà là qui ont soutenu avant moi, Claude et Mélanie, ou pas (ne l'prend pas mal Jamal) ; ceux qui sont arrivés en même temps que moi, Caro et Florence et tous les stagiaires qui ont défilé au labo et que j'ai pu rencontrer brièvement durant mes séjours et plus particulièrement ceux qui m'ont donné un coup de main, Evodie, Mathieu, Ogier, … Une pensée plus particulière pour Caro qui a partagé son bureau avec moi, m'a aidé dans les manips et qui surtout m'a fait sortir et découvrir Strasbourg. Alors merci merci merci Caro pour les pauses-thé, les tartes flambées, les after-works et toutes ces petites attentions que tu as eues pour moi (en fin de thèse, les bonbons ne font pas long feu). Si je ne reviens pas au labo, on se retrouve à l'ANSES un peu plus tard comme prévu !

Un grand merci à Lucien Gomot, qui d'un œil scientifique, suit attentivement et depuis plusieurs années déjà, mon travail. En plus des coups de main techniques et des corrections attentives sur le manuscrit qu'il a apportées, j'ai eu la chance d'avoir avec lui de longues conversations à l'animalerie sur ma recherche où il essayait bien souvent de trouver des solutions aux problèmes que je rencontrais. J'ai ainsi pu profiter d'une compagnie agréable dans cet endroit qui l'est un peu moins, la semaine tout comme le week-end !
Je remercie très sincèrement les personnes qui m'ont attribué mon bureau et qui m'ont permis de rencontrer Claire qui est rapidement devenue bien plus qu'une collègue. Tu sais déjà tout le bien que je pense de toi ! Et puis je n'oublie pas tous les autres doctorants ou qui l'ont été, Laure, Fred, Sam, Greg, Victor, Olivier, Bastien, Amélie,… avec qui j'ai partagé les pauses et les apéros.

Merci à ma famille, qui sans comprendre exactement ce que je faisais, était bien présente et m'a permis d'entreprendre ces études longues, avec le soutien et les encouragements que cela demande. Et enfin merci à tous mes amis pour les moments d'évasion, Nadia, Aurore et tous les géol (je vous regroupe c'est plus simple) : Bolloch (j'ai gagné alors je ne parlerai pas des machelodons), Julie, Lolotte, Clairon, Anne-Lyse², JC…et bien sûr Victor : tu vois, le monde se divise en 2 catégories, ceux qui cherchent (à sauvegarder l'environnement !) et ceux qui ramènent des sous à la maison, toi tu ramènes les sous ! Et tu me supportes, alors merci…

SOMMAIRE

SOMMAIRE 1

Liste des figures 7

Liste des tableaux 12

Glossaire des abréviations et des sigles 15

Avant propos 17

PARTIE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE 19

I.1 Les pesticides dans l'environnement 21

I.1.1 Généralités 21

I.1.2 Contamination des milieux 23

I.1.2.1 L'eau 24
I.1.2.2 L'atmosphère 25
I.1.2.3 Le sol 26

I.1.3 Les pesticides étudiés 31

I.1.3.1 Caractéristiques physico-chimiques des substances actives 33
I.1.3.2 Dépôts et dérive après application 36
I.1.3.3 Comportement et devenir dans le sol 36
I.1.3.4 Méthodes d'analyse des pesticides dans les dépôts et dans les sols 40

I.2 Les outils de l'évaluation du risque environnemental des pesticides 44

I.2.1 Introduction à l'évaluation du risque écotoxicologique 44

I.2.2 Evaluation des effets des pesticides étudiés 46

I.2.2.1 Les bioessais standardisés d'écotoxicité en milieu terrestre 46
I.2.2.2. Les études en conditions contrôlées 50
I.2.2.2.1 Les modèles biologiques 50
I.2.2.2.2 Les paramètres de toxicité 52
I.2.2.2.3 Application aux pesticides étudiés 55
I.2.2.3 Les études en conditions *in situ* 59
I.2.2.4 Accumulation des pesticides et techniques d'analyse dans les tissus animaux 61

I.3 Bilan des lacunes identifiées en évaluation du risque des pesticides en milieu terrestre 65

I.4 Définition des objectifs 67

I.5 Références 70

PARTIE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES 85

II.1 Biologie, élevage et exposition des escargots 87

II.1.1 L'escargot *Helix aspersa* 87

II.1.2 Les conditions de l'élevage au laboratoire Chrono-Environnement (LCE) 92

II.1.3 Les systèmes d'exposition 94

II.1.3.1 Les bioessais d'embryotoxicité 94

II.1.3.2 Enceintes pour l'évaluation des effets à long terme (croissance et reproduction) 95

II.1.3.3 Les microcosmes, exposition *in situ* 98

II.2 Etude *in situ* : une parcelle de vigne à Bergbieten, Alsace 99

II.2.1 Situation du site d'étude : vigne de Bergbieten 99

II.2.2 Description du sol 99

II.2.3 Entretien de la vigne 101

II.2.4 Le cycle cultural des traitements 101

II.2.5 Mesure des dépôts au sol 102

II.2.6 Bioindication active : protocole d'exposition des escargots sentinelles 103

II.3 Les techniques analytiques 105

II.3.1 Présentation des techniques et des appareillages 105

II.3.1.1 Techniques d'extraction et de purification 105

II.3.1.1.1 Extraction « Soxhlet » 105

II.3.1.1.2 Extraction accélérée par solvant (Accelerated Solvent Extraction, ASE) 106

II.3.1.1.3 Extraction en phase solide (Solid Phase Extraction, SPE) 106

II.3.1.1.4 Réduction du volume à l'évaporateur rotatif 107

II.3.1.1.5 Chromatographie flash 107

II.3.1.2 Techniques de séparation et d'identification 107

II.3.1.2.1 Chromatographie en phase liquide haute performance (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) et détection par spectrofluorimétrie (HPLC-Fluo) 107

II.3.1.2.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Gaz-chromatography – Mass spectrometry, GC-MS) 109

II.3.2 Préparation des standards 111

II.3.2.1 Herbicides 111

II.3.2.2 Fongicides 111

II.3.3 Etablissement des courbes d'étalonnage 112

II.3.3.1 Herbicides 113

II.3.3.2 Fongicides 114

II.4 Analyses histologiques 114

II.4.1 Dissection de l'escargot pour le prélèvement des organes 114

II.4.2 Fixation, inclusion des organes et préparation des coupes pour observation 115

II.5 Références 118

PARTIE III. RÉSULTATS 121

III.1 Chapitre 1 : Développement de techniques d'analyse pour la quantification de l'exposition et du transfert des pesticides à l'escargot 123

III.1.1 Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil 123

III.1.1.1 Introduction 124
III.1.1.2 Materials and methods 125
III.1.1.2.1 Chemicals and solutions 125
III.1.1.2.2 HPLC fluorescence analysis 126
III.1.1.2.3 Sampling 126
III.1.1.2.4 Calibration and validation study 127
III.1.1.3 Results and discussion 128
III.1.1.3.1 Derivatization optimization 128
III.1.1.3.2 Liquid chromatography optimization 129
III.1.1.3.3 Extraction optimization 131
III.1.1.3.4 Calibration and uncertainties 135
III.1.1.4 Conclusions 136

III.1.2 Résultats sur le développement de méthodes d'extraction et d'analyse d'herbicides et de fongicides dans les escargots 138

III.1.2.1 Introduction 138
III.1.2.2 Extraction et analyse des fongicides en GC-MS 139
III.1.2.3 Extraction et analyse des herbicides en HPLC-Fluo 142
III.1.2.3.1 Essais d'extraction ASE, USE et agitation 142
III.1.2.3.2 Adaptation du protocole de Schneider (2001) 144
III.1.2.3.2.1 Test du rendement de la résine SPE 145
III.1.2.3.2.2 Essais avec les escargots 146
III.1.2.4 Conclusion 150

III.1.3 Références 151

III.2 Chapitre 2 : Développement de tests d'embryotoxicité sur les œufs d'escargots pour l'évaluation des contaminants du sol 155

III.2.1 Towards the development of an embryotoxicity bioassay with terrestrial snails: screening approach for cadmium and pesticides 155

III.2.1.1 Introduction 156
III.2.1.2 Materials and methods 157
III.2.1.2.1 Chemicals 157
III.2.1.2.2 Snails and clutches 158
III.2.1.2.3 Exposure device 159
III.2.1.2.4 Sample preparation for Cd analyses 159

III.2.1.2.5 Embryo observation 160
III.2.1.2.6 Statistical analyses 160
III.2.1.3 Results 161
III.2.1.3.1 Hatching success 161
III.2.1.3.2 Transfer of Cd 164
III.2.1.3.3 Normal and disrupted embryogenesis 164
III.2.1.4 Discussion 167
III.2.1.4.1 Herbicide and mixture toxicity 167
III.2.1.4.2 Effect of Cd and transfer to eggs 169
III.2.1.4.3 Disruption of embryogenesis 169
III.2.1.4.4 Utility and limits of an embryotoxicity bioassay with snail eggs 170

III.2.2 Liquid, solid and volatile phase bioassays using land snail's eggs for soil risk assessment 172

III.2.2.1 Introduction 174
III.2.2.2 Materials and methods 175
III.2.2.2.1 Chemicals 175
III.2.2.2.2 Soil preparation 175
III.2.2.2.3 Snail's eggs 176
III.2.2.2.4 Liquid phase bioassay (LPB) 177
III.2.2.2.5 Solid phase bioassay (SPB) 178
III.2.2.2.5.1 Effect of various parameters on hatching 178
III.2.2.2.5.2 Effect of dilution matrix 178
III.2.2.2.6 Volatile phase bioassay (VPB) 179
III.2.2.2.7 Statistical analyses 179
III.2.2.3 Results 180
III.2.2.3.1 Liquid phase bioassay 180
III.2.2.3.2 Solid phase bioassay 182
III.2.2.3.2.1 Influence of exposure mode and soil moisture on hatching success 182
III.2.2.3.2.2 Effects of various natural soils on hatching success in "non-covered" eggs mode 183
III.2.2.3.2.3 Influence on embryotoxicity of the matrix used to dilute the compounds under test 183
III.2.2.3.3 Volatile phase bioassay 184
III.2.2.4 Discussion 184
III.2.2.4.1 The Liquid Phase Bioassay 184
III.2.2.4.2 The Solid Phase Bioassay 186
III.2.2.4.3 Pros and cons of LPB, SPB and VPB 188
III.2.2.5 Conclusion 189

III.2.3 Références 191

III.3 Chapitre 3 : Effets et transferts d'herbicides de la vigne chez l'escargot suite à l'exposition chronique en laboratoire *via* le sol et/ou la nourriture 197

III.3.1 Glyphosate and glufosinate-based herbicides: fate in soil, transfer to and effects on land snails 197

III.3.1.1 Introduction 199
III.3.1.2 Materials and Methods 200
III.3.1.2.1 Snails 200

III.3.1.2.2 Chemicals 200
III.3.1.2.3 Soil 201
III.3.1.2.4 Food 201
III.3.1.2.5 Experimental system 201
III.3.1.2.6 Observation of the genital apparatus and histology 202
III.3.1.2.7 Herbicide residue determination in soil, food and snails 202
III.3.1.2.8 Statistics 203
III.3.1.3 Results 204
III.3.1.3.1 Fate of herbicides in food and soils with or without snails 204
III.3.1.3.2 Herbicide effects on snails 208
III.3.1.3.3 Herbicide residues in snails 211
III.3.1.4 Discussion 212
III.3.1.4.1 Degradation kinetics of herbicides in soil 212
III.3.1.4.2 Fate in and effects of herbicides on snails and comparison with other soil organisms 213
III.3.1.5 Conclusion 216
III.3.1.6 Résultats complémentaires 217

III.3.2 Effets du glyphosate sur l'ensemble du cycle de vie (de l'incubation à la ponte) de l'escargot 219

III.3.2.1 Introduction 219
III.3.2.2 Matériels et méthodes 220
III.3.2.2.1 Modalités d'exposition 220
III.3.2.2.2 Phase de développement embryonnaire 221
III.3.2.2.3 Phase de croissance 222
III.3.2.2.4 Phase de reproduction 222
III.3.2.2.5 Analyses statistiques 222
III.3.2.3 Résultats 223
III.3.2.3.1 Développement embryonnaire 223
III.3.2.3.2 Mortalité et croissance 224
III.3.2.3.3 Reproduction 226
III.3.2.3.4 Histologie des gonades 231
III.3.2.4 Discussion 235
III.3.2.4.1 Embryotoxicité en phase solide 235
III.3.2.4.2 Effets du Bypass® sur la survie et la croissance 235
III.3.2.4.3 Effets du mélange R-A sur la survie et la croissance 236
III.3.2.4.4 Effets du mélange R-A sur la reproduction 236
III.3.2.4.5 Effets du Bypass® sur la reproduction 238
III.3.2.4.6 Intérêts et limites du dispositif d'exposition et perspectives 240

III.3.3 Références 245

III.4 Chapitre 4 : Dérive, dépôts, transfert et effets des pesticides sur l'escargot en conditions réelles d'application dans une parcelle de vigne 251

III.4.1 Snails as indicators of pesticide drift, deposit, transfer and effects in the vineyard 251

III.4.1.1 Introduction 253
III.4.1.2 Materials and methods 254
III.4.1.2.1 Experimental sites and pesticide applications 254
III.4.1.2.2 Snails and caging 256

III.4.1.2.3 Spray deposits sampling 257
III.4.1.2.4 Drift sample analysis 258
III.4.1.2.5 Residue analysis in snails 259
III.4.1.2.6 Statistical analysis 260
III.4.1.3 Results and discussion 260
III.4.1.3.1 Spray deposits and drift 260
III.4.1.3.2 Transfer and bioaccumulation 264
III.4.1.3.3 Mortality and growth of snails 267
III.4.1.4 Conclusion 270

III.4.2 Références 272

PARTIE IV. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 277

IV. 1 De l'évaluation du danger à l'évaluation du risque environnemental 279

IV.1.1 Apports du volet analytique de la thèse pour l'évaluation de l'exposition et du transfert des pesticides 279

IV.1.2 Apports de ce travail pour l'évaluation du risque environnemental des pesticides 284

IV.2 Facteurs de variabilité des réponses mesurées 286

IV.2.1 Embryotoxicité des pesticides : influence du stade de développement des œufs lors de l'exposition 286

IV.2.2 Effets du glyphosate sur la croissance : influence des modalités d'exposition 287

IV.2.2.1 Influence des conditions environnementales : laboratoire *versus* terrain 288
IV.2.2.2 Influence de la formulation commerciale : Bypass® *versus* Roundup® 289
IV.2.2.3 Influence des sources/voies d'exposition sur l'accumulation du glyphosate et la présence d'AMPA dans les tissus 293
IV.2.2.4 Influence des sources/voies d'exposition sur l'effet du glyphosate/AMPA 295

IV.3 Apport de la thèse à l'interface de l'évaluation du risque environnemental et sanitaire 296

IV.3.1 Accumulation et évaluation du risque de transfert dans les chaînes trophiques 296

IV.3.2 Accumulation et lien entre approches écotoxicologiques et sanitaires 298

IV.4 Conclusion et perspectives 301

IV.5 Références 306

Liste des participations aux congrès nationaux et internationaux 312

Liste des publications soumises et acceptées 312

Résumés 314

Résumé Français 314

Résumé Anglais 315

Liste des figures

Partie I

Figure I.1. Voies de dispersion et de transfert des pesticides dans l'environnement, par exemple lors d'une application sur la vigne. 24

Figure I.2. Concentrations moyennes estimées (en kg km^{-2}) d'herbicides dans les sols de cultures céréalières en 1994 (à gauche) et 1999 (à droite) pour l'Europe. IRENA Indicator Fact Sheet (http://eusoils.jrc.ec.europa.eu/library/themes/contamination/irena.html). 28

Figure I.3. Structures chimiques des pesticides étudiés (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). 35

Figure I.4. Objectifs de la thèse dans le cadre d'une analyse multimédia de l'exposition – transfert – effets des pesticides de la vigne aux escargots. 68

Partie II

Figure II.1. Escargot *Helix aspersa*. 87

Figure II.2. Morphologie externe de l'escargot (d'après Kerney *et al.* 2006) 87

Figure II.3. Anatomie interne (appareils génital et digestif) de l'escargot *Helix aspersa* (d'après Beaumont et Cassier 1998). 88

Figure II.4. Escargots en accouplement avec le dard (flèche) du partenaire planté dans la masse pédieuse. 90

Figure II.5. Escargots en accouplement. 90

Figure II.6. Spermathèque *d'Helix aspersa* d'après Evanno et Madec (2007). 91

Figure II.7. Photographie et structure d'un œuf d'*Helix aspersa* d'après Bayne (1968). 91

Figure II.8. Ponte d'*Helix aspersa* incubant sur du papier humidifié. 91

Figure II.9. Salle d'élevage des escargots sous conditions contrôlées. 92

Figure II.10. Système d'élevage en boîtes à souris pour la *nursery*. 93

Figure II.11. Cycle d'élevage de l'escargot *Helix aspersa* en conditions contrôlées (d'après Gomot de Vaufleury 2000) en relation avec l'utilisation des différents stades de vie dans les expériences présentées dans la partie de Résultats (Partie III). 94

Figure II.12. Système d'exposition des escargots par le sol et la nourriture pour la mesure des effets à long terme durant la 1ère expérience (Chapitre 3, section III.3.1). 96

Figure II.13. Dispositifs d'exposition par le sol et la nourriture pour l'évaluation des effets des pesticides sur l'ensemble du cycle de vie de l'escargot durant la 2nde expérience (Chapitre 3, section III.3.2) : (a) développement embryonnaire; (b) croissance; (c) reproduction. 97

Figure II.14. Microcosme utilisé pour l'évaluation des effets des pesticides appliqués sur une parcelle de vigne sur l'escargot (Chapitre 4, section III.4). Dimensions : cage : 25x25x15 cm ; couvercle : 30x30 cm scellé par 4 piquets. Le maillage est de 1x1 cm. 98

Figure II.15. Photo satellite (Google Maps) de la zone d'étude. La parcelle est délimitée en rouge et la zone témoin en bleue. 99

Figure II.16. Les 3 zones d'étude : la parcelle (P), la bordure de la parcelle (B) et la zone témoin (T). 99

Figure II.17. Désherbage sous le rang et traitement des rejets de la vigne au glyphosate par jet projeté (traitement H1). 102

Figure II.18. Traitement F1 des feuilles de vigne par jet porté. 102

Figure II.19. Emplacement des 3 plaques inox permettant de mesurer le dépôt au sol à (a) 0, (b) 1 et (c) 3 m de la parcelle sous le vent lors du traitement H1..... 103
Figure II.20. Récupération des gouttelettes de pesticides sur la plaque de dépôt par rinçage à l'eau (traitement H1)..... 103
Figure II.21. Parcelle divisée en rangs (→) et en segments (→)..... 104
Figure II.22. Microcosme placé sous le pied de vigne..... 104
Figure II.23. Microcosme placé au centre du rang..... 104
Figure II.24. Gradient d'élution utilisé pour l'analyse des herbicides par HPLC-Fluo..... 108
Figure II.25. Gradient de température utilisé pour l'analyse des fongicides en GC-MS..... 110
Figure II.26. Droites d'étalonnage des herbicides analysés en HPLC-Fluo..... 113
Figure II.27. Droites d'étalonnage des fongicides analysés en GC-MS..... 114

Partie III

Chapitre 1

Figure III.1.1. Influence of the temperature on the FMOC derivatization yield for glyphosate, glufosinate and AMPA. 129
Figure III.1.2. HPLC-Fluo Standard chromatograms of glyphosate, AMPA and glufosinate at 0.5 mg l^{-1} obtained on C_{18} reverse phase Supelco 250 mm column (a) and C_{18} reverse phase Waters 300 mm column (b). Peak areas and retention times are 63.11 (18.45 min), 148.15 (19.66 min) and 86.4 (23.91 min), respectively for glyphosate, AMPA and glufosinate (a) and 291.57 (16.68 min), 526.25 (20.20 min) and 282.25 (25.43 min) respectively for glyphosate, AMPA and glufosinate (b). 131
Figure III.1.3. HPLC-Fluo chromatograms of soil samples spiked at 5 mg kg^{-1} of glyphosate and AMPA extracted by NaOH 0.1M (a) or water (b) and glufosinate extracted by water (c). Glufosinate (a,b) and glyphosate (c) were internal standards at 0.5 mg l^{-1}. 134
Figure III.1.4. Chromatogramme des 4 composés d'intérêt (vert/C : cymoxanil ; noir/F : folpel ; brun/T : tébuconazole et orange/P : pyraclostrobine) et des deux étalons internes (rouge/N : nitrophénol et violet/A : atrazine) lors du passage d'un extrait d'escargot purifié. 141
Figure III.1.5. Tests de rendements effectués sur la résine lorsqu'elle est dopée avec un standard, c'est-à-dire sans la matrice escargot..... 145
Figure III.1.6. Tests de rendement effectués sur la résine lorsqu'elle est dopée soit avec du glyphosate et de l'AMPA soit avec du glufosinate. 146
Figure III.1.7. (a) Chromatogramme d'un extrait d'escargot réalisé selon la méthode de Schneider (2001) ; (b) même extrait mais dopé avec de l'échantillon standard. 147
Figure III.1.8. (a) Chromatogramme d'un échantillon d'escargot réalisé selon la méthode de Schneider, (b) ce même extrait après ajout d'une extraction liquide / liquide au dichlorométhane, (c) puis dopé avec de l'échantillon standard. 148
Figure III.1.9. (a) Chromatogramme d'un extrait d'escargot réalisé selon la méthode de Schneider (2001) avec ajout d'une étape d'extraction à l'acétonitrile, (b) ce même extrait mais dopé avec de l'échantillon standard. 149

Chapitre 2

Figure III.2.1. Laying snails in glass pots allowing easy sampling of fresh alive eggs..... 159

Figure III.2.2. Hatching success of snail eggs exposed to increasing pH. Significant differences ($p < 0.001$) are indicated by ***. 162

Figure III.2.3. Concentration–response curves obtained by Hill's model after 14 days of exposure of *Helix aspersa* eggs to (a) Cd, (b) glyphosate (test 1+2+3, solid line) and Roundup® (dotted line), (c) Reglone®, and (d) Agral® (test 1: dashed line; test 2: dotted line and test 3: solid line). Plots represent the mean (with 95% confidence interval)..... 163

Figure III.2.4. Concentration-response curve obtained by Hill's model after 14 days of exposure of *Helix aspersa* eggs to mixture Reglone®-Agral® (solid line) compared with the predicted concentration-response of the mixture determined by the CA model (dashed line). Concentration is estimated in diquat. Plots represent the mean (with 95% confidence interval)..... 164

Figure III.2.5. Embryos of non-exposed *Helix aspersa* eggs at the one-cell stage (A, 0–3 h after fertilization), 8 cells (B, 8–12 h after fertilization), morula (C, 2–3 days after fertilization), gastrula (D, 4 days after fertilization) and larvae (E, 7 days and F, 12 days after fertilization). 166

Figure III.2.6. Non-hatched embryos of eggs after 14 days exposure to Reglone® (A, 1.5 mg a.i. l^{-1}) and Cd (B and C, 4 mg l^{-1}; D, 6 mg l^{-1})..... 167

Figure III.2.7. Exposure devices used for the (a) LPB, (b) SPB in non-covered mode by soil, (c) SPB in covered mode by soil and (d) VPB. 180

Figure III.2.8. Hatching success (%) of *Helix aspersa* for the (A) "covered eggs" or (B) "non-covered eggs" for 3 uncontaminated ploughed soils (F, C and B) and 4 natural metal-contaminated soils (D, M, H and N). The asterisk indicates differences of hatching success between covered and non-covered modes for each soil. Sharps indicate significant differences of hatching success between each contaminated soil and pooled non-contaminated soils that do not differ significantly among them..... 182

Figure III.2.9. Hatching success (%) of *Helix aspersa* eggs according to the percentage of soil M in ISO substrate (solid line) or in soil F (dotted line). Curves were obtained by Hill's model. 183

Figure III.2.10. Hatching success (%) of *Helix aspersa* eggs as a function of the concentration (in active ingredient) of (a) Bypass® and (b) Corail® in ISO substrate (solid line) or soil B (dashed line). Curves were obtained by Hill's model. 184

Chapitre 3

Figure III.3.1. Kinetics of glyphosate (Gly) degradation and AMPA formation in soils without snails (black curves) for an initial measured concentration of (a) 2.62 mg kg^{-1} and (b) 42.56 mg kg^{-1} and in soils with snails (coloured curves) when they were exposed to Bypass® in soil (S), in food (F) or in both (SF) at treatment levels 1 or 2. 206

Figure III.3.2. Glufosinate degradation kinetics in soils without snails for an initial measured concentration of (a) 0.57 mg kg^{-1} and (b) 11.12 mg kg^{-1}. 206

Figure III.3.3. Concentrations in (a, b, c) glyphosate and (d, e, f) AMPA in soil with snails after (a, d) 28, (b, e) 56 and (c, f) 168 days exposure when snails were not exposed (C) or when they were exposed to Bypass® in

soil (S), in food (F) or in both (SF) at treatment levels 1 or 2. The same letters indicate no difference between modes. 208
Figure III.3.4. Growth of *Helix aspersa* snails not exposed (C) or exposed to Bypass® (By) or Basta® (Ba) in soil (S) or food (F) or both (SF) at treatment 1 or treatment 2 over 168 days, in (a) fresh mass and (b) shell diameter. 210
Figure III.3.5. Fresh mass of the different parts of the genital apparatus of *Helix aspersa* not exposed (C) or exposed to Bypass® (By) or Basta® (Ba) in soil (S) or food (F) or both (SF) at treatment 1 or treatment 2 at 168 days. Bars represent standard deviation. 210
Figure III.3.6. Histology of gonads for (a) control and snails exposed to (b) Bypass® in soil and food with treatment 1 (By1SF), (c) Bypass® in soil and food with treatment 2 (By2SF) and (d) Basta® in soil and food with treatment 2 (Ba2SF). 211
Figure III.3.7. Dispositif d'incubation des œufs des 10 pontes (témoins papier = boîtes de Pétri au 1er plan, témoins sol = pots en arrière plan et Bypass® sol = pots de la rangée du milieu). 221
Figure III.3.8. Evolution de la masse fraîche (moyenne ± écart type) au cours des 240 jours d'exposition pour les 5 modalités. 224
Figure III.3.9. Evolution du diamètre de coquille (moyenne ± écart type) au cours des 240 jours d'exposition pour les 5 modalités. 225
Figure III.3.10. Pourcentage d'escargots bordés pour les différents traitements après 240 jours d'exposition. . 225
Figure III.3.11. Nombre de pontes par escargot en fin d'expérience (t240) pour chaque traitement. Les boîtes à moustache représentent la médiane et les quartiles et les croix, les moyennes. 226
Figure III.3.12. Cinétique du nombre de pontes par escargot pour chaque traitement. 226
Figure III.3.13. Appareil génital partiellement évaginé chez Byp8. 228
Figure III.3.14. Appareil génital partiellement évaginé chez TeByp6. 228
Figure III.3.15. Epiphragme rosé sécrété par l'escargot pour se fixer contre la paroi et entrer en dormance. 228
Figure III.3.16. Appareils génitaux (a) de 10 escargots Te et (b) de 8 escargots Te+. 231
Figure III.3.17. Gonades d'escargots non exposés (Te) âgés de 240 jours. 232
Figure III.3.18. Gonades d'escargots exposés au Bypass® (Byp et BypTe) âgés de 240 jours. 233
Figure III.3.19. Gonades d'escargots exposés au mélange Reglone-Agral (Te+) âgés de 240 jours. 234
Figure III.3.20. Coupe transversale d'un cerveau d'escargot témoin : ganglions cérébraux sous et sus-œsophagiens. 242
Figure III.3.21. Rôles proposés des différentes parties du système nerveux central sur la régulation de la gamétogénèse chez *Helix aspersa* (d'après Gomot de Vaufleury 2001). 243
Figure III.3.22. Localisation des corps dorsaux (→) au niveau du mésocérébron et de la commissure cérébrale des ganglions sus-oesophagiens chez un escargot non exposé, mature sexuellement et s'étant déjà reproduit. 244

Chapitre 4

Figure III.4.1. Study site with the indication (cross) of the microcosms. 255

Figure III.4.2. Average (solid grey line), maximal (solid black line) and minimal temperatures (dotted black line) and rainfall (black crosses) during snail exposure. H1, H2: treatment with herbicides; F1 to F4: treatments with fungicides. 257

Figure III.4.3. Spray deposits on soil (in percentage of the applied dose) of cymoxanil and folpet (Valiant® Flash), of tebuconazole (Corail®) and of pyraclostrobin (Cabrio® Top) as a function of the distance after treatments F1, F2 and F3. Plots represent means with standard deviations..... 263

Figure III.4.4. Copper and sulphur concentrations in snails (foot and viscera) after ten days exposure to treatment F4 in the three zones (C, control; B, border; P, parcel). Letters indicate differences (< 0.05) between zones for foot and viscera, respectively and asterisks indicate differences (< 0.05) for each zone between foot and viscera..... 267

Figure III.4.5. Average mortality (in percentage) of snails in microcosms for the three zones (C, control; B, border; P, parcel) and the six treatments (F, fungicides; H, herbicides)..... 268

Partie IV

Figure IV.1. Extraits de la fiche de données de sécurité (FDS) du Bypass®..... 290

Figure IV.2. Extraits de la fiche de données de sécurité (FDS) du Roundup®..... 291

Figure IV.3. Voies de dégradation du glyphosate et du sel d'IPA de glyphosate dans le sol d'après Williams *et al.* (2000). 295

Figure IV.4. Schéma général de la contribution de ces travaux à l'évaluation du risque..... 305

Liste des tableaux

Partie I

Tableau I.1. Description des 8 pesticides étudiés dans la thèse. 32

Tableau I.2. Caractéristiques physico-chimiques des 8 molécules organiques utilisées (obtenues à partir des bases de données Agritox, PubChem et Footprint). Pour le K_{oc} et la DT50, un intervalle de valeurs est donné, représentant la variation observée suivant le type de sol. 34

Tableau I.3. Exemples de méthodes d'extraction et d'analyse des composés étudiés, dans les sols ou les végétaux. 43

Tableau I.4. Données d'écotoxicité (à partir de bioessais standardisés) des 8 substances actives étudiées (obtenues des bases de données Agritox, Footprint et ESIS). 48

Tableau I.5. Méthodes de dosages (extraction et analyse) des composés organiques étudiés dans les tissus animaux, disponibles dans la littérature scientifique. 64

Partie II

Tableau II.1. Résultats d'analyses du sol de Bergbieten caractérisé comme une argile limon-sableuse selon la classification française GEPPA (Baize 2000) ou « clay loam » selon la classification américaine USDA (Soil Survey Staff 1993)..... 100

Partie III

Chapitre 1

Table III.1.1. Results of the extraction method for glyphosate, AMPA and glufosinate in soil with different solvents and parameters..... 132

Table III.1.2. Parameters of calibration and validation for the extraction and analysis method of soil samples. 136

Tableau III.1.3. Rendements (%) obtenus pour les 4 fongicides des extraits ASE d'escargots purifiés ou non par chromatographie flash. 141

Tableau III.1.4. Résumé des différents essais d'extraction des herbicides réalisés à partir des escargots. 143

Chapitre 2

Table III.2.1. Range of nominal concentrations used for each contaminant and corresponding pH. 158

Table III.2.2. Toxicity (EC10 and EC50) of the different contaminants on the hatching success of snail embryos and recommended concentrations for agricultural use. 162

Table III.2.3. Transfer of Cd from exposure media to eggshell and albumen. 164

Table III.2.4. Characteristics of commercial formulations of pesticides. 176

Table III.2.5. Characteristics of the 8 soils used for testing with LPB, SPB and VPB. 176

Table III.2.6. Ecotoxicity of commercial formulations of pesticides on the hatching success of *Helix aspersa* in the liquid phase bioassay. 181

Table III.2.7. Hatching success (%) of snail's eggs in soils moistened from 40 to 60% of the WHC. 183

Chapitre 3

Table III.3.1. Degradation kinetics data of glyphosate and glufosinate in Bergbieten soil. 205
Table III.3.2. Body fresh mass, shell dry mass, mortality and percentage of adults observed after 168 days of exposure to Bypass® (n=5) or Basta® (n=3) by soil (S) and / or food (F) at treatment levels 1 or 2. 209
Table III.3.3. Ecotoxicity of glyphosate and glufosinate for organisms in the soil ([a]) and those living on its surface ([b]). 215
Tableau III.3.4. Modalités d'exposition pour l'étude des effets du glyphosate sur l'ensemble du cycle de vie de l'escargot. 221
Tableau III.3.5. Pourcentages d'éclosion des œufs non exposés (TeA à TeO) ou exposés à du sol contaminé au Bypass® (BypA à BypJ) ou au mélange R-A (Te+K à Te+O) déterminés après 17 jours d'incubation. 223
Tableau III.3.6. Pourcentage de mortalité après 240 jours d'exposition post-éclosion pour les différents traitements. 224
Tableau III.3.7. Paramètres mesurant la reproduction chez les escargots après 240 jours d'exposition. 227
Tableau III.3.8. Observations d'anomalies de l'appareil génital et de comportement. 229
Tableau III.3.9. Différences significatives de la fréquence de l'appareil évaginé (*) entre les différentes modalités. 229
Tableau III.3.10. Masses fraîches (en g) des divers organes de l'appareil reproducteur des escargots exposés (Bypass® et mélange R-A) ou non en fin d'expérience (240 jours) (moyenne ± *écart type*, n = 10 ou 8 pour les Te+). 230

Chapitre 4

Table III.4.1. Description of the pesticide treatments applied on the vineyard parcel of Bergbieten during the year 2008. 255
Table III.4.2. Meteorological data from the Entzheim station for the 1-h period corresponding to each treatment. 257
Table III.4.3. Total spray deposits on soil (calculated on all the measured points from 0 to 20 m) and losses in percentage of applied dose for organic pesticides from treatments H1 to H2. 261
Table III.4.4. Volatility of pesticides studied in spray deposits, e.g. vapour pressure and Henry's law constant at 25°C (Source: Footprint database). 262
Table III.4.5. Accumulation of pesticides in snails of the parcel and effects after each treatment between snails of each zone. 265

Partie IV

Tableau IV.1. Développements et techniques d'analyse des 8 molécules organiques étudiées. 280
Tableau IV.2. Synthèse des bioessais développés dans ce travail pour la caractérisation du danger et du risque des pesticides étudiés. 283
Tableau IV.3. Evaluation du risque environnemental des 8 molécules organiques étudiées. 285
Tableau IV.4. Effets du glyphosate sur l'escargot *Helix aspersa*. 288

Tableau IV.5. Définition des LMR pour 6 des composés étudiés selon les deux étapes définies ci-dessus en relation avec l'accumulation dans les tissus d'escargots. Données obtenues des DAR (EC 1998b, 2004, 2005a, 2007b, 2007a), du Règlement 839/2008 (EC 2008) et des sites Santé Canada (http://www.hc-sc.gc.ca), FAO/OMS (http://www.codexalimentarius.net) et EU pesticides database (http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=substance.selection)..... 300

Glossaire des abréviations et des sigles

ACN : Acétonitrile.

AMPA : Acide aminomethylphosphonique, métabolite du glyphosate.

ECx : Effective Concentration x%. Concentration effective causant x% d'effet par rapport au témoin. Ex : EC10 et EC50.

ei : Etalon interne.

DSE : Dose sans effet (pour l'évaluation du risque toxicologique).

DT50 : Dissipation / degradation Time 50%. Temps nécessaire pour que la molécule soit dégradée ou dissipée de moitié.

FBA : Facteur de bioaccumulation.

FBC : Facteur de bioconcentration

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques.

LD50 ou LC50 : Lethal Dose / Concentration 50%. Dose ou concentration létale pour 50% des organismes exposés, par rapport au témoin.

LMR : Limite maximale applicable aux résidus.

LD ou LOD : Limite de détection.

LQ ou LOQ : Limite de quantification.

MF : Masse fraîche.

MPA : acide 2-methylphosphonyl acetique, metabolite du glufosinate.

MPP : acide 3-methylphosphonyl propionique, metabolite du glufosinate.

MS : Masse sèche.

NAG : disodium L-2-acetamido-4-methylphosphinato-butyrate, metabolite du glufosinate.

NOEC : No observed effect concentration : plus forte concentration testée sans effet observé (statistiquement non différent des témoins).

OC : Organochlorés (pour les pesticides).

OP : Organophosphorés (pour les pesticides).

PCB : Polychlorobiphényle.

PE : Perturbateur endocrinien

PEC : Predicted environemental concentration : concentration prévisible / prédite pour l'environnement. PECi : PEC initiale, déterminée juste après l'application du pesticide au champ.

POEA : Polyoxyethylène tallowamine, adjuvant du Roundup®.

PNEC : Predicted no effect concentration : concentration prévisible sans effet pour l'environnement.

s.a. : Substance active.

TER : Toxicity / Exposure ratio. Ratio toxicité / exposition.

« Tier » : Mot anglais signifiant niveau, utilisé pour classer un bioessai selon sa pertinence écologique (aigu ou chronique, en conditions contrôlées ou sur le terrain, …).

Avant propos

Le travail de recherche présenté concerne l'étude des effets des pesticides utilisés en viticulture sur un animal terrestre vivant à l'interface sol-air-plantes, l'escargot, et cela dans divers contextes d'exposition :

- une **approche en laboratoire** portant sur la phase embryonnaire et sur l'ensemble du cycle de vie de l'escargot et nécessitant la mise au point de bioessais adaptés,
- une **approche sur le terrain** portant sur les effets des pesticides en conditions réelles d'application.

Ces deux approches expérimentales sont complétées par un volet **analytique** qui vise à développer les méthodes pour quantifier l'exposition des escargots aux pesticides et leurs capacités d'accumulation de ces composés.

Ce manuscrit présente l'aboutissement de 3,5 années d'études réalisées dans le cadre d'une thèse co-financée par l'ADEME et le Conseil Régional de Franche-Comté. Elle s'est déroulée au laboratoire Chrono-Environnement à Besançon pour la partie « approche laboratoire » et au laboratoire des Matériaux, Surfaces et Procédés pour la Catalyse à Strasbourg pour le « volet analytique ». Ce travail a pu bénéficier de financements du réseau CNRS ERICHE (Evaluer et Réduire l'Impact de la Chimie sur l'Environnement), du programme interdisciplinaire INSU-CNRS EC2CO (Ecosphère Continentale et Côtière) dans l'action thématique CYTRIX (Cycle Hydro-biogéochimiques, Transferts et Impact Ecotoxicologique) et d'une bourse octroyée par l'AFFDU (Association des Femmes Françaises Diplômées de l'Université).

Le manuscrit est organisé en quatre parties :

La première (I) synthétise les connaissances sur le devenir et les effets des pesticides étudiés dans la thèse ainsi que sur les méthodes d'évaluation du risque. Elle dégage les lacunes existantes, propose des hypothèses de travail et définit les objectifs.

La deuxième (II) est consacrée aux matériels et méthodes utilisés pour ce travail.

La troisième partie (III), déclinée en quatre chapitres, présente les résultats sous la forme de publications ou projets de publication rédigés en Anglais et de textes en Français :

Le Chapitre 1 est consacré au développement de méthodes d'extraction et d'analyse des pesticides dans les sols et les tissus d'escargots.

Le Chapitre 2 présente la mise au point de bioessais d'embryotoxicité permettant d'évaluer la toxicité de contaminants présents dans les phases liquide, solide et gazeuse du sol. Ces bioessais sont appliqués aux pesticides étudiés dans ce travail.

Le Chapitre 3 étudie le transfert et les effets de deux herbicides à l'escargot sur l'ensemble de son cycle de vie, au cours de deux expériences réalisées en conditions contrôlées durant 6 et 8 mois respectivement.

Le Chapitre 4 présente une étude *in situ* réalisée dans une parcelle de vigne, visant à déterminer les dépôts au sol, le transfert et les effets des pesticides à l'escargot en conditions réelles d'application.

Enfin, la dernière partie (IV) discute de la relation entre les résultats présentés dans les chapitres précédents, fait le bilan de la contribution apportée par cette étude à la recherche en écotoxicologie et restitue l'ensemble de ces apports dans le contexte global de l'évaluation des risques des pesticides. Les perspectives envisagées dans la continuité de ces travaux sont également présentées.

PARTIE I

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 Les pesticides dans l'environnement

I.1.1 Généralités

Les **pesticides** regroupent l'ensemble des substances (molécules) ou produits (préparations) utilisés dans le secteur agricole ou dans d'autres applications pour éliminer les organismes nuisibles. On distingue deux types de pesticides : les produits phytopharmaceutiques ou produits phytosanitaires et les biocides (EC 2009a).

Les **phytosanitaires** (selon la directive 91/414/CE, EC 1991) sont des substances actives et des préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur et qui sont destinées à (i) protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action, (ii) exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'il ne s'agisse pas de substances nutritives (il s'agit par exemple des régulateurs de croissance), (iii) assurer la conservation des produits végétaux, pour autant que ces substances ou produits ne fassent pas l'objet de dispositions particulières du Conseil ou de la Commission concernant les agents conservateurs et enfin (iv) détruire les végétaux indésirables, détruire les parties de végétaux, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux.

Les **biocides** (selon la directive 98/8/CE, EC 1998) sont des substances actives et des préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur, qui sont destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière, par une action chimique ou biologique.

Tout au long de ce manuscrit, le terme générique « pesticide » est communément employé pour désigner les phytosanitaires, substances actives ou préparations. Il convient également de préciser que le terme préparation ou formulation commerciale (lorsque elle est associée à un fabricant) désigne un mélange de une ou plusieurs substances actives pouvant être associée(s) à un ou plusieurs adjuvants.

La réglementation européenne stipule que toutes les substances chimiques sont soumises au règlement REACH n°1907/2006/CE (EC 2006c), entré en vigueur en 2007, qui préconise leur enregistrement, évaluation et autorisation ainsi que les restrictions applicables à celles-ci. Plus

spécifiquement, la réglementation des produits phytosanitaires est régie par la directive n°91/414/CE (EC 1991) concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques, qui sera bientôt réévaluée et remplacée par le règlement n°1107/2009/CE du 21 octobre 2009 (EC 2009b), qui entrera en vigueur en 2011. Les substances inscrites à l'annexe I de cette directive sont définies comme ne présentant pas de risque inacceptable pour l'environnement ou la santé humaine et peuvent donc entrer dans la composition des produits phytosanitaires. Lorsqu'un nouveau produit est élaboré, il doit, avant d'être commercialisé, bénéficier d'une « Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) » délivrée au niveau national pour un usage spécifique. L'AMM d'une préparation fait l'objet d'une réévaluation tous les 10 ans et le produit peut ainsi être retiré du marché si les données de son dossier d'évaluation ne satisfont pas aux conditions d'AMM. Une nouvelle directive concernant la réglementation des pesticides a été créée récemment instaurant un cadre d'action communautaire pour parvenir à une utilisation des pesticides compatible avec le développement durable : c'est la directive cadre pesticides (n°2009/128/CE) du 21 octobre 2009 (EC 2009a). Enfin il existe un règlement (n°396/2005/CE) concernant les limites maximales applicables aux résidus (LMR) de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origines végétale et animale. A chaque produit destiné à la consommation humaine ou animale énuméré dans l'annexe I du présent règlement (N°178/2006/CE), est attribuée une LMR pour chaque substance active inscrite à l'annexe I de la directive 91/414/CE. Lorsqu'une LMR n'a pas été fixée de façon spécifique pour un produit, par exemple parce que les méthodes analytiques ne le permettent pas, la valeur par défaut de 0,01 mg kg^{-1} est appliquée.

Le marché mondial des pesticides est globalement stable depuis quelques années et représente actuellement 40,475 milliards de dollars. L'Europe est le plus gros consommateur (avec 31,7% du marché) devant l'Asie (23,1%), les Amériques (Sud : 20,8% ; Nord : 20,6%) et l'Afrique (3,8%). Au niveau des cibles des produits, ce sont les herbicides qui sont le plus utilisés mondialement (46,9%) devant les fongicides (25,9%), les insecticides (24,1%) et les divers (rodenticides, molluscicides…). L'utilisation des pesticides en France reste très importante, avec environ 100 000 tonnes de substances actives vendues par an. La France est le quatrième consommateur de phytosanitaires dans le monde et se place première au niveau européen (UIPP 2009). Alors que la vente des insecticides a tendance à reculer, celles des herbicides et des fongicides augmentent. Ces chiffres sont basés sur les ventes des pesticides et il faut être conscient que cela ne représente pas obligatoirement les utilisations réelles

annuelles, du fait d'éventuels stockages, réutilisables d'une année sur l'autre. Parmi les cultures françaises consommant le plus de phytosanitaires (céréales, maïs, vigne et colza), c'est la viticulture qui tient la première place si on rapporte le tonnage à la surface exploitée. Ce sont principalement les fongicides qui sont utilisés sur la vigne, notamment à base de cuivre (Cu) et de soufre (S), pour lutter contre les maladies comme l'oïdium et le mildiou.

Cette utilisation importante des pesticides a abouti à la contamination chronique de tous les compartiments de l'écosystème qu'ils soient aquatique, atmosphérique ou terrestre.

I.1.2 Contamination des milieux

Les pesticides sont émis dans l'environnement lors des applications en zones agricoles (protection des cultures), en zones urbaines (entretien des jardins, parcs…) et sur les voies de circulation (réseaux routiers, ferrés…). Bien que les principales cibles des pesticides soient les végétaux, il est estimé que seulement 0,1% des quantités appliquées atteignent ceux-ci (Arias-Estévez *et al.* 2008). Les voies de dispersion et de transfert sont nombreuses (Figure I.1). Les gouttelettes de pesticides peuvent atteindre directement le sol sans être stoppées par le feuillage, ou alors indirectement, lorsque la pluie va lessiver les gouttelettes, non encore absorbées par les feuilles. Lors de l'application, les pesticides peuvent être entrainés par dérive loin des zones de culture visées ou être directement volatilisés vers l'atmosphère. La revolatilisation à partir du sol et des végétaux joue également un rôle important dans la contamination de l'air. Enfin, le lessivage et le ruissellement, lors des précipitations, vont entrainer la contamination des eaux de surface et souterraines.

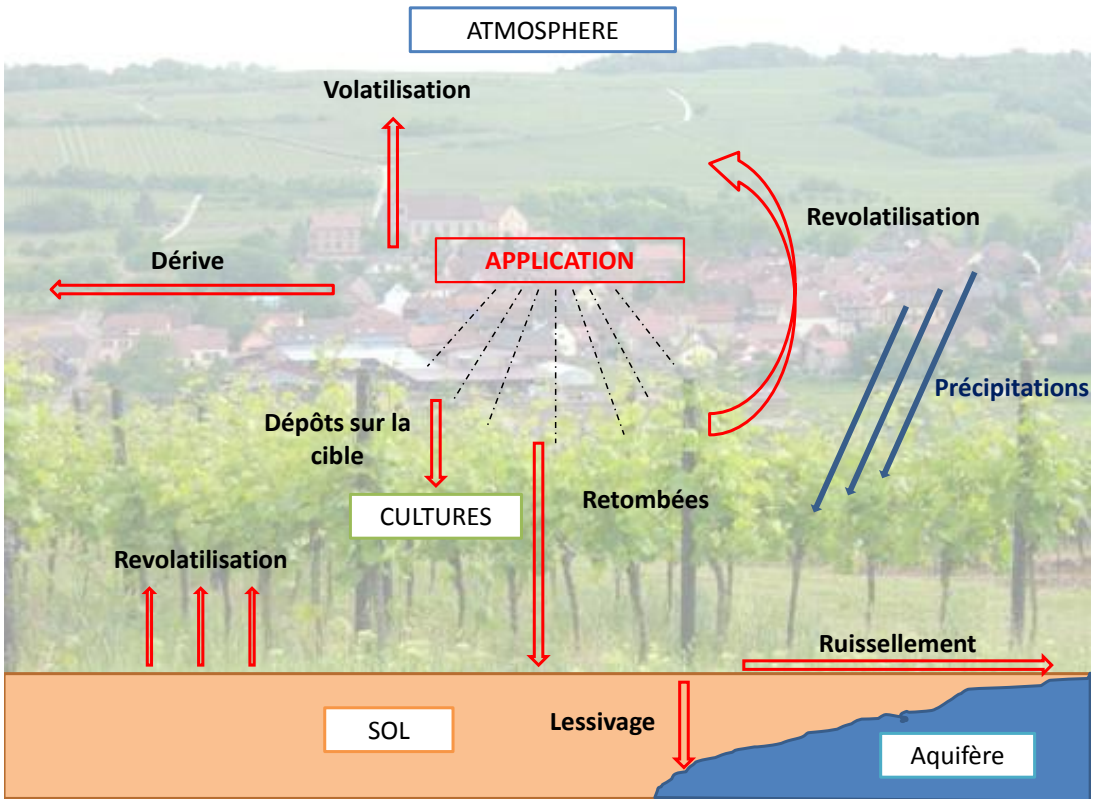


Figure I.1. Voies de dispersion et de transfert des pesticides dans l'environnement, par exemple lors d'une application sur la vigne.

I.1.2.1 L'eau

La contamination des eaux françaises par les pesticides est bien renseignée depuis 1998, date du premier rapport de l'Institut Français de l'Environnement (IFEN, devenu le SOeS, Service de l'Observation et Statistiques de l'Environnement). Les données présentées dans les rapports de l'IFEN montrent que la contamination des eaux par les pesticides est généralisée. Le rapport sur les données de 2005 (IFEN 2007) indique que 91% des points de mesure des eaux de surface et 55% des points de mesure des eaux souterraines sont contaminés. Il ressort également de ces rapports la présence systématique de certaines molécules clés, responsables du déclassement en mauvaise qualité des points de mesure, comme le glyphosate, le diuron et l'isoproturon, 3 herbicides et le métabolite du glyphosate, l'acide aminomethylphosphonique (AMPA). La présence de glyphosate et d'AMPA et leur classement comme molécules préoccupantes sont également constatés au niveau régional, comme le montre une étude réalisée sur les eaux en Franche-Comté (DREAL 2010). De plus, pour ces deux molécules, il est fortement probable que les méthodes analytiques sous-estiment les quantifications (Freuze *et al.* 2007). Il n'est pas toujours aisé de comparer les données dans le temps, du fait de

l'évolution des méthodes analytiques, tant en termes d'amélioration des limites de quantification (LQ) qu'en termes d'augmentation du nombre de molécules recherchées (DREAL 2010). La mise en place de la directive cadre sur l'eau en 2000 (directive n°2000/60/CE) a conduit à de nouveaux critères d'évaluation de la qualité des eaux, notamment en ce qui concerne les pesticides, qui ont été intégrés dans les programmes de surveillance à partir de 2007. Cela a consisté, par exemple, à fixer des normes de qualité environnementales (NQE), restreintes pour les **eaux de surface** à certains pesticides, considérés comme les plus préoccupants (18 substances concernées mais aucun fongicide). Il ressort du dernier rapport sur la qualité des eaux françaises (SOeS 2010) que 200 stations sur les 1822 étudiées sont déclassées en raison d'un dépassement des NQE par au moins un des 18 pesticides. La majorité des stations déclassées est située en île de France et dans la région Nord-Pas-de-Calais. Cependant, les deux-tiers des substances les plus rencontrées ne disposent pas de NQE. Le glyphosate et l'AMPA en font partie ainsi que l'atrazine, dont l'usage est interdit depuis 2003. Concernant les **eaux souterraines**, tous les pesticides recherchés disposent d'une norme de qualité fixée à 0,1 µg l^{-1} par substance et 0,5 µg l^{-1} pour la somme des pesticides sur une station. Si l'un de ces deux critères n'est pas respecté, la station est déclassée. En 2007, 82,2% des points de mesure respectaient les normes de qualité. Les molécules les plus fréquemment quantifiées dans les eaux souterraines sont les substances interdites et les métabolites en raison des temps de résidence plus importants. La contamination des eaux côtières est moindre et également moins bien renseignée ; cependant certaines études démontrent la présence d'herbicides (comme l'atrazine) et de fongicides (comme le dicloran) dans le delta du Rhône (Readman *et al.* 1993; Readman *et al.* 1997).

I.1.2.2 L'atmosphère

Comme décrit sur la Figure I.1, les pesticides atteignent l'atmosphère par différents processus : la volatilisation lors de l'application, la revolatilisation de post-application à partir du sol et des feuilles des végétaux et les phénomènes de dérive (Briand *et al.* 2002). Il est considéré qu'environ 30 à 50% des quantités appliquées se retrouvent dans l'air suivant les caractéristiques physico-chimiques des produits, l'équipement et les techniques d'application, les conditions météorologiques (notamment le vent et la température) et les précautions de l'opérateur (Gil et Sinfort 2005). Par exemple, (i) plus les substances actives du produit sont volatiles (pression de vapeur et constante de Henry élevées), (ii) plus les buses d'application vont former des gouttelettes fines, (iii) plus la température est élevée (favorisant

l'évaporation) et (iv) plus le vent est fort, alors plus les molécules vont être transportées loin des zones de culture et vont être présentes dans l'atmosphère sur des distances et à des altitudes importantes.

De nombreuses études ont été entreprises depuis les années 1980 (notamment par les AASQA, associations agrées pour la surveillance de la qualité de l'air), démontrant que les pesticides sont présents dans toutes les phases atmosphériques (gazeuse, liquide ou particulaire)(Millet *et al.* 1997) et ce, même pour des molécules interdites d'usage depuis de nombreuses années comme le lindane, interdit depuis 1998 (Aubertot *et al.* 2005; CORPEN 2007; Scheyer *et al.* 2008). Compte tenu du coût élevé des analyses et du nombre important de molécules utilisées, seulement 46 substances en moyenne sont recherchées pendant les campagnes de prélèvements. Depuis 2001, il est estimé que 186 substances ont été recherchées par les différentes AASQA régionales, dont 68% détectées (Bouvier 2009). Parmi celles-ci, 24% ont des concentrations supérieures à 10 ng m^{-3} (comme par exemple le folpel, fongicide très utilisé pour la protection de la vigne). Un autre rapport de l'Institut de Veille Sanitaire (INVS) sur une étude effectuée en Champagne-Ardenne durant les périodes de traitement, montre que le folpel est retrouvé en grandes quantités dans l'air tandis que le cymoxanil et l'azoxystrobine, également appliqués en quantités importantes, le sont moins (Coignard et Lorente 2006). En dehors des périodes de traitement, seules quelques molécules sont détectées dans l'air et à des concentrations beaucoup plus faibles. Certaines molécules sont très peu recherchées, du fait de méthodes d'extraction et d'analyse complexes. C'est le cas par exemple du glyphosate. Seule une AASQA (ATMO Nord-Pas-de-Calais) l'a mesuré lors de deux campagnes de prélèvements et l'a détecté dans seulement 14% des échantillons et à des concentrations proches de la LQ (CORPEN 2007). En revanche, une étude conduite aux Etats-Unis démontre la présence du glyphosate dans 60% des échantillons d'air analysés durant la pleine saison et à des concentrations jusqu'à 9,1 ng m^{-3} (Chang *et al.* 2011).

De manière générale, les concentrations en pesticides dans l'atmosphère sont plus importantes pour des pesticides ayant des fortes propriétés volatiles, en zones agricoles et durant les périodes de traitement (CORPEN 2007; Scheyer *et al.* 2007; Schummer *et al.* 2010).

I.1.2.3 Le sol

La contamination du sol par les pesticides ne bénéficie pas de dispositifs de caractérisation comme c'est le cas pour l'eau et l'air. Les données dont on dispose proviennent soit d'études

isolées, réalisées sur de petits secteurs, soit des dossiers d'AMM qui discutent notamment de la persistance des substances dans les sols. Il existe cependant le Réseau de Mesures de la Qualité des Sols (RMQS), dont l'objectif est de détecter de façon précoce l'apparition et les tendances de la dégradation de l'état des sols en mesurant un certain nombre de paramètres physiques et chimiques (Jolivet *et al.* 2006). Si des analyses de métaux lourds (tels que le cadmium, le plomb, le zinc, le Cu) sont obligatoires, celles de pesticides sont limitées : une étude a cependant réalisé, dans le cadre de ce programme, la cartographie des concentrations en lindane dans les sols du Nord de la France (Villanneau *et al*. 2009). Une proposition de directive cadre sur la protection des sols a été élaborée par la commission européenne en 2006 (EC 2006a). Cette directive pourrait instaurer des critères de qualité pour les sols, comme cela se pratique pour l'eau. Bien qu'il ne soit pas encore précisé si les pesticides seront pris en compte pour la détermination de ces critères, une évolution importante est en cours dans le domaine de l'évaluation de la qualité des sols. Cependant, actuellement, il n'existe ni valeur seuil concernant les sols, ni bases de données ou suivis annuels de la contamination réelle par les pesticides. La plupart du temps, les concentrations dans les sols sont estimées à partir des doses d'application à l'hectare, de la fréquence des applications, du pourcentage d'interception par la végétation, de la DT50 (temps nécessaire pour que la molécule se dégrade de moitié), de la densité du sol et de la profondeur de sol dans laquelle la molécule va se distribuer (généralement estimée à 5 cm, EC 2002a; EFSA 2009b). Ainsi, l'European soil database présente des cartes européennes d'estimation de la contamination annuelle de sols agricoles par les herbicides (sans distinction de molécules) par type d'usage en s'appuyant sur la moyenne des taux d'application annuels, les propriétés de dégradation des substances et les moyennes de températures (Figure I.2).

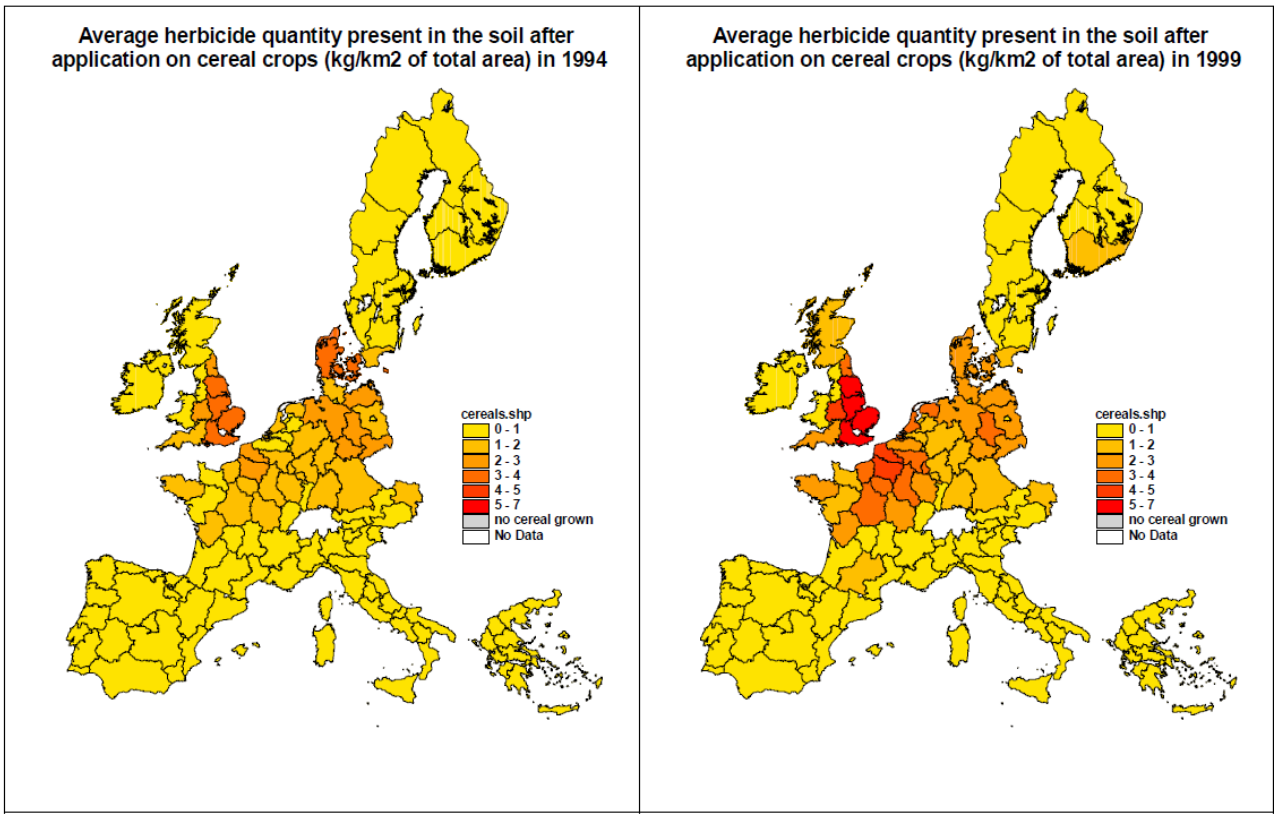


Figure I.2. Concentrations moyennes estimées (en kg km^{-2}) d'herbicides dans les sols de cultures céréalières en 1994 (à gauche) et 1999 (à droite) pour l'Europe. IRENA Indicator Fact Sheet (http://eusoils.jrc.ec.europa.eu/library/themes/contamination/irena.html).

En revanche, des référentiels existant pour la contamination des sols par les métaux (BDAT, http://www.gissol.fr/programme/rmqs/rmqs.php), il est plus aisé de caractériser les contaminations résultant de l'usage de pesticides formulés à base de Cu, comme la Bouillie Bordelaise, pour lesquels des données d'accumulation de Cu dans les sols jusqu'à 3200 mg kg^{-1} sont trouvées (Mirlean *et al.* 2007).

Différents paramètres modulent le devenir des pesticides dans les sols. Ils peuvent être présents sous forme soluble dans l'eau du sol, dans la phase gazeuse ou adsorbés aux particules de sol. Les propriétés physico-chimiques des molécules, ainsi que les caractéristiques propres au sol, vont jouer sur cette répartition. Pour décrire la répartition d'une molécule dans un sol, on utilise le coefficient de distribution entre phase solide et phase liquide du sol (*Kd*), qui est défini par l'équation suivante :

$$Kd = \frac{x/m}{Ce} \qquad (1)$$

où *x/m* est la quantité de polluant (*x*) adsorbée sur une masse de sol (*m*) et *Ce* est la concentration de polluant dans la solution, en équilibre avec la phase adsorbée. Plus généralement, c'est le coéfficient de partage carbone organique/eau (K_{oc}) qui est utilisé :

$$K_{oc} = \frac{Kd \times 100}{\%C} \qquad (2)$$

où *%C* est le pourcentage de carbone organique par masse de terre sèche.

Plus le K_{oc} d'une substance sera grand, plus celle-ci aura tendance à s'adsorber sur les particules organiques ou les argiles du sol par exemple, et donc à être moins mobile. Il ne faut cependant pas considérer le K_{oc} comme une valeur constante pour un pesticide donné. En effet, cette valeur varie avec les propriétés du sol. La plupart des pesticides ont des valeurs de K_{oc} comprises entre 100 et 10000 cm^3 g^{-1} (base de données Agritox, Aubertot *et al.* 2005). Dans ce concept, la matière organique d'un sol ou d'un sédiment joue un rôle analogue à celui d'un solvant non miscible à l'eau. Cela a conduit à utiliser le coefficient de partage octanol/eau (K_{ow}), qui définit l'affinité plus ou moins importante d'une molécule pour la phase aqueuse, pour prédire la capacité de sorption des substances organiques dans les sols et les sédiments (Aubertot *et al.* 2005).

En plus des paramètres favorisant ou non leur mobilité dans le sol, les pesticides organiques vont être dégradés par des processus abiotiques (photolyse, Mansour *et al.* 1997; Burrows *et al.* 2002) et/ou métabolisés par des processus biologiques (par les microorganismes du sol, Mougin *et al.* 2009), qui vont déterminer la DT50 du composé. Celle-ci peut varier de quelques jours ($DT50_{glyphosate}$ = 4-180 jours) à plusieurs années suivant la molécule ($DT50_{diquat}$ = 10-20 ans). La DT50 va également varier pour une même molécule suivant le type de sol, qui sera plus ou moins favorable à la transformation. Les métabolites formés vont à leur tour être dégradés de façon plus ou moins rapide, la dégradation totale d'un composé se traduisant par la transformation du carbone organique en CO_2. Les pesticides vont ainsi être définis comme plus ou moins persistants dans un sol selon leur temps de dégradation.

Cette contamination des pesticides généralisée à tous les compartiments de l'écosystème représente un risque potentiel complexe pour les organismes vivants, dont l'homme, soit directement, soit par le biais des aliments qu'il consomme. Les effets des pesticides sur la santé humaine ont été reconnus, et le lien entre leur utilisation et l'apparition de cancers a été établi dans de récentes études (Landau-Ossondo *et al.* 2009). Pour ce qui concerne la contamination des denrées alimentaires par les pesticides, l'European Food Safety Authority

(EFSA) publie un rapport annuel. L'étude de 2007 (EFSA 2009a) a concerné environ 350 produits de consommation différents avec la recherche de 870 pesticides sur un total de 74305 échantillons. Les résultats indiquent que 46,4% des échantillons contenaient au moins un pesticide et 4% d'entres eux dépassaient les LMR, principalement dans les fruits et les légumes avec une forte incidence pour les aliments d'origine importée. La cause identifiée du dépassement des LMR est majoritairement due à un non-respect des bonnes pratiques agricoles. Au total, 358 pesticides ont été détectés. A titre d'exemple, le pesticide le plus souvent retrouvé est le chlorpyrifos, un insecticide principalement utilisé sur les arbres fruitiers (détecté 4195 fois sur environ 60000 échantillons). On peut également citer le glyphosate, herbicide très utilisé, qui a été détecté 39 fois sur environ 400 échantillons.

Une autre étude, réalisée par le PAN (Pesticide Action Network Europe) et le MDRGF (Mouvement pour le Droit et le Respect des Générations Futures), a recherché la présence de pesticides dans 40 bouteilles de vin rouge provenant du monde entier (PAN-Europe et MDRGF 2008). Il en ressort que 100% des vins provenant de l'agriculture conventionnelle sont contaminés mais aucun ne dépasse les LMR fixées pour le raisin (il n'existe pas de LMR propre au vin) bien que certaines bouteilles de vin aient des concentrations 5200 fois supérieures aux LMR fixées pour l'eau potable (0,1 $\mu g\ l^{-1}$ pour un pesticide et 0,5 $\mu g\ l^{-1}$ pour la totalité des pesticides). Concernant les vins provenant de l'agriculture biologique, seule une bouteille présentait une contamination en pesticides, probablement due à la dérive de produits provenant de cultures proches.

Aussi, conscientes des problèmes liés à l'utilisation des pesticides, que ce soit pour l'environnement ou pour l'homme, les instances européennes et françaises ont entrepris de gros efforts depuis quelques années pour apporter des informations sur toxicité des pesticides et leur présence dans divers milieux, et pour proposer des solutions envisageables pour limiter et réduire leur utilisation. On peut citer par exemple, le PIRRP (Plan Interministériel de Réduction des Risques liés aux Pesticides) 2006-2009, le plan Ecophyto 2018 et le « paquet pesticides » qui a abouti à la création de la directive cadre pesticide et du règlement 1107/2009/CE remplaçant et modifiant la directive 91/414/CE. Sur la grande diversité de molécules existantes (voir les bases de données agricoles, telles que Agritox, e-phy, Footprint), beaucoup d'efforts d'évaluation sont réalisés (http://dar.efsa.europa.eu/dar-web/provision). Cependant, du fait de la multiplicité des techniques et des méthodes de suivi nécessaires pour évaluer leur innocuité, et de la grande diversité des caractéristiques physico-chimiques des molécules, les risques environnementaux liés à leur utilisation ne peuvent pas

totalement être évités. Parmi cette multitude de substances, nous en avons retenu une dizaine dans notre étude.

I.1.3 Les pesticides étudiés

Dans nos travaux, il a été choisi d'étudier l'ensemble des pesticides appliqués lors d'un cycle cultural sur une parcelle de vigne. Le propriétaire de la vigne avec lequel nous avons collaboré travaille en production intégrée. En pratique, pour ce qui concerne les traitements, cela se traduit par le recours préférentiel à des moyens de lutte biologique, par l'observation des ravageurs et des auxiliaires et de l'état de la vigne, afin de pouvoir limiter et justifier les traitements chimiques (http://www.tyflo.org). Aucun insecticide n'est appliqué sur la parcelle de vigne de Bergbieten (en Alsace). D'autres méthodes sont mises en œuvre comme l'utilisation de capsules de phéromones générant la confusion sexuelle chez les lépidoptères mâles (cochylis et eudémis). Au total, ce sont 7 produits différents qui sont appliqués sur une année : 5 fongicides et 2 herbicides. Le Tableau I.1 présente les **8 pesticides** avec lesquels nous avons travaillé, le Bypass® ayant été appliqué en 2007 et remplacé par le Roundup® en 2008.

Tableau I.1. Description des 8 pesticides étudiés dans la thèse.

Nom de la formulation commerciale	Nature	Société	Composition (substance(s) active(s), s.a.)	Mode d'action chez les organismes cibles	Dose à l'hectare
Bouillie bordelaise RSR® Disperss®	Fongicide	Cerexagri	Cuivre métal (20%) sous forme de sulfate de cuivre	Inhibition de la germination des spores	5,35 kg
Thiovit® Jet micro billes	Fongicide	Syngenta Agro	Soufre (80%)	Inhibition de la germination des spores	5,35 kg
Cabrio® Top	Fongicide	BASF Agro	Métirame-Zinc (55%) Pyraclostrobine (5%)	Inhibition de la germination des spores Inhibition du complexe mitochondrial III	1,78 kg
Valiant® Flash	Fongicide	Bayer Cropsciences	Cymoxanil (4%) Folpel (25%) Fosétyl-Aluminium (50%)	Action sur la formation des parois cellulaires Inhibition de la germination des spores Stimulateur des réactions de défense des plantes	1,8 kg
Corail®	Fongicide	Bayer Cropsciences	Tébuconazole (250 g l^{-1})	Inhibition de la 14-α deméthylation des stérols	0,24 l
Roundup® Flash	Herbicide	Monsanto	Glyphosate sous forme de sel d'isopropylamine (450 g l^{-1})	Inhibition de la synthèse des acides aminés aromatiques	4 l
Bypass®	Herbicide	Dow Agrosciences	Glyphosate sous forme de sel d'isopropylamine (360 g l^{-1})		6 l
Basta® F1	Herbicide	Avantis Cropsciences	Glufosinate Ammonium (150 g l^{-1})	Inhibition de la synthèse de la glutamine	5 l

I.1.3.1 Caractéristiques physico-chimiques des substances actives

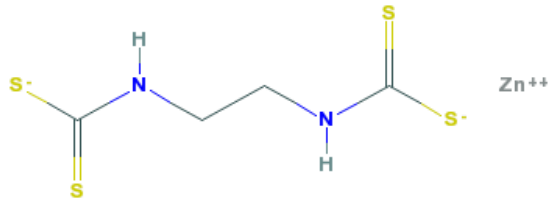
Les principales caractéristiques physico-chimiques des **10 substances actives** employées dont 8 de nature organique (Tableau I.1.), sont présentées dans le tableau I.2. Elles sont importantes à prendre en compte pour caractériser et comprendre le devenir de ces molécules dans les différents compartiments de l'environnement, mais également pour le développement de méthodes analytiques permettant leur séparation et leur identification dans différentes matrices biologiques. La formule et le poids moléculaire vont être importants à considérer en spectrométrie de masse. Le K_{ow} ainsi que la solubilité dans l'eau vont permettre de préciser le solvant adapté pour l'extraction des molécules ou l'analyse et renseigner sur le potentiel d'accumulation dans les tissus. Les constantes de Henry et les pressions de vapeur vont apporter des informations sur le comportement dans l'air mais aussi sur le choix du type de chromatographie pour l'analyse des composés. Enfin, le K_{oc} et la DT50 vont renseigner sur le comportement des substances dans le sol et donc également sur le choix des méthodes d'extraction à privilégier.

La Figure I.3 présente les structures chimiques de chaque molécule.

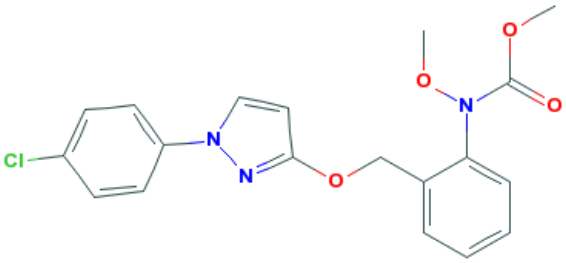
Tableau I.2. Caractéristiques physico-chimiques des 8 molécules organiques utilisées (obtenues à partir des bases de données Agritox, PubChem et Footprint). Pour le K_{oc} et la DT50, un intervalle de valeurs est donné, représentant la variation observée suivant le type de sol.

Substance	Nom chimique (IUCPA)	Numéro CAS	Famille chimique	Poids moléculaire	Solubilité dans l'eau (mg l^{-1})	Pression de vapeur (Pa) à 25°C	Constante de Henry (Pa m^{-3} mol^{-1}) à 25°C	Log K_{ow}	K_{oc} (cm^3 g^{-1})	DT50 (jours)
Métirame-Zn	zinc ammoniate ethylenebis(dithiocarbamate) - poly(ethylenethiuram disulfide)	9006-42-2	Carbamate	1088,6	2	$<1.10^{-5}$	$<5,4.10^{-3}$	1,76	500000	1-2,5
Pyraclostrobine	methyl 2-[1-(4-chlorophenyl)pyrazol-3-yloxymethyl]-N-methoxycarbanilate	175013-18-0	Strobilurine	387,82	1,9	$2,6.10^{-8}$	$5,3.10^{-6}$	3,99	11100	12-120
Cymoxanil	1-[2-Cyano-2-(methoxyimino)acetyl]-3-ethyluree	57966-95-7	Cyanoacétamide	198,18	780	$1,5.10^{-4}$	$3,8.10^{-5}$	0,67	38-238	1-14
Folpel	N-[(trichloromethyl)thio]phtalimide	133-07-3	Dicarboximide	296,56	0,8	$2,1.10^{-4}$	8.10^{-3}	3,11	304	0,2-16,2
Fosétyl-Al	tris(O-ethylphosphonate) d'aluminium	39148-24-8	Phosphonate	354,1	111,3	1.10^{-7}	$3,2.10^{-10}$	-2,11	1705	<1
Tébuconazole	(RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol	107534-96-3	Triazole	307,81	38	$1,3.10^{-6}$	1.10^{-5}	3,7	803-1251	>365
Glyphosate	N-(Phosphonomethyl)glycine	1071-83-6	Amino-phosphonate (glycine)	169,08	10500	$1,3.10^{-5}$	$2,1.10^{-7}$	-3,2	884-50660	4-180
Glufosinate ammonium	ammonium (2RS)-2-amino-4-(methylphosphinato)butyric acid	77182-82-2	Amino-phosphinate (acide phosphinique)	198,1	>500000	$3,1.10^{-5}$	$4,5.10^{-9}$	-4,01	10-352	4-42

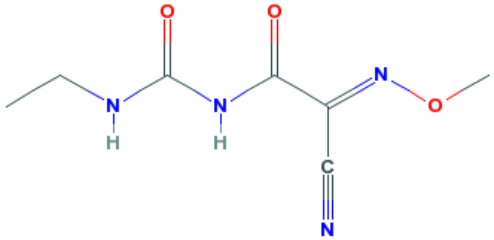
Metirame-Zn



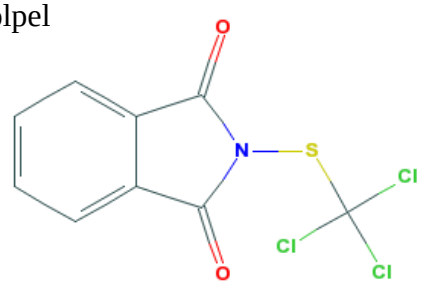
Pyraclostrobine



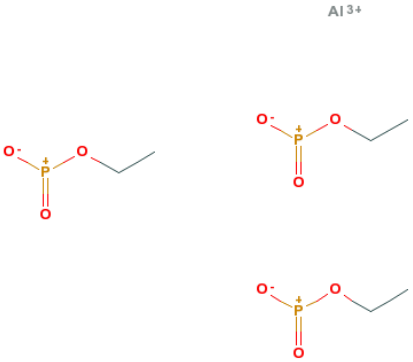
Cymoxanil



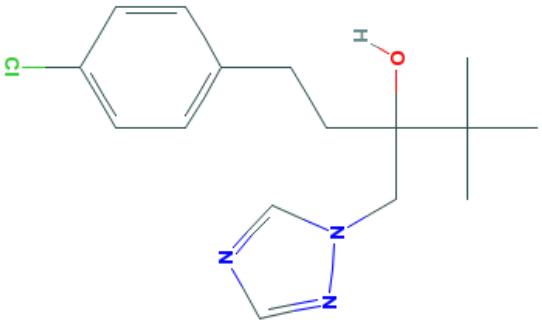
Folpel



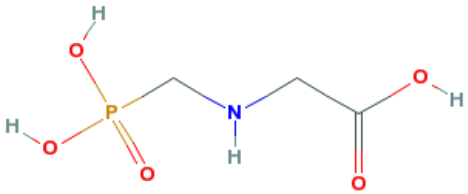
Fosétyl-Al



Tébuconazole



Glyphosate



Glufosinate

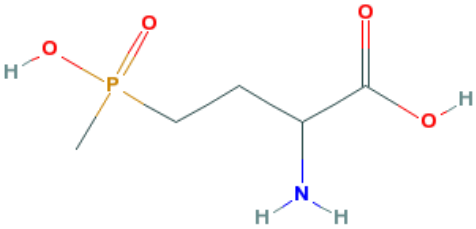


Figure I.3. Structures chimiques des pesticides étudiés (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

I.1.3.2 Dépôts et dérive après application

Certaines conditions environnementales et propriétés des substances vont contrôler les **dépôts** des molécules au sol ainsi que leur **dérive**. Les fongicides, pulvérisés sur les feuilles de vigne, ne devraient théoriquement pas conduire à des dépôts au sol. Cependant, les conditions météorologiques, le type de pulvérisation utilisé et les propriétés intrinsèques des molécules peuvent moduler ces dépôts. Dans le cas des herbicides, la cible visée étant la végétation au sol, les dépôts attendus devraient approcher 100% de la dose appliquée mais là aussi, les mêmes facteurs que pour les fongicides vont contrôler ces dépôts. Une étude de Carlsen *et al.* (2006b) a mesuré entre 0,1 et 9% de dépôt au sol d'herbicides (parmi lesquels la pendimethaline, le prosulfocarb, le métamitron et l'éthofumésate) au niveau de la zone d'application et entre 0,02 et 4% pour des zones éloignées de plus de 2 m de la zone d'application, suivant la substance étudiée, la taille des gouttelettes et les conditions météorologiques. Vischetti *et al.* (2008) ont mesuré les dépôts au sol de chlorpyrifos (insecticide) et de métalaxil (fongicide) appliqués sur la vigne, mais seulement ceux dus à la dérive, c'est-à-dire à partir de 3 m de la parcelle, et trouvent des pourcentages de l'ordre de 6% pour le chlorpyrifos et 1,6% pour le métalaxil. Pergher *et al.* (1997) ont simulé une application de pesticides dans la vigne à l'aide d'un traceur et mesurent des dépôts au sol de l'ordre de 20-27% selon le type de pulvérisateur.

Aucune étude en conditions réelles d'application ne rapporte ce type de données pour les molécules étudiées dans cette thèse. Les concentrations retombant au sol constituent pourtant la première exposition aux pesticides pour les organismes évoluant sur le sol. Les pesticides vont ensuite interagir avec les différentes phases du sol.

I.1.3.3 Comportement et devenir dans le sol

L'adsorption aux particules du sol est un processus clé qui va influencer la répartition des pesticides entre les phases liquide et solide du sol et donc agir sur leur mobilité à travers le profil du sol, sur leur dégradation, mais également sur leur biodisponibilité (conditionnant ainsi le transfert des molécules aux organismes du sol et leurs effets). Les paramètres corrélés à ces processus sont entre autres, la solubilité dans l'eau, le K_{ow} et le K_{oc} (Komárek *et al.* 2010).

Concernant le métirame-Zn, la pyraclostrobine, le folpel et le fosétyl-Al, les seules données dont on dispose sur leur comportement dans le sol sont présentées dans le Tableau I.2. Un classement de mobilité et de persistance peut être réalisé pour chaque molécule selon les critères définis dans la revue de Komarek *et al.* (2010). Le **métirame-Zn** n'est pas mobile (K_{oc} très élevé, solubilité faible) et très peu persistant. La **pyraclostrobine** est également peu mobile dans le sol mais beaucoup plus persistante. Le **cymoxanil** est modérément mobile mais un risque de lixiviation vers les aquifères existe du fait de sa forte solubilité et de son K_{oc} relativement faible. Il est cependant peu persistant. Le **folpel** est peu mobile, très faiblement soluble et se dégrade rapidement. Enfin le **fosétyl-Al** est le composé le moins persistant de tous, indiquant que les autres facteurs vont peu jouer sur son comportement dans le sol du fait de sa très rapide dégradation.

Le **tébuconazole** est le plus persistant des pesticides étudiés (Tableau I.2) avec une DT50 supérieure à un an. Des publications récentes proposent également des valeurs de persistance plus faibles, de 49 jours (Strickland *et al.* 2004) et 27 jours (White *et al.* 2010) pour un sol limoneux sableux. Une étude montre qu'entre 71,5% et 83,7% de ce composé sont encore présents dans le sol 3 mois après son dépôt, avec un taux de dégradation plus rapide dans le sol avec le taux de matière organique le plus élevé (Bending *et al.* 2007). Cette observation n'est pas en accord avec l'hypothèse proposée dans la revue de Komarek *et al.* (2010). Ces auteurs supposent que la dégradation du tébuconazole est significativement influencée par le pourcentage de carbone organique, mais de façon inversée : le tébuconazole étant fortement adsorbé à la matière organique, un faible pourcentage de carbone organique dans le sol contribuerait à diminuer l'adsorption de ce composé et donc à induire sa dégradation. Le taux d'argile tend également à renforcer la quantité de tébuconazole adsorbée aux particules du sol, qui peut varier entre 28 et 74% (Komárek *et al.* 2010). Les valeurs de K_{oc} varient entre 803 et 1251 $cm^3\ g^{-1}$ suivant le type de sol (Tableau I.2).

D'après les informations accessibles dans les bases de données consultées pour construire le Tableau I.2, le **glyphosate** est très soluble dans l'eau (>10 000 mg l^{-1}) et a une forte affinité pour la phase liquide par rapport à la phase organique, cependant dans certains sols, sa valeur de K_{oc} très élevée indique qu'il est quasiment non mobile (quand Koc > 4000, Komárek *et al.* 2010). Les études sur le comportement du glyphosate, herbicide le plus utilisé au monde, montrent généralement une forte adsorption de cette molécule au sol et une faible mobilité vers les horizons inférieurs et les eaux souterraines. Une étude réalisée par Monsanto indique

que le glyphosate et son métabolite l'AMPA ne sont pas présents à des concentrations supérieures à 0,05 mg kg^{-1} en dessous de 30 cm de profondeur (EC et ECB 2000), suggérant une faible mobilité. De même, Al Rajab *et al.* (2008) ont déterminé une adsorption du glyphosate au sol d'environ 80% après équilibration entre la solution et le sol. Cependant, une étude réalisée par Veiga *et al.* (2001) a démontré une mobilité du glyphosate et de l'AMPA à travers les horizons pouvant sans doute être expliquée par la forte porosité du sol et sa faible perméabilité. Landry *et al.* (2005) ont identifié la présence de glyphosate et d'AMPA dans des lixiviats de sol de vigne après application et en déduisent que, bien que les concentrations soient faibles, ce pesticide peut être présent dans les eaux souterraines. D'après Gerritse *et al.* (1996), le glyphosate est très adsorbé aux minéraux d'argile et aux oxydes de fer et d'aluminium tandis que la matière organique va diminuer cette adsorption. D'autres auteurs ont montré que les acides humiques et fulviques jouent un rôle important dans l'adsorption du glyphosate et cela de façon plus importante dans un sol sableux que dans un sol argileux, de même qu'à pH neutre plutôt qu'à pH acide (Albers *et al.* 2009). Le glyphosate est considéré comme faiblement à modérément persistant : une amplitude importante de valeurs de DT50 est donnée dans le Tableau I.2 et confirmée par d'autres travaux : entre 1,9 jours (EC et ECB 2000), 14,4 jours (Accinelli *et al.* 2004) et jusqu'à 141,9 jours (EC et ECB 2000). Forlani *et al.* (1999) ont estimé un taux de dégradation linéaire entre 0,14 et 2,37 µmol g^{-1} par jour suivant le type de sol. D'après Tejada (2009), la dégradation du glyphosate est plus rapide dans un sol argileux que dans un sol sableux, du fait de plus importantes activités enzymatiques. Ces auteurs expliquent que l'extraction étant plus difficile dans un sol argileux à cause de la formation de complexes entre les argiles et la molécule, une quantité moindre de glyphosate libre va être présente dans l'extrait ou l'eau du sol, conduisant à une quantité moindre de produits de dégradation comme l'AMPA ou les acides glyoxiliques. De ce fait, ceux-ci consommant une importante quantité d'oxygène pour se dégrader à leur tour en CO_2 et NH_4^+, cet oxygène pourra être d'autant plus utilisé pour les activités enzymatiques favorisant la dégradation du glyphosate. D'autres études infirment cette hypothèse en démontrant que l'augmentation des concentrations en glyphosate ou en AMPA dans le sol s'accompagne d'un enrichissement en phosphate (lyse du groupement phosphonate lors de la dégradation), composé qui lui-même à son tour va stimuler la dégradation du glyphosate (Forlani *et al.* 1999; Veiga *et al.* 2001). L'AMPA est beaucoup plus persistant que son composé parent, avec des valeurs de DT50 comprises entre 131 et 958 jours selon Monsanto (EC et ECB 2000).

Le **glufosinate**, un composé de la même famille chimique que le glyphosate, a des propriétés proches, comme une très forte solubilité dans l'eau et un K_{ow} négatif mais sa plus faible valeur de K_{oc} indique qu'il est modérément mobile (Komárek *et al.* 2010). Après une application de glufosinate, Faber *et al.* (1997) ne détectent ni la molécule mère, ni ses métabolites en dessous de 10 cm de profondeur. Une expérience similaire réalisée par Schmidt et Butzbach (2003) a montré que le glufosinate était détecté dans l'eau du sol jusqu'à 150 cm mais seulement jusqu'à 30 cm pour des concentrations supérieures à 0,1 µg l^{-1}. Pour ces mêmes concentrations, les métabolites sont détectés dans les 30 premiers cm pour le MPA (acide 2-methylphosphinyl-acétique) et jusqu'à 120 cm pour le MPP (acide 3-methylphosphinyl-propionique). Une étude de Siimes *et al.* (2006) montre que le glufosinate est principalement détecté dans les 3 premiers cm, bien qu'on puisse le détecter à de faibles concentrations 4 mois après l'application jusqu'à 1 m de profondeur. Ces auteurs ont également décelé la présence de cet herbicide dans les écoulements de surface, au printemps suivant l'application estivale, démontrant le rôle du gel et du dégel et de la fonte des neiges sur les processus de sorption et de désorption. Généralement, le glufosinate n'est pas détecté dans les eaux souterraines malgré sa solubilité élevée, du fait d'une dégradation rapide (Faber *et al.* 1997; Siimes *et al.* 2006). Sa DT50 est variable selon les sols : de 4,3 jours dans un sol forestier avec un fort taux de matière organique (Faber *et al.* 1997), à une semaine dans un sol sableux-limoneux (Siimes *et al.* 2006) et à 6,2 et 9,2 jours respectivement dans des sols limoneux et sableux-limoneux (Accinelli *et al.* 2004). Il est ainsi classé comme faiblement persistant (Tableau I.2.).

Le comportement du **cuivre** dans les sols de vigne a fait l'objet d'une synthèse par Komarek *et al.* (2010). Sa solubilité est très dépendante du pH du sol. Il a tendance à facilement migrer vers les eaux souterraines dans les sols acides. Il s'adsorbe préférentiellement à la matière organique, aux hydroxydes de fer ou de manganèse, et également, mais de façon moindre, aux minéraux argileux, ce qui en fait un des métaux les moins mobiles dans le sol. Cependant, il peut former des complexes avec la matière organique soluble à pH alcalin et de ce fait être plus mobile. Les carbonates du sol vont également jouer sur la mobilité du cuivre en formant des précipités de carbonates de cuivre.

L'utilisation du **soufre** en agriculture pour lutter contre les ravageurs et les maladies n'est pas récente mais c'est avec l'arrivée de l'oïdium au 19ème siècle, maladie dévastatrice de la vigne, que son emploi s'est généralisé (Bernard et Marzin 2010). Le soufre, nutriment

essentiel pour les plantes, est également utilisé sous forme de sulfates dans les engrais. Suivant le type de sol, il peut être immobilisé selon des processus physiques (adsorption aux particules de sol) ou biologiques (microorganismes). Le soufre est moins disponible pour les plantes dans un sol basique avec un fort taux de matière organique (Vong *et al.* 2007).

Il est difficile de classer les molécules étudiées selon leur risque de transfert dans les compartiments de l'environnement car le classement est différent selon que l'on considère la mobilité ou la persistance. Pour certaines des substances organiques étudiées dans ce travail (métirame-Zn, pyraclostrobine, folpel et fosétyl-Al) il existe très peu de données sur leur comportement dans le sol et pour d'autres substances (tébuconazole, glyphosate et glufosinate), les données existantes montrent que ce comportement varie de façon importante suivant la nature du sol étudié. Il est donc indispensable d'acquérir de plus amples connaissances sur le devenir après application de ces molécules très utilisées en milieu viticole, en surface et dans le sol étudié dans notre étude.

I.1.3.4 Méthodes d'analyse des pesticides dans les dépôts et dans les sols

Afin de pouvoir caractériser l'exposition des pesticides aux organismes, à partir du sol et de sa surface par exemple, il est nécessaire de disposer de méthodes d'extraction et d'analyse. La collecte des dépôts de pesticides (au sol ou à différents niveaux au-dessus du sol) lors de l'application s'effectue généralement à l'aide de supports, « collecteur passif » (Gil *et al.* 2007) ou « dosimètre passif » (Carlsen *et al.* 2006), sur lesquels se déposent les gouttelettes. Les échantillons sont ensuite récupérés et dilués dans un solvant approprié et se présentent directement sous forme de **matrices liquides**.

Pour les **matrices solides**, telles que le sol, il est d'abord nécessaire de procéder à une extraction afin d'obtenir un extrait liquide. Pour cela, la matrice doit être mise en contact avec un solvant adapté à la molécule étudiée (solvant aqueux ou organique suivant la solubilité de la molécule dans l'eau et son K_{ow} ; Tableau I.2). Plusieurs techniques d'extraction peuvent être appliquées : agitation manuelle ou mécanique, Soxhlet, extraction accélérée par solvant (ASE), extraction assistée par micro-ondes (MAE), extraction aux ultra-sons (USE), extraction sur phase solide (SPE), micro-extraction sur phase solide (SPME), extraction par dispersion de la matrice sur phase solide (MSPDE), extraction liquide-liquide… Le compromis entre le coût (utilisation réduite de consommables et de solvants) et le rendement

doit être recherché. Une étape de purification peut ensuite être nécessaire, par simple centrifugation ou filtration, par SPE ou encore par chromatographie préparative.

Afin d'augmenter la concentration des molécules à analyser dans l'échantillon (extrait de dépôt ou de sol) et permettre une quantification plus fine, une étape de concentration est souvent nécessaire : par évaporation ou SPE suivant le solvant dans lequel est contenue la molécule. Enfin, avant de passer à l'analyse *sensu stricto*, il est parfois nécessaire de conditionner la molécule pour permettre sa détection : réajustement du pH par exemple et/ou étape de dérivation. La dérivation peut avoir plusieurs finalités (http://www.interchim.com/interchim/inter_intro_bio.htm) :

- réduire les phénomènes d'adsorption de certains produits sur les parois de la colonne,
- diminuer la température d'ébullition par élimination de groupes polaires (OH, NH, NH_2, COOH),
- augmenter la stabilité de certains composés susceptibles de se dégrader,
- augmenter la température d'ébullition afin d'analyser les composés à bas point d'ébullition,
- augmenter le seuil de détection,
- ou encore permettre la détection par ajout d'un groupement fluorescent par exemple.

L'extrait peut ensuite être injecté dans le système analytique.

Un nombre important de techniques de séparation et de détection existe pour l'analyse des pesticides. Pour la séparation, les plus utilisées sont la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie en phase liquide (LC ou HPLC), le principe étant que les molécules sont entrainées dans la phase mobile (gaz ou solvant) jusqu'à la colonne qui contient la phase stationnaire qui va permettre la séparation. Les composés sont plus ou moins retenus sur la phase stationnaire selon l'affinité qu'ils ont avec elle. Les principales techniques de chromatographie liquide sont la chromatographie de partage (affinité entre la phase stationnaire et la phase mobile selon la polarité des molécules) en phase inverse (apolaire et hydrophobe) ou en phase normale (polaire et hydrophile) et la chromatographie ionique (affinité entre la phase stationnaire et la phase mobile selon la charge des molécules). Une fois séparées, les molécules arrivent une par une dans le détecteur dont les principaux sont le spectromètre de masse (les molécules sont fragmentées par un bombardement d'électrons et caractérisées par le rapport masse sur charge des différents fragments) simple (MS) ou en tandem (MS/MS), le fluorimètre (les molécules fluorescentes sont détectées pour une longueur d'onde donnée) et le spectromètre Ultraviolet-Visible (UV).

Le Tableau I.3 présente différentes méthodes relevées dans la littérature pour l'extraction et l'analyse des pesticides étudiés et montre que plusieurs techniques peuvent être appliquées sur un même composé. Des études présentant des analyses dans des produits de type végétal (comme les fruits) sont également citées dans le Tableau I.3 afin d'identifier les techniques de séparation et de détection employées pour les molécules d'intérêt. Lorsqu'ils sont donnés, les rendements d'extraction et les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) de la méthode d'analyse sont présentés. La LOD est la plus petite concentration produisant un signal détectable statistiquement différent de celui produit par un « blanc » tandis que la LOQ est la plus petite concentration que la méthode permet de doser avec un degré acceptable d'exactitude et de précision.

Il n'existe pas de techniques d'extraction et d'analyse dans les sols pour plusieurs des molécules étudiées dans cette thèse.

Tableau I.3. Exemples de méthodes d'extraction et d'analyse des composés étudiés, dans les sols ou les végétaux.

Molécule recherchée	Nature de la matrice	Type d'extraction	Méthode d'analyse	Rendement sur matrice	LD	Auteurs
Carbamates (métirame-Zn)	Fruits (pomme, banane, orange…)	Dégradation à l'acide	Détermination des complexes Cu-CS_2 par spectrophotométrie	ND	0,1 mg kg^{-1} (LQ)	(Caldas *et al.* 2004)
Pyraclostrobine	Fruit (mangue)	SPME en immersion directe (50°C pendant 30 min sous agitation) dans mélange eau/ isopropylalcool	GC-MS	77,6 -116%	5 µg kg^{-1}	(Menezes Filho *et al.* 2010)
Cymoxanil	sol	MAE dans acétonitrile (10 ml) pendant 5 min à 90°C	HPLC-ED (détection ampérométrique)	82,3-100,3%	30 µg kg^{-1}	(de Lopez Sabando *et al.* 2002)
		Mélange dans acétone SPE (cartouche C18)	HPLC-UV	85%	ND	(Fidente 2005)
Folpel Fosétyl-Al	sol	ASE (acétone) Centrifugation Concentration par évaporation	GC-MS	75-90%	12,5 µg kg^{-1}	(Schreck *et al.* 2008)
Tébuconazole	sol	Agitation 1h dans méthanol Filtration Concentration par évaporation	HPLC-MS	93%	ND	(White *et al.* 2010)
Glyphosate	sol	Agitation dans méthanol (1h) Evaporation air libre (24h) USE dans tampon phosphate (1h) Filtration / Evaporation	Chromatographie en couches minces	44%	ND	(Babic *et al.* 2005)
Glyphosate AMPA	sol	Agitation dans potasse (2h) Centrifugation (30min) Ajustement pH	IC-ICP-MS	92,7% 102,3%	1,5 µg l^{-1} 1 µg l^{-1}	(Chen *et al.* 2009b)
Glufosinate Glyphosate AMPA	sol	Agitation dans solution de phosphate de potassium monobasique (12h) Centrifugation (20min) Filtration Dérivation au FMOC-Cl	RP-HPLC-Fluorimétrie	82% 87% 84%	100 µg kg^{-1} 200 µg kg^{-1} 50 µg kg^{-1}	(Accinelli *et al.* 2004)
		Agitation dans potasse (30min) Centrifugation (30min) Ajustement pH Dérivation (1 nuit) au FMOC-Cl filtration	LC-ESI-MS/MS	72% 89% 97%	5 µg kg^{-1}	(Ibanez *et al.* 2005)

I.2 Les outils de l'évaluation du risque environnemental des pesticides

I.2.1 Introduction à l'évaluation du risque écotoxicologique

La procédure d'évaluation du risque environnemental *à priori* (c'est à dire avant la mise sur le marché) d'une substance chimique se décompose en quatre étapes (adapté du Technical Guidance Document, EC 2003a) :

- ✓ **L'identification du danger**, qui se traduit par la définition du potentiel intrinsèque de la substance à causer un danger pour l'homme ou l'environnement.
- ✓ **L'évaluation des effets,** qui se traduit par la détermination d'une relation dose-réponse entre la concentration de la substance et les effets induits. A partir de cette relation, on établit la concentration dite « sans effet » pour les organismes ou NOEC ainsi que des paramètres reliant concentration et effet, soit des ECx. Afin de ne pas sous-estimer la toxicité d'une substance, un facteur de sécurité est appliqué aux NOECs ou aux ECx (ce facteur peut varier de 10 à 1000 suivant le nombre de bioessais effectués, le niveau trophique des espèces considérées et le « tier » des bioessais, soit toxicité aiguë ou chronique et soit conditions contrôlées ou *in situ*), et permet ainsi d'établir la concentration prévisible sans effet pour l'environnement ou PNEC.
- ✓ **L'évaluation de l'exposition**, qui se traduit par l'établissement de concentrations prévisibles dans l'environnement (PEC) pour les différents compartiments de l'écosystème : PEC_{air}, PEC_{eau}, $PEC_{sédiment}$, PEC_{sol},…
- ✓ **L'évaluation du risque**, qui se détermine par la probabilité qu'une substance soit présente dans l'environnement à une concentration définie comme étant toxique pour les organismes. Plus généralement, on estime le risque par le calcul du rapport PEC / PNEC, autrement dit si la PEC est supérieure à la PNEC, il existe un risque pour l'environnement.

L'évaluation du risque écotoxicologique d'un pesticide diffère légèrement de l'évaluation du risque classique. Elle est effectuée au cours de la procédure d'inscription d'une substance active à l'annexe I de la directive 91/414/CE.

Afin de déterminer les effets de la substance, plusieurs tests ou bioessais sont réalisés. Il s'agit d'exposer un organisme à des concentrations croissantes du pesticide et d'établir une

relation dose-réponse (effet). On peut ainsi déterminer la NOEC et définir des ECx. De plus en plus, l'approche ECx tend à remplacer la NOEC car préférée par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) et l'ISO (Organisation de Standardisation Internationale)(EC 2002a), parce qu'elle permet de mieux s'affranchir du protocole d'exposition et notamment des concentrations choisies. Les bioessais standardisés permettant de définir la toxicité d'une substance sont classés selon plusieurs critères : le milieu (terrestre *versus* aquatique) et le « tier » (laboratoire *versus* terrain, aiguë *versus* chronique).

L'exposition est ensuite déterminée. Par exemple, la PEC_{sol} d'un pesticide est calculée selon la dose d'application de la substance (exprimée en g ha^{-1}), la fréquence des applications si la substance est considérée comme persistante, le pourcentage d'interception par la végétation, la densité du sol et la distribution verticale de la molécule dans le sol, qui est généralement définie à 5 cm (EC 2002a). Il est également convenu selon la directive 91/414/CE de définir des PEC_{sol} initiales (immédiatement après l'application), à court terme (entre 24h et 4 jours après la dernière application) et à long terme (entre 7 et 100 jours après la dernière application).

L'évaluation du risque est ensuite appliquée sur la formulation du pesticide soit en se basant sur les bioessais de la substance active soit en reconduisant des bioessais sur la formulation. Les ratios toxicité / exposition (TER) sont ensuite définis en divisant les NOECs et ECx de chaque bioessai par la plus forte PEC (PEC initiale ou à court terme suivant l'organisme). Si un risque est estimé (par exemple si TER<5 pour le test de reproduction chez le ver de terre), d'autres tests d'un « tier » supérieur (comme par exemple des essais sur le terrain) peuvent être réalisés ou alors, le produit peut se voir refuser l'AMM. Si l'évaluation du pesticide ne pose pas de risque inacceptable pour l'environnement, le produit peut être autorisé. Il est souvent reconnu que les formulations sont plus toxiques que les ingrédients actifs en raison des adjuvants qui sont ajoutés pour permettre une meilleure pénétration de la molécule active dans le végétal (voir notamment discussion toxicité glyphosate/Roundup® en section I.2.2.2.3). Dans les études de toxicité réalisées pour les AMM, les bioessais sont parfois exécutés uniquement sur la substance active, ne rendant ainsi pas compte de la réelle toxicité du produit. C'est pourquoi sur les fiches de sécurité (FDS), obligatoirement établies pour chaque produit, il est parfois précisé que le test a été réalisé avec une « formulation similaire » ou avec la substance active. Cependant, ces informations ne sont pas toujours indiquées, rendant difficile la compréhension des données de toxicité présentées.

I.2.2 Evaluation des effets des pesticides étudiés

L'évaluation des effets des pesticides étudiés au sein de l'évaluation du risque requiert la réalisation de bioessais standardisés qui sont présentés dans la partie suivante (I.2.2.1) pour les organismes terrestres. Il existe également d'autres bioessais, non standardisés, qui proposent des méthodes pour l'évaluation des effets, comme par exemple des études en laboratoire ou des études de terrain, présentées respectivement dans les parties I.2.2.2 et I.2.2.3 pour chaque molécule étudiée selon le plan suivant :

- ✓ Données d'écotoxicité pour les organismes aquatiques (de façon non exhaustive lorsqu'il n'a pas été trouvé de données pour le milieu terrestre ou pour approcher quelques mécanismes d'action) :
  - ➢ Sur les embryons,
  - ➢ Sur la survie/croissance,
  - ➢ Sur la reproduction.
- ✓ Données d'écotoxicité terrestre :
  - ➢ Sur les embryons,
  - ➢ Sur la survie/croissance,
  - ➢ Sur la reproduction.

  } Pour les organismes évoluant dans le sol, puis ceux de surface

La dernière partie de cette section est consacrée à la bioaccumulation, en relation avec la toxicité des molécules, mais qui peut également constituer un danger pour les organismes non-cibles, par l'intermédiaire du transfert des pesticides au sein des réseaux trophiques (partie I.2.2.4).

I.2.2.1 Les bioessais standardisés d'écotoxicité en milieu terrestre

Pour l'évaluation du risque des substances actives de pesticides, il est requis d'effectuer les tests biologiques suivants (annexe II de la directive 91/414/CE) :

- ✓ Toxicité aiguë sur les oiseaux : détermination de la dose létale par voie orale (Essai n°223, OCDE 2010).
- ✓ Toxicité alimentaire à court terme sur les oiseaux : détermination de la concentration létale par voir orale après 5 jours d'exposition (Essai n°205, OCDE 1984a).

- ✓ Toxicité subchronique et reproduction chez les oiseaux : détermination de la NOEC (Essai n°206, OCDE 1984b).
- ✓ Toxicité aiguë sur les abeilles : détermination de la dose létale par voie orale (Essai n°213, OCDE 1998a) et par voie de contact (Essai n°214, OCDE 1998b).
- ✓ Toxicité létale et sublétale sur les autres arthropodes : détermination de la mortalité (larves, adultes) et des effets sublétaux (fertilité, capacité de parasitisme) sur plusieurs espèces sensibles comme un parasitoïde (*Aphidius rhopalosiphi*) et un acarien prédateur (*Typhlodromus pyri*)(Candolfi *et al.* 2001).
- ✓ Toxicité aiguë sur les vers de terre : détermination de la concentration létale (ISO 11268-1:1993).
- ✓ Toxicité sublétale sur les vers de terre : détermination de la NOEC pour la croissance, la reproduction ou le comportement (ISO 11268-2:1998).
- ✓ Effets sur les microorganismes du sol : détermination des effets sur la transformation de l'azote (Essai n°216, OCDE 2000a) et sur la minéralisation du carbone (Essai n°217, OCDE 2000b).

Ces tests obligatoires sont effectués pour chaque substance active de pesticides et sont rapportés dans les « Draft Assessment Report » (DAR) de chaque molécule que l'on peut se procurer sur le site de l'EFSA. Ces rapports, élaborés pour chaque substance par un pays rapporteur défini (cymoxanil / Autriche ; folpel / Italie ; fosétyl-Al / France ; tébuconazole / Danemark ; glyphosate / Allemagne ; glufosinate / Suède ; cuivre / France; soufre / France) présentent l'évaluation complète de la substance en vue de son inscription à l'annexe I de la directive 91/414/CE. Les DARs du métirame-Zn et de la pyraclostrobine ne sont pas disponibles sur le site de l'EFSA. Les principales informations des DARs peuvent généralement être trouvées dans les bases de données telles qu'Agritox, Footprint ou ESIS. Le Tableau I.4 présente quelques données de toxicité (parmi les tests standardisés pour l'évaluation des effets en milieux aquatique et terrestre) pour les 10 molécules étudiées.

Tableau I.4. Données d'écotoxicité (à partir de bioessais standardisés) des 8 substances actives étudiées (obtenues des bases de données Agritox, Footprint et ESIS).

Substance	Classement écotoxico-logique[1]	Milieu aquatique			Milieu terrestre		
		EC50 Croissance des algues (*Pseudikirchn-eriella subcapitata*[2]) Exposition 72h	EC50 Toxicité aiguë daphnies (*Daphnia magna*) Exposition 48h	NOEC Toxicité chronique poissons (*Oncorhynchus mykiss*) Exposition 28 jours[2]	LD50 par contact abeille (*Apis mellifera*) Exposition 72h (µg abeille^{-1})	LC50 toxicité aiguë vers de terre (*Eisenia foetida*) Exposition 14 jours	NOEC reproduction vers de terre (*Eisenia foetida*) Exposition 8 semaines
Métirame-Zn	-	63 µg l^{-1}	-	22 µg l^{-1}	>80	>1000 mg kg^{-1}	-
Pyraclostrobine	SGH09 H410	320 µg l^{-1}	15,7 µg l^{-1}	4,64 µg l^{-1}	>100	567 mg kg^{-1}	1 l ha^{-1} de formulation
Cymoxanil	SGH09 H410	>5,2 mg l^{-1}	27 mg l^{-1}	0,22 mg l^{-1} (21j)	25	2208 mg kg^{-1}	-
Folpel	SGH09 H400	>10 mg l^{-1} (*Scenedesmus subspicatus*)	0,02 mg l^{-1}	110 µg l^{-1}	>200	>1000 mg kg^{-1}	5,18 mg kg^{-1}
Fosétyl-Al	-	8,6 mg l^{-1} (*Scenedesmus subspicatus*)	>100 mg l^{-1}	100 mg l^{-1}	>100	>1000 mg kg^{-1}	4,16 mg kg^{-1}
Tébuconazole	SGH09 H411	2,83 mg l^{-1}	2,79 mg l^{-1}	0,012 mg l^{-1} (83j)	>83,05	1381 mg kg^{-1}	10 mg kg^{-1}
Glyphosate	SGH09 H411	48 mg l^{-1}	40 mg l^{-1}	150 mg l^{-1} (21j)	>100	>480 mg kg^{-1}	28,79 mg kg^{-1}
Glufosinate	-	-	560-1000 mg l^{-1}	100 mg l^{-1} (21j)	>100	>1000 mg kg^{-1}	-
Cuivre (dans Bouillie Bordelaise)	SGH09 H400 ; H410	0,011 mg l^{-1}	1,87 mg l^{-1}	0,97 mg l^{-1}	> 25,2	155 mg kg^{-1}	15 mg kg^{-1}
Soufre	-	0,063 mg l^{-1} (*Scenedesmus subspicatus*)	> 5000 mg l^{-1}	-	1051	> 2000	-

[1] : Symbole de danger : SGH09 = dangereux pour l'environnement. Mentions de danger : H400 : très toxique pour les organismes aquatiques ; H410 : très toxique pour les organismes aquatiques, entraine des effets néfastes à long terme ; H411 : toxique pour les organismes aquatiques, entraine des effets néfastes à long terme.

[2] : Sauf mention contraire.

Pour l'évaluation du risque des formulations, des tests d'écotoxicité supplémentaires peuvent être effectués, comme par exemple un bioessai sur la détermination des effets sur la reproduction des collemboles (ISO 11267:1999) ou des essais sur le terrain avec les vers de terre (ISO 11268-3:1999b) ou les arthropodes (annexe III de la directive 91/414/CE). Il existe également d'autres bioessais standardisés au niveau français (AFNOR) ou international (ISO) mais qui ne sont pas appliqués (car non obligatoires) dans l'évaluation du risque des pesticides. On peut citer par exemple les normes ISO répertoriées dans la catégorie « qualité du sol » (TC190/SC4, http://www.iso.org/iso/fr/iso_catalogue.htm) : détermination des effets des polluants sur la reproduction et la survie des enchytrés (ISO 16387:2004), détermination de la toxicité aiguë des polluants sur les larves d'insectes (ISO 20963:2005) et détermination des effets des polluants par contamination du sol sur la croissance des escargots juvéniles (ISO 15952:2006).

La plupart des bioessais avec le sol comme matrice d'exposition utilisent un substrat artificiel de référence. Plusieurs travaux ont critiqué l'utilisation de ce substrat qui a tendance à sous-estimer la toxicité des contaminants testés, principalement du fait de son fort pourcentage en matière organique (Amorim *et al.* 2005). En effet, des paramètres tels que les propriétés du sol mais aussi l'espèce et les modes d'exposition, interviennent sur la biodisponibilité d'un contaminant pour un organisme, qui peut être définie comme « la capacité d'une substance à interagir avec le système biologique » ou comme « l'accessibilité d'une substance chimique à l'assimilation et à une possible toxicité » ou encore comme « la fraction d'une substance chimique, qui, à un temps donné, est librement disponible pour franchir la membrane d'un organisme depuis son habitat » (Stokes *et al.* 2005). Il est établi que le pourcentage de matière organique et le pH d'un sol influencent de façon significative la biodisponibilité des contaminants (Crommentuijn *et al.* 1997). Ainsi, selon le type de sol sur lequel est réalisé le bioessai, la toxicité peut être différente. Afin de prendre en compte cette biodisponibilité dans la procédure d'évaluation du risque, et notamment pour les tests avec les vers de terre, comme celui sur la toxicité aiguë (ISO 11268-1:1993), les NOEC/EC50 sont divisées par deux lorsque le log de K_{ow} de la substance est supérieur à 2 (EC 2002a). Cette correction, bien que nécessaire, n'est pas toujours juste et suffisante pour rendre compte de la biodisponibilité des substances dans les sols naturels. Cependant, l'utilisation de ce substrat dans les bioessais est un procédé qui permet des comparaisons objectives sur une matrice identique pour différents utilisateurs.

Alors que le sol est, avec l'air dans une moindre mesure, le premier compartiment dans lequel le pesticide séjourne après une application, on constate qu'on dispose d'un moins large choix de tests que pour le milieu aquatique. En effet, les bioessais utilisés pour l'évaluation du risque en milieu aquatique sont disponibles pour un plus large choix d'espèces, ainsi qu'un plus grand nombre de niveaux trophiques et à des stades de vie variés. Dans la directive 91/414/CE, des tests sont requis pour mesurer les effets sur l'ensemble du cycle de vie du poisson ainsi que sur l'accumulation du pesticide dans les tissus de poisson par l'estimation du FBC (facteur de bioconcentration). **Actuellement, il n'existe pas l'équivalent pour l'évaluation du risque pour les organismes terrestres**.

I.2.2.2. Les études en conditions contrôlées

I.2.2.2.1 Les modèles biologiques

Pour déterminer les effets des contaminants sur un compartiment, il est nécessaire de disposer de modèles biologiques représentatifs du milieu étudié. Au sens écologique général, un bioindicateur peut être défini comme un organisme ou un groupe d'organismes pertinents pour déterminer qualitativement et quantitativement l'état de l'environnement (Fränzle 2006). Les critères qualifiant une espèce de bioindicateur sont parmi les suivants :

- ✓ elle doit être suffisamment répandue et abondante sur le territoire concerné, si possible facilement détectable,
- ✓ elle doit être le plus sédentaire possible pour refléter les conditions locales,
- ✓ elle doit avoir une taille rendant possible l'étude de ses différents tissus et de leurs composantes (muscles, os, organes dans le cas d'un animal…).

Les organismes bioindicateurs d'effets doivent être sensibles à de faibles perturbations de l'environnement tandis que les organismes indicateurs de bioaccumulation doivent tolérer les contaminants à de fortes concentrations et présenter des propriétés bioaccumulatrices.

Les invertébrés du sol qui sont classiquement utilisés dans les études écotoxicologiques sur les pesticides et qui peuvent ainsi être considérés comme bioindicateurs, sont les enchytrés, les vers de terre, les collemboles et les isopodes (Frampton *et al.* 2006; Lors *et al.* 2010). L'espèce *Eisenia foetida* au sens large est l'une des plus représentées. Pourtant, ce ver de terre fait partie des espèces les moins sensibles pour la plupart des pesticides étudiés et son utilisation pour l'évaluation de la toxicité des pesticides est parfois critiquée car elle n'est pas

présente dans les sols agricoles (Frampton *et al.* 2006). Le collembole *Folsomia candida*, dont le test sur la reproduction n'est effectué que sous certaines conditions dans l'évaluation du risque des pesticides (cf. section I.2.2.1), fait également partie des espèces les plus employées et il est parmi les espèces les plus sensibles aux différents pesticides testés (Frampton *et al.* 2006). Les études en laboratoire utilisant comme modèles les nématodes se développent également fortement du fait de leur représentativité dans l'écosystème du sol couplée à leur commodité de manipulation (Sochová *et al.* 2006). L'espèce *Caenorhabditis elegans* est la plus couramment utilisée. De nombreuses études ont démontré que les mollusques gastéropodes comme les **escargots terrestres** sont des bioindicateurs de pollution notamment des métaux et des HAPs (Dallinger *et al.* 2001; Beeby et Richmond 2002; de Vaufleury *et al.* 2006a; de Vaufleury *et al.* 2006b; Regoli *et al.* 2006; Barker 2001). Ces consommateurs primaires occupent une place particulière dans l'écosystème à l'interface sol-air-végétation. De ce fait, ils intègrent plusieurs sources de contamination (sol, atmosphère, végétaux) par voies digestive, respiratoire et/ou cutanée. Ils participent à la décomposition et à la fragmentation de la matière organique et sont impliqués dans de nombreuses chaînes alimentaires, y compris celle menant à l'homme (Barker 2004). Ils sont notamment indispensables à l'alimentation des oiseaux car ils leurs apportent une source de calcium nécessaire pour la construction de la coquilles des œufs et une étude a montré que la pollution par des métaux entraînant une diminution significative de la densité et de l'abondance des escargots induisait alors indirectement un effet sur les oiseaux (Eeva *et al.* 2010). Parmi les espèces les plus ubiquistes, *Helix aspersa* (escargot petit gris, syn. *Cantareus aspersus* ou *Cornu aspersum* O.F. Müller, 1774) et *Helix pomatia* Linnaeus, 1758 (escargot de Bourgogne) colonisent de nombreux milieux. S'ils sont assez rares au milieu des champs et des prairies, ils fréquentent la périphérie des zones cultivées, les lisières de forêts, voire les milieux forestiers (Kerney *et al.* 2006). Leurs capacités de résistance et d'accumulation des métaux ont été démontrées chez de nombreuses espèces (*H. pomatia*, Dallinger et Wieser 1984; *H. aspersa*, Scheifler *et al.* 2002a; *Cepaea nemoralis*, Notten *et al.* 2005; *Pomacea paludosa*, Hoang *et al.* 2008; *Theba pisana*, Radwan *et al.* 2010). Les études menées par le laboratoire Chrono-Environnement sur l'escargot *H. aspersa* (de plus amples informations sur sa biologie et son cycle de vie seront présentées dans la partie II Matériels et méthodes) ont conduit à la normalisation d'un bioessai évaluant les effets des substances chimiques et des matrices contaminées sur sa survie et sa croissance (ISO 15952:2006). Comme il a été vu à la section I.2.2.1, ce bioessai n'est pas utilisé dans le cadre de l'évaluation du risque des pesticides et une seule étude rapporte son utilisation pour évaluer les effets d'un insecticide,

l'α-cyperméthrine (Hartnik *et al.* 2008). Peu d'études sont consacrées aux effets des pesticides sur les escargots. Parmi les données disponibles, il apparaît que les carbamates et les insecticides organophosphorés entraînent une faible mortalité chez des escargots nourris pendant 10 jours avec de l'aliment contaminé (Schuytema *et al.* 1994). L'insecticide pentachlorophénol n'est pas mortel pour les escargots à des concentrations de 1000 mg kg^{-1} dans la nourriture (Gomot-de Vaufleury 2000). Coeurdassier *et al.* (2001) ont étudié les effets d'un insecticide organophosphoré, le diméthoate, sur la survie, la croissance et les acétylcholinestérases (AChE) et démontrent une inhibition de la croissance en relation avec l'accumulation de cette molécule. Ces auteurs ont également observé que les escargots sont plus sensibles aux pesticides contenus dans le sol que dans la nourriture (Coeurdassier *et al.* 2002).

Les résultats de ces études montrent le potentiel des escargots en tant que bioindicateurs à l'interface sol-air-plantes. Ce potentiel doit être développé pour apporter des informations sur le comportement et les effets des très nombreuses molécules utilisées en tant que pesticides afin d'alimenter l'évaluation du risque environnemental.

I.2.2.2.2 Les paramètres de toxicité

La stratégie des 3 Rs (« Replacement, Reduction and Refinement » en anglais)(Russel et Burch 1959) préconisée par le règlement REACH (EC 2006c) a pour principe le remplacement, la diminution et l'affinement des essais sur les animaux. Selon la directive 86/609/CEE concernant la législation sur la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales, est considéré comme animal, « tout vertébré vivant non humain, y compris les formes larvaires autonomes et/ou capables de reproduction, mais à l'exclusion des autres formes fœtales ou embryonnaires » (EC 1986). Selon cette définition, de nombreux développements de bioessais évaluant la toxicité de contaminants sur les **embryons** ont vu le jour, principalement dans le milieu aquatique. Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est d'ailleurs considéré comme une référence dans ce domaine. Les essais de toxicité conduits sur ses embryons ont fait l'objet de nombreuses publications (Nagel 2002; Strmac *et al.* 2002; Braunbeck *et al.* 2005; Hallare *et al.* 2005) et ont abouti à la normalisation de deux tests au niveau international (ISO 12890:1999; ISO 15088:2007). Le poisson Medaka (*Oryzias latipes)* est considéré comme un modèle de laboratoire en toxicologie aquatique, pour l'étude de la génotoxicité, de biomarqueurs moléculaires et de l'embryologie expérimentale. Ses

embryons font l'objet d'études sur les effets des HAP (Cachot *et al.* 2007) ou des pesticides (Hamm et Hinton 2000). Chez les autres vertébrés, quelques études rapportent les effets de pesticides sur des embryons d'amphibiens (Perkins *et al.* 2000; Vismara *et al.* 2000). A partir du moment où les essais sur les embryons de vertébrés ovipares sont considérés comme des tests *in vitro* (Weisbrod *et al.* 2008), les essais sur les invertébrés peuvent l'être également, bien qu'il n'existe pas de législation sur les expérimentations les concernant. De nombreuses études ont été conduites pour évaluer la toxicité de contaminants, pesticides ou autres, sur l'embryon d'oursin, qui est considéré comme un modèle de référence chez les invertébrés aquatiques marins (Pagano 2001; Bellas *et al.* 2005; Marc *et al.* 2005; Arslan *et al.* 2007). Manzo (2004) propose le développement d'un nouveau bioessai d'embryotoxicité sur ce modèle, plus rapide et avec une quantité moins importante de matériel biologique. On trouve également un nombre important d'études sur les embryons de bivalves, avec la moule (Bellas *et al.* 2005; Bringolf *et al.* 2007) ou l'huître pour évaluer la toxicité des sédiments (Geffard *et al.* 2002), ce qui a d'ailleurs conduit à développer un test standardisé au niveau de l'AFNOR (XP T90-382, 2009). Il existe également des études sur les embryons de mollusques d'eau douce pour évaluer les effets de métaux (Gomot 1998; Coeurdassier *et al.* 2003; Pietrock *et al.* 2008; Ansaldo *et al.* 2009; Sawasdee et Köhler 2009), de pesticides (Oliveira-Filho *et al.* 2005; Bhide *et al.* 2006; Lalah *et al.* 2007; Coutellec *et al.* 2008) ou de perturbateurs endocriniens (Schirling *et al.* 2006; Gust *et al.* 2010). La plupart des auteurs ayant développé des bioessais avec des embryons d'espèces aquatiques ont démontré que le stade embryonnaire est hautement sensible (Gomot 1998b; Geffard *et al.* 2002; Strmac *et al.* 2002; Schirling *et al.* 2006).

Les expériences de tératogénèse expérimentale sur les embryons qui ont permis dans la première moitié du 20ème siècle de déterminer les mécanismes de l'embryogénèse constituent des méthodes d'analyse des effets des contaminants aux différents stades du développement et méritent d'être généralisées car ces étapes sont particulièrement vulnérables. Or, pour le milieu terrestre, il n'existe actuellement pas de méthode d'évaluation de l'embryotoxicité. Si les bioessais sur les effets des contaminants sur la reproduction du nématode (ISO 10872:2010) et du ver de terre (ISO 11268-2:1998) comptabilisent le nombre de juvéniles produits, la toxicité relative à l'unique exposition des œufs n'est pas prise en compte. Dans la littérature, peu d'études rapportent l'utilisation de l'embryon comme modèle pour l'évaluation de la toxicité des contaminants en milieu terrestre, hormis les études sur les oiseaux. En effet les modèles embryons d'oiseaux ont été des bioindicateurs précieux des effets néfastes des pesticides (Hoffman et Eastin 1981), ayant abouti à l'interdiction de nombreux produits dans

les années 1960 à 2000, comme par exemple le DDT (Carson 1962). Les effets de métaux lourds (Cd, Zn, Cu) ont été étudiés sur des œufs de lézards (Brasfield *et al.* 2004) et de limaces (Iglesias *et al.* 2000). Iglesias *et al.* (2002) ont également évalué sur cet invertébré, les effets d'herbicides (ioxynil, bromoxynil et une formulation à base de pyridate et de bromoxynil), d'insecticides (thiocyclam, diflubenzuron et azadirachtine) et de molluscicides (metaldehyde et methiocarbe). Leur étude, qui s'inscrit dans une problématique de lutte contre les pestes agricoles (et non d'évaluation du risque des pesticides), consiste à exposer des œufs à un stade déjà avancé (différentiation des premiers organes) à du sol sur lequel ont été déposées les solutions aqueuses de pesticides, et à déterminer les LC50 (en mg s.a. cm^{-2}).

Que ce soit les études relatives au milieu aquatique ou celles concernant le milieu terrestre, toutes soulignent les avantages de l'embryon comme modèle pour l'évaluation de la toxicité des contaminants. En effet, en plus d'être une alternative aux tests pratiqués sur les animaux, ces bioessais peuvent être considérés comme subchroniques car ils s'étendent sur une étape complète du cycle de vie, qui est le développement embryonnaire. Plusieurs paramètres peuvent être mesurés : les malformations, la durée du développement, le rythme cardiaque, le succès d'éclosion,…Cependant, pour le milieu terrestre, il n'existe actuellement pas de méthode d'évaluation de l'embryotoxicité.

Parmi les autres paramètres de toxicité étudiés pour l'évaluation du risque des sols, on trouve les effets toxiques directs sur la survie, la croissance et la reproduction. De plus en plus, les tests d'évitement sont utilisés avec les différents modèles d'invertébrés du sol car ils sont considérés comme de bons outils de « screening » (Novais *et al.* 2010) et sont également très sensibles et très rapides (Lors *et al.* 2010). Bien que Frampton *et al.* (2006) indiquent une répartition quasiment égale entre les études de toxicité aiguës (48%) et chroniques (52%) des effets des pesticides sur les invertébrés du sol, la plupart des essais chroniques en laboratoire sont appliqués seulement sur une partie du cycle de vie (croissance ou reproduction par exemple). En fait, il existe peu d'études en milieu terrestre qui considèrent les effets des pesticides sur **l'ensemble du cycle de vie d'une espèce**. Pourtant, ce type de bioessai est très pertinent surtout quand il est basé sur des expositions à des concentrations sublétales, proches des concentrations environnementales. Sur une exposition à long terme, plusieurs paramètres de toxicité peuvent être mesurés, en plus des paramètres classiques, comme des altérations du comportement, une potentielle accumulation des contaminants ou des perturbations

endocriniennes. L'effet des métabolites interfère également avec l'effet des substances actives du fait d'une exposition plus longue permettant la métabolisation des produits. Les tests sur l'ensemble du cycle de vie peuvent donc mettre en évidence des effets qui n'ont pas été démontrés lors d'une exposition à court terme (Lemos *et al.* 2010). C'est pourquoi il est recommandé de développer ce genre de test avec les vers de terre (Van Gestel et Weeks 2004) ou d'autres espèces. Enfin, les paramètres individuels de toxicité sur la survie, la croissance et la reproduction que l'on évalue à partir d'un bioessai chronique, peuvent être utilisés pour prédire les effets sur la population, à travers l'utilisation de modèles, comme par exemple les matrices de Leslie (Coeurdassier 2001; Smit *et al.* 2006).

Sur chaque étude réalisée en laboratoire, des informations peuvent être apportées sur les mécanismes d'action des pesticides, par la mesure d'effets sur des activités enzymatiques notamment. Certaines de ces activités ont été étudiées chez l'escargot terrestre comme l'inhibition des AChE, indicatrices de neurotoxicité, après exposition au diméthoate (Coeurdassier *et al.* 2001; Mazzia *et al.* 2011), au chlorpyrifos-ethyl et à l'azinphos-methyl (Mazzia *et al.* 2011) et à d'autres organophosphorés et carbamates (Laguerre *et al.* 2009). D'autres enzymes, comme les catalases (CAT), biomarqueurs du stress oxydatif ou encore les glutathion-S-transférases (GST), révélatrices de métabolisation ont été étudiées chez le ver de terre après exposition à divers fongicides, comme le folpel (Schreck *et al.* 2008).

I.2.2.2.3 Application aux pesticides étudiés

A part les données d'écotoxicité obtenues à l'aide des bioessais standardisés (Tableau I.4), il existe peu d'informations sur d'autres organismes pour le **métirame-Zn** et la **pyraclostrobine** dans la littérature. Ces deux molécules semblent pourtant relativement toxiques pour les organismes aquatiques comparativement aux autres molécules (Tableau I.4).

Pagano (2001) n'a montré aucun effet du **cymoxanil** seul sur des embryons d'oursins (*Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis*) jusqu'à des concentrations de 2,5 kg l^{-1}. Guida *et al.* (2008) ont eux déterminé une EC50 d'immobilité, chez *Daphnia magna*, de 0,9 mg l^{-1}. Ces auteurs ont également testé une formulation commerciale à base de cymoxanil, de CuOCl et de composés inconnus qui s'est révélée être beaucoup plus toxique que les ingrédients actifs qui la composent. Il n'existe aucune donnée d'écotoxicité terrestre, mises à part celles présentées dans le Tableau I.4 qui révèlent notamment une toxicité importante vis-à-vis de l'abeille.

Jones *et al.* (1996) ont démontré l'induction d'une protéine de stress, la *β*-galactosidase, ainsi qu'une inhibition de l'alimentation chez le nématode (*C. elegans*) suite à une exposition au **folpel**. Schreck *et al.* (2008) ont étudié les effets d'une mixture de 4 fongicides (dont le **folpel** et le **fosétyl-Al**) sur différentes activités enzymatiques du ver de terre (*Aporrectodea caliginosa nocturna)*. Les fongicides n'ont pas d'effets sur la GST mais une réduction significative de l'activité de la CAT et de l'AChE est constatée après 14 jours d'exposition.

La toxicité du **tébuconazole** a uniquement été étudiée sur les organismes aquatiques. Des valeurs de LD50 de 1,6 mg l^{-1} ont été déterminées chez *Gammarus pulex* L. (Adam *et al.* 2009), de 20 mg l^{-1} chez le poisson zèbre (Sancho *et al.* 2010) et de 5,3 mg l^{-1} chez le poisson chat (Kreutz *et al.* 2008), espèce sur laquelle il a également été montré un effet important de ce composé sur les mécanismes cellulaires et les activités enzymatiques liés au système antioxydant (Ferreira *et al.* 2010).

Concernant le **glyphosate**, la littérature fournit de très nombreuses données d'écotoxicité et s'applique également à comparer la toxicité de différentes formulations à base de cet ingrédient actif.

Il existe notamment des données d'embryotoxicité chez des espèces aquatiques. Perkins *et al.* (2000) rapportent une toxicité du Roundup® 700 fois plus importante que le Rodéo® (une autre formulation à base de glyphosate mais sans polyoxyéthylène tallow amine ou POEA, adjuvant du Roundup®) sur des embryons de grenouilles (*Xenopus laevis*), avec une DL50 de 9,3 mg l^{-1}. Ces auteurs déterminent que la toxicité du Roundup® est principalement due à la présence de POEA. C'est le même constat qu'ont fait d'autres auteurs en testant la toxicité du Roundup®, du glyphosate et du POEA sur des embryons d'oursins (Marc *et al.* 2005) ou sur des embryons de moules (Bringolf *et al.* 2007). Pour ces premiers auteurs, la plus forte toxicité du Roundup® par rapport au glyphosate seul, vient du fait que le POEA permet au glyphosate d'atteindre sa cible moléculaire intracellulaire. Ces auteurs ont également mis en évidence un effet du Roundup® dose-dépendant sur la transcription de l'ADN et cela conduirait à l'inhibition d'une enzyme permettant l'éclosion chez l'oursin. Sparling *et al.* (2006) ont également étudié l'embryotoxicité d'une formulation de glyphosate en trempant des œufs de tortue (*Trachemys scripta elegans)* dans des solutions contaminées et ont pu constater une diminution du taux d'éclosion et de la masse des éclos.

La toxicité du glyphosate et de ses formulations a également été étudiée sur d'autres stades de vie. Tsui et Chu (2003) ont comparé la toxicité du Roundup®, du glyphosate, du POEA et du sel d'isopropylamine (IPA) sur la mortalité et la croissance de divers organismes aquatiques (bactéries, algues, protozoaires et crustacés). Il en résulte que les algues et les crustacés sont beaucoup plus sensibles au Roundup® que les bactéries et les protozoaires et que le classement des différents produits, pour la majorité des organismes, du plus toxique au moins toxique est le suivant : POEA > Roundup® > glyphosate > sel d'IPA de glyphosate. Brausch *et al.* (2007) ont déterminé une LD50 chez la daphnie de 97 µg l^{-1} pour une formulation de POEA. Entre plusieurs formulations à base de glyphosate, il ressort que celles qui contiennent du POEA sont beaucoup plus toxiques sur divers stades de grenouilles que celles qui n'en contiennent pas (Mann et Bidwell 1999; Howe *et al.* 2004). Contrairement aux nombreux auteurs cités ci-dessus, l'étude d'Achiorno *et al.* (2008) est parmi les rares à n'avoir montré aucune différence de toxicité entre le glyphosate et sa formulation sur des larves de nématomorphes. Ils ont déterminé une LC50 du Roundup® sur les adultes de 1,76 mg l^{-1}.

Tate *et al.* (1997) ont mesuré les effets du glyphosate sur 3 générations d'un gastéropode d'eau douce (*Pseudosuccinea columella)* et ont pu mettre en évidence des effets positifs et négatifs du glyphosate. En effet, alors qu'il n'y a aucune différence entre les escargots témoins et les escargots traités des premières et deuxièmes générations, un développement plus rapide des embryons traités, ainsi qu'une fécondité plus importante sont démontrés pour les escargots de la troisième génération. Cependant, toujours chez ceux de la troisième génération, une réduction significative du pourcentage d'éclosion chez les escargots exposés à la plus forte concentration (10 mg l^{-1}) est également signalée, entraînant ainsi une diminution de la fertilité.

Concernant les mécanismes cellulaires impliqués dans la toxicité du glyphosate, une diminution significative de l'activité de l'AChE dans le cerveau a été mesurée chez deux poissons d'Amérique du Sud (*Prochilodus lineatus* et *Leporinus obtusidens)* exposés à des concentrations de l'ordre de 1 à 10 mg l^{-1} de Roundup® (Modesto et Martinez 2010; Salbego *et al.* 2010). Modesto et Martinez (2010) ont également montré une diminution de l'activité de l'AChE dans les muscles, contrairement à Salbego *et al.* (2010). Ils ont aussi étudié l'effet du Roundup® sur des biomarqueurs du stress oxydatif et mis en évidence une réduction des activités enzymatiques de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase.

Quelques auteurs rapportent des données d'écotoxicité du glyphosate sur des organismes du milieu terrestre, en plus de celles qui existent dans le rapport de synthèse pour son inscription à l'annexe I de la directive 91/414/CE (EC 2002b). Concernant les organismes

strictement inféodés au sol, quelques études sur le ver de terre *E. foetida* mettent en évidence une réduction de la croissance à partir de 8 mg kg^{-1} (Yasmin et D'Souza 2007) et une réduction de la fertilité dans un sol contaminé en conditions réelles (Casabe *et al.* 2007). Les collemboles (*F. candida*) sont plus sensibles que les vers de terre comme l'illustre la valeur de EC50 de 0,33 mg kg^{-1} sur la reproduction après 28 jours d'exposition (Santos *et al.* 2010). Les organismes de surface semblent moins sensibles, avec une EC50 d'évitement de 39,7 mg kg^{-1} chez l'isopode *Porcellionides pruinosus* (Santos *et al.* 2010). Les araignées ne montrent pas de modification de leur comportement après avoir été en contact avec des solutions de glyphosate, contrairement à des scarabées qui ont tendance à éviter les surfaces contaminées et à se déplacer moins rapidement (Michalková et Pekár 2009). Schneider *et al.* (2009) ont montré que la démographie d'un insecte prédateur (*Chrysoperla externa)* était significativement réduite après ingestion de glyphosate alors que Schuytema *et al.* (1994) n'ont pas montré d'effets létaux chez des escargots (*H. aspersa*) exposés *via* l'alimentation jusqu'à des concentrations de 5000 mg kg^{-1}.

Quelques études concernent les vertébrés en tant que prédateurs d'organismes contaminés et donc susceptibles d'être eux-mêmes contaminés par ingestion. Il est signalé une faible toxicité du glyphosate chez des amphibiens, des oiseaux et des mammifères rongeurs lorsque ceux-ci sont contaminés par voie orale (Evans et Batty 1986; McComb *et al.* 2008). Les premiers auteurs observent une toxicité létale pour les oiseaux seulement à partir de 5000 mg kg^{-1} de glyphosate contenu dans la nourriture tandis que les seconds déterminent des valeurs de LD50 supérieures à 2600 mg kg^{-1} chez le triton et à 6000 mg kg^{-1} chez la souris.

Dinehart *et al.* (2009) ont simulé une application de **glufosinate** à des concentrations réalistes (448 g ha^{-1}) dans un terrarium contenant de jeunes crapauds et ils n'ont pas déterminé de mortalité 48 h après l'application. Kang *et al.* (2001) n'ont pas déterminé d'effets du glufosinate sur différents stades de vie du collembole *Paronychiurus kimi* exposé sur un substrat fait de plâtre et de charbon, mis à part à une très forte concentration de 157,27 kg ha^{-1} (soit une concentration d'application de 50 g l^{-1}). En revanche, quand les organismes sont exposés sur du sol artificiel, la survie des adultes est significativement réduite à partir de 50 mg kg^{-1} (soit une concentration d'application de 5 g l^{-1}) et la reproduction à partir de 0,5 mg kg^{-1} (Kang *et al.* 2001).

On peut trouver de très nombreuses données d'écotoxicité pour le **cuivre** dans la fiche de synthèse de cet élément (INERIS 2005). On peut citer quelques valeurs de NOEC du sulfate

de cuivre (tel qu'utilisé dans la bouillie bordelaise) pour des études chroniques en milieu aquatique et en milieu terrestre : entre 5 et 35 µg l^{-1} pour la mortalité des daphnies, 8 µg l^{-1} pour la mortalité, la croissance et la reproduction de mollusques d'eau douce (*Campeloma decisum* et *Physa integra)*, entre 0,063 et 340 µg l^{-1} pour la reproduction de diverses espèces de poissons d'eau douce et 50 et 100 mg kg^{-1} pour le nombre d'œufs et la croissance du ver de terre *Allolobophora caliginosa*. On peut constater que la toxicité du sulfate de cuivre est très hétérogène suivant le paramètre mesuré et l'espèce considérée. Belotti (1998) a estimé qu'au-delà de 33 mg kg^{-1} de cuivre dans le sol, les populations de vers de terre sont affectées. El-Gendy *et al.* (2009) ont déterminé que le sulfate de cuivre est la forme qui induit le plus important stress oxydatif, ainsi que la plus forte mortalité (26,54 µg ind^{-1}) chez l'escargot terrestre *Theba pisana* en comparaison avec les formes d'hydroxyde de cuivre et d'oxychlorure de cuivre. Chez un autre escargot, *H. aspersa*, la croissance est inhibée (EC50 = 1200 mg kg^{-1}) après 4 mois d'ingestion de nourriture contaminée au Cu (Gomot-de Vaufleury 2000).

Il existe peu de données de toxicité sur les fongicides à base de **soufre** et les études disponibles concernent principalement les pestes agricoles. La densité d'acariens ravageurs est significativement réduite après l'application de ce fongicide (Prischmann *et al.* 2005) et une pulvérisation à 3,8 g l^{-1} entraine 100% de mortalité chez des coléoptères (Sutherland *et al.* 2010).

I.2.2.3 Les études en conditions in situ

Les études sur le terrain sont plus difficiles à réaliser et à interpréter car soumises aux variations de nombreux paramètres qui ne peuvent être contrôlés, comme le climat ou la prédation. Pourtant, ces études sont complémentaires des données obtenues en laboratoire en conditions contrôlées et peuvent constituer une validation des approches PNECs et des PECs modélisées. Malgré leur rareté dans la littérature, Jansch *et al*. (2006) ont pourtant répertorié en 2006, 762 données de toxicité sur les effets *in situ* de pesticides sur les invertébrés du sol. Les groupes d'espèces majoritairement représentés sont les nématodes, les enchytrés, les lombrics, les arachnides, les collemboles et les fourmis. Les études concernent principalement les organochlorés, les organophosphorés et les carbamates. Les paramètres les plus fréquemment mesurés sont l'abondance et/ou la biomasse (89% des données) suivies par la mortalité (10%). Dans le cas des mesures d'abondance ou de densité, ce sont les organismes

autochtones qui sont comptabilisés, comme l'illustre une étude sur les effets de divers insecticides sur la communauté d'arthropodes (Peveling *et al.* 1999). Les effets peuvent être mesurés sur les organismes autochtones (bioindication passive) ou sur des organismes provenant du laboratoire ou d'un autre milieu (bioindication active). Concernant les pesticides de cette thèse, seules des études sur l'écologie générale des populations d'invertébrés dans des cultures génétiquement modifiées pour être résistantes au glyphosate ou au glufosinate sont disponibles. Ainsi, un travail conclut que le glufosinate n'a pas d'influence sur l'écologie d'une population d'arthropodes (araignées, coléoptères) après 3 ans de traitement dans une culture de betteraves (Volkmar *et al.* 2003). Selon Lupwayi *et al*. (2009) et Powell *et al*. (2009), les effets des cultures résistantes au glyphosate sont minimes sur les organismes du sol. Si la composition des communautés (microorganismes et nématodes) est modifiée dans une culture de maïs résistante au glyphosate, elle n'en est pourtant pas affectée en termes de biomasse (Powell *et al.* 2009).

En bioindication active, les études sur le terrain peuvent utiliser des microcosmes pour évaluer les effets des pesticides, comme par exemple avec les vers de terre (Reinecke et Reinecke 2007). Dans les microcosmes, également utilisés en conditions contrôlées, différents paramètres peuvent être mesurés suite à l'exposition au(x) pesticide(s), comme les effets sur les populations microbiennes (Carbonell *et al.* 2000; Pampulha et Oliveira 2006), sur la croissance des plantes, les populations de nématodes, d'enchytrés, d'arthropodes, la biomasse des vers de terre et les interactions entre ces différents organismes (Martikainen *et al.* 1998; Burrows et Edwards 2002). Sur le terrain, des organismes peuvent aussi être transplantés dans la parcelle où sont appliqués les pesticides sans être encagés dans des microcosmes, comme le montre une étude de capture-marquage-recapture qui a déterminé les effets globaux de divers pesticides sur l'activité de l'AChE d'escargots (Mazzia *et al.* 2011).

Enfin, il existe des sytèmes alternatifs au laboratoire et au terrain, les écosystèmes modèles terrestres (TME)(Schaeffer *et al.* 2010) ou encore systèmes terrestres miniaturisés (MTS). Ce sont de bons compromis entre l'évaluation des effets sur une seule espèce en laboratoire qui peut difficilement prédire les conséquences complexes d'une application en conditions réelles et les études sur le terrain qui sont soumises à d'importantes variabilité de sols, de climats et qui sont souvent peu reproductibles et plus coûteuses à mettre en place (Burrows et Edwards 2002). L'utilisation d'un TME en laboratoire pour l'évaluation du risque environnemental a fait l'objet d'une validation lors d'un essai interlaboratoire et d'études sur le terrain par la mesure des effets d'un fongicide, le carbendazim, sur plusieurs organismes (microorganismes, microarthropodes, nématodes, enchytrés et vers de terre) et sur différents paramètres (cycle

des nutriments, décomposition, alimentation de la faune du sol)(Forster *et al.* 2004; Knacker *et al.* 2004; Koolhaas *et al.* 2004; Moser *et al.* 2004a; Moser *et al.* 2004b; Rombke *et al.* 2004; Van Gestel *et al.* 2004).

Il existe peu d'études rapportant les effets des molécules étudiées dans cette thèse en conditions *in situ* sur les animaux. Pourtant, de nombreux auteurs préconisent le développement d'études sur le terrain en conditions réelles d'application dans le cadre d'une démarche d'évaluation du risque *à postériori* pour compléter la démarche *à priori* (Van Gestel et Weeks 2004; Newman *et al.* 2006; Schaeffer *et al.* 2010).

I.2.2.4 Accumulation des pesticides et techniques d'analyse dans les tissus animaux

L'analyse des résidus de pesticides dans les organismes peut être utile pour révéler une exposition, pour comprendre certains effets (en ciblant par exemple le lieu de stockage) et pour prévoir les quantités potentiellement transférables dans les chaînes alimentaires. Si aucune bioaccumulation n'est détectée, cela peut résulter :

- d'un non-transfert, soit du fait d'une dégradation rapide dans l'environnement, soit du fait de contaminants non biodisponibles,
- d'une détoxification rapide (excrétion ou métabolisation) par l'organisme. Il a été vu que la présence et/ou l'induction de certaines enzymes (comme la GST) pouvait être le témoin d'une métabolisation. Dans ce cas, afin d'avoir une idée plus précise de la bioaccumulation, il est nécessaire de connaître les métabolites du composé recherché,
- d'une sensibilité trop faible des méthodes analytiques employées.

La bioaccumulation des pesticides peut être modélisée, en utilisant les propriétés physico-chimiques des molécules (telles que le K_{ow} par exemple) à travers les QSARs (Quantitative Structure-Activity Relationships)(EC 2003b) ou mesurée. Dans ce dernier cas, il peut être mesuré uniquement le composé parent ou l'ensemble des composés, parent et métabolites, suivant les techniques employées (utilisation de molécules radiomarquées ou non). C'est pourquoi il est important de définir la notion de « résidus » telle qu'employée dans les LMR. D'après le Règlement 839/2008 sur les LMR, les résidus comprennent l'ensemble des molécules, composé parent et métabolites (EC 2008). Cependant, suivant le pesticide considéré, les résidus comprennent la molécule mère et/ou les métabolites. Comme on a pu le

voir en I.1.1, des LMR existent pour chaque produit alimentaire. Il devrait donc être possible de doser les pesticides étudiés dans notre travail dans des tissus animaux tels que de la viande (porc, mouton, bovin, lapin…). Pourtant, très peu de méthodes sont disponibles parmi les publications « accessibles », comme en témoigne le Tableau I.5. Ce déficit en méthodes d'analyse dans les tissus animaux est confirmé par les laboratoires publics (laboratoires départementaux agréés de la DGCCRF ; laboratoires universitaires) ou privés que nous avons contactés. Il existe un grand besoin de méthodes analytiques pour de nombreuses substances actives ; des méthodes existent mais ne sont pas validées par des laboratoires autres que ceux du producteur de la substance et / ou ne sont pas maîtrisées en routine, particulièrement dans les tissus animaux. Par exemple, la fiche IUCLID du glyphosate (EC et ECB 2000) fait état de méthodes expérimentales datant de 1977 qui « sont peu documentées… » mais qui « néanmoins ont été jugées scientifiquement valides pour supporter les conclusions… ». Pour cet herbicide très largement utilisé dans le monde, rares sont les publications rapportant son analyse dans les tissus animaux (Tableau I.5). De même que pour les tissus végétaux, il n'existe que depuis très récemment une méthode développée et en cours de validation au niveau européen pour l'analyse des pesticides hautement polaires (dont glyphosate et fosétyl-Al), comme en atteste l'EURL (EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides, http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/home.asp?LabID=300&Lang=EN).

Du fait des difficultés analytiques et/ou de l'absence de méthodes d'analyse facilement accessibles, il existe peu d'études ayant mesuré la bioaccumulation des pesticides étudiés dans les tissus animaux :

A notre connaissance, il n'existe pas d'étude sur l'accumulation du **métirame-Zn**, du **cymoxanil** et du **glufosinate** dans les tissus d'animaux.

Pour la pyraclostrobine et le tébuconazole (et 148 autres pesticides) une méthode d'extraction et d'analyse a été développée dans des tissus d'abeille (Walorczyk et Gnusowski 2009) (Tableau I.5). Il n'a pas été détecté de **pyraclostrobine** dans les tissus.

Une méthode d'extraction et d'analyse du **folpel** et du **fosétyl-Al** a été développée dans les tissus de vers de terre par Schreck *et al.* (2008) (Tableau I.5). Après 14 jours d'exposition dans le sol, le folpel n'est pas accumulé et le fosétyl-Al n'a pas pu être dosé.

Konwick *et al.* (2006) ont étudié l'accumulation de divers triazoles chez de jeunes truites nourries avec de l'aliment contaminé et ont déterminé un facteur de bioaccumulation de 0,012 pour le **tébuconazole** (Tableau I.5). Walorczyk et Gnusowski (2009) ont mesuré des

concentrations en tébuconazole jusqu'à 1146 µg kg^{-1} parmi les 25 abeilles sur lesquelles ils ont validé leur méthode analytique (Tableau I.5).

Les deux seules études ayant dosé le **glyphosate** dans des tissus animaux (Tableau I.5) montrent que ce composé et/ou ses métabolites s'accumulent dans des tissus d'oligochète aquatique (Contardo-Jara *et al.* 2009) et de carpe (Wang *et al.* 1994). En effet, des facteurs de bioaccumulation compris entre 1,2 et 2,8 pour une exposition au glyphosate seul et entre 1,4 et 5,9 pour une exposition au Roundup® sont déterminés pour *Lumbriculus variegatus* (Contardo-Jara *et al.* 2009). Ces auteurs montrent ainsi une plus forte accumulation du glyphosate quand il est associé au Roundup® supportant l'hypothèse que le POEA contenu dans le Roundup® facilite le transfert du glyphosate à l'organisme.

Concernant le **cuivre,** il est reconnu que les organismes l'accumulent de façon importante. Des facteurs de bioaccumulation du Cu entre 20 et 950 ont été définis pour différentes espèces de poissons provenant d'une même rivière (INERIS 2005). Des escargots aquatiques provenant de rivières du sud-ouest du Nigeria présentent des concentrations de 2352 mg kg^{-1} de Cu dans leurs tissus (Adewunmi *et al.* 1996). Sur l'espèce terrestre *H. aspersa*, des concentrations de Cu jusqu'à 252 mg kg^{-1} et 700 mg kg^{-1} ont été déterminées dans les tissus après une exposition à de la nourriture contaminée respectivement à 28 mg kg^{-1} pendant 4 semaines (Gomot et Pihan 1997) et 240 mg kg^{-1} pendant 6 semaines (Snyman *et al.* 2005).

Tableau I.5. Méthodes de dosages (extraction et analyse) des composés organiques étudiés dans les tissus animaux, disponibles dans la littérature scientifique.

Molécule recherchée	Nature de la matrice	Type d'extraction	Méthode d'analyse	Rendement sur matrice	LOD	Auteurs
Carbamates (métirame-Zn)	Produits alimentaires	Digestion à l'acide	Détermination du CS2 par spectrophotométrie ou GC/EFD ou GC/FPD	70-90%	0,01 mg CS_2 kg^{-1}	(Crnogorac et Schwack 2009)
Pyraclostrobine Tébuconazole	Abeille	Broyage à l'ultraturrax dans mélange eau / acétonitrile Ajout de différents sels Centrifugation / congélation (-26°C) Récupération de l'extrait / filtration Centrifugation / réajustement pH Concentration par évaporation	GC-MS/MS	87-95%	-	(Walorczyk et Gnusowski 2009)
Folpel Fosétyl-Al	Vers de terre	Fragmentation de l'échantillon Broyage avec de la célite ASE (acétone) / Centrifugation / évaporation	GC-MS	75-90%	-	(Schreck *et al.* 2008)
Tébuconazole	Poisson	Lyophilisation Homogénéisation (blender) dans mélange dichlorométhane/ hexane Centrifugation Concentration par évaporation	GC-MS	73%	0.03-0.5 mg kg^{-1}	(Konwick *et al.* 2006)
Glyphosate	Ver aquatique	combustion	Détermination du $^{14}CO_2$ avec un compteur à scintillation liquide	-	-	(Contardo-Jara *et al.* 2009)

I.3 Bilan des lacunes identifiées en évaluation du risque des pesticides en milieu terrestre

Les pesticides sont des produits chimiques de nature organique ou métallique qui sont actuellement présents sous forme de résidus dans tous les compartiments de l'environnement. Bien que des solutions alternatives à leur utilisation intensive soient en développement (cultures biologiques, plantes OGM, « vaccination » des plantes grâce à l'application de stimulateurs de défenses naturelles…), elles ne remplaceront probablement pas, ni dans l'immédiat ni totalement, les applications de pesticides. Le problème de la contamination se pose donc encore pour de nombreuses années. Le nombre de molécules disponibles sur le marché étant considérable, toutes ne font pas l'objet d'une évaluation approfondie. Aussi, de nombreuses données manquent sur les quantités résiduelles réellement présentes dans les différents milieux, sur leur comportement et leur devenir dans ces compartiments et sur leur devenir et leur toxicité dans/pour les organismes.

Les procédures d'évaluation du risque des pesticides telles qu'elles ont été définies dans cette synthèse présentent certaines limites.

- ✓ Du fait du déficit en méthodes d'analyses dans les matrices solides (sol et tissus), les moyens disponibles pour évaluer l'exposition, l'accumulation et le transfert potentiel des pesticides dans les chaînes alimentaires sont limités.

- ✓ Bien que de nombreuses publications relatent le développement d'études avec des modèles biologiques terrestres et des paramètres de toxicité les plus sensibles possibles aux effets de pesticides, le panel des bioessais disponibles et exigés pour l'évaluation de la qualité des milieux terrestres évolue lentement par rapport au milieu aquatique, particulièrement avec les organismes de la surface du sol. Ceux-ci sont pourtant les premiers exposés aux pulvérisations de molécules. Parmi eux, les escargots, qui intègrent l'ensemble des voies et sources de contamination, appartiennent à des chaînes trophiques variées et évoluent à proximité ou au sein même des parcelles agricoles directement contaminées. Aussi, ils constituent des bioindicateurs pertinents de la qualité des agrosystèmes, d'autant plus que certaines espèces comestibles voient leurs populations diminuer de façon alarmante sous l'effet conjugué des contaminants et des perturbations des milieux naturels.

- ✓ Les tests sur animaux restent majoritaires et incontournables au sein de l'évaluation des effets des contaminants sur l'environnement, mais il est souhaité, notamment pour des questions éthiques, de réduire leur utilisation et de proposer des tests alternatifs (EC 2006c). En partant du principe que les tests sur embryons incubant hors de la mère peuvent être considérés comme *in vitro*, des efforts sont à faire avec ce matériel biologique pour concevoir des bioessais fiables et si possible rapides, notamment pour le milieu terrestre.

- ✓ Les bioessais évaluant les effets à long terme ou sur l'ensemble du cycle de vie, ainsi que les bioessais *in situ* ne sont appliqués que rarement, et leur mise en œuvre est généralement secondaire et conditionnée par les résultats obtenus des premiers bioessais (« Tiered approach »). Etant cependant plus réalistes et permettant de mieux appréhender l'exposition réelle des organismes, il est nécessaire de développer ces méthodes afin d'offrir une plus grande diversité de tests adaptés à la complexité des modes d'action des contaminants au cours du temps.

- ✓ Comme cela a pu être constaté au cours de cette synthèse, quelques études ont montré des différences de toxicité entre substances actives et formulations commerciales. L'évaluation du risque ne prend pas toujours en compte les interactions entre substances actives dans un même produit, entre substance(s) active(s) et adjuvant(s) pour la fabrication d'un produit ou entre produits phytosanitaires qui vont être appliqués en même temps sur la parcelle ou à courts intervalles de temps. En effet, s'il peut y avoir simple additivité de la toxicité de chaque substance, il peut également y avoir antagonisme (toxicité moindre par rapport à une simple additivité attendue) ou synergie (toxicité supérieure par rapport à une simple additivité attendue). C'est donc une perspective d'analyses complémentaires qui doit être prévue pour une évaluation objective des risques.

I.4 Définition des objectifs

Pour répondre aux besoins identifiés dans la première partie de la thèse, l'objectif général de ces travaux est de comprendre le devenir et les effets des pesticides dans les milieux terrestres et notamment dans un environnement agricole particulier, le vignoble, grâce à l'utilisation d'un modèle bioindicateur présent dans ces agrosystèmes, l'escargot. Pour y répondre, nous nous sommes fixés quatre objectifs opérationnels principaux :

(1) Développer des méthodes analytiques afin de caractériser l'exposition des organismes aux herbicides par le sol et le transfert des pesticides organiques (herbicides et fongicides) dans les tissus d'escargots. Ce travail fait l'objet du Chapitre 1 (de la partie III, Résultats).

(2) Evaluer la toxicité des contaminants sur les stades précoces du cycle de vie des escargots. Cette étude fait l'objet du Chapitre 2. Il rapporte la mise au point et les résultats de bioessais d'évaluation de l'embryotoxicité de contaminants présents dans les phases liquide, solide ou gazeuse du sol. Ces bioessais sont développés avec les pesticides étudiés dans la thèse ainsi qu'avec d'autres substances (métalliques ou organiques) et d'autres matrices. En effet, des résultats préliminaires obtenus en Master 2 avec des pesticides (Reglone®, herbicides à base de diquat et Agral® 90, surfactant à base de nonylphénols polyéthoxylés) et un métal (le cadmium), sont intégrés à ces travaux. Des études utilisant des matrices complexes (sols naturellement contaminés provenant d'un ancien site industriel) complètent celles menées avec des sols artificiellement contaminés avec les pesticides.

(3) Etudier le transfert et les effets à long terme de deux herbicides sur l'escargot en conditions contrôlées. Ces expériences, rapportées dans le Chapitre 3, cherchent à déterminer si le glyphosate et le glufosinate présentent un potentiel toxique et/ou d'accumulation, quand ils sont utilisés à des concentrations environnementales, et ce, sur l'ensemble du cycle de vie de l'escargot.

(4) Le Chapitre 4 vise à déterminer *in situ* le risque d'exposition des escargots aux pesticides en conditions réelles d'application. La première étape de ce travail est de proposer un système d'exposition des escargots adapté au contexte viticole et aux pesticides. Ensuite, il s'agit de quantifier l'exposition des escargots aux pesticides et d'estimer l'influence des

phénomènes de dérive sur cette exposition, par la mesure des dépôts au sol en relation avec le développement d'une méthode d'analyse. Enfin, nous voulons déterminer si les escargots peuvent être affectés par ces pulvérisations et s'ils accumulent les pesticides lorsqu'ils sont exposés en milieu naturel.

La Figure I.4 illustre les différentes approches mises en œuvre dans cette thèse, *in situ* (à gauche) et en laboratoire (à droite). Divers paramètres sont mesurés, de l'exposition aux effets, à différents stades de vie et avec tous ou une partie seulement des pesticides appliqués sur la vigne.

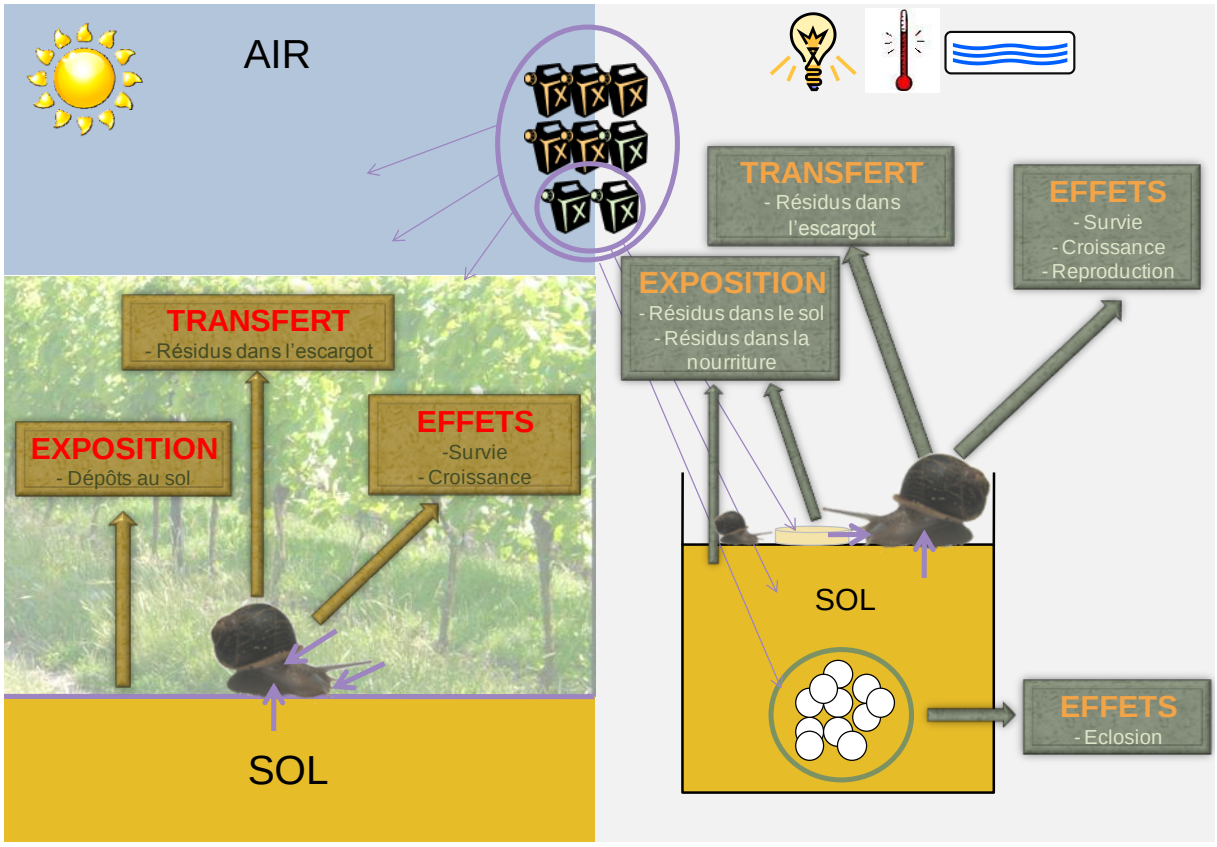


Figure I.4. Objectifs de la thèse dans le cadre d'une analyse multimédia de l'exposition – transfert – effets des pesticides de la vigne aux escargots.

Nous avons fait le choix dans cette thèse, d'étudier l'ensemble des formulations et des molécules actives appliquées en 2007-2008 sur une parcelle de vigne d'un vignoble réputé. Au regard des études bibliographiques présentées précédemment, on constate que pour ces 10 substances actives, il existe peu de données de toxicité, particulièrement au niveau du

compartiment terrestre. Il est donc important de compléter les études existantes sur ces molécules pour apporter des informations sur leur devenir et leur toxicité mais également de développer des outils et des méthodes d'analyses non confidentielles permettant de servir à l'évaluation du risque.

I.5 Références

Sites internet

AGRITOX : Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques.
http://www.dive.afssa.fr/agritox/php/fiches.php

Association Tyflo « Des vignerons alsaciens s'engagent ».
http://www.tyflo.org

BDAT : base de données des analyses de terres.
http://www.gissol.fr/programme/rmqs/rmqs.php

EFSA : European Food safety Authority. DARs disponibles pour un certain nombre de pesticides.
http://dar.efsa.europa.eu/dar-web/provision

e-phy: Base de données française sur les substances, les formulations et les usages de pesticides.
http://e-phy.agriculture.gouv.fr

ESIS : European chemical Substances Information System.
http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis

EURL : EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides.
http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/home.asp?LabID=300&Lang=EN

European Commission – Joint Research Center (JRC) – European Soil portal.
http://eusoils.jrc.ec.europa.eu

FOOTPRINT : Pesticides properties database.
http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/fr/index.htm

Interchim : Pdf disponible sur les réactifs de dérivation.
http://www.interchim.com/interchim/inter_intro_bio.htm

ISO : Organisation Internationale de Normalisation.
http://www.iso.org/iso/fr/iso_catalogue.htm

PubChem : Base de données sur les substances chimiques.
http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

Publications

(ISO 10872:2010). Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). Water quality

(ISO 11267:1999). Inhibition de la reproduction de Collembola (*Folsomia candida*) par des polluants du sol. Qualité du sol

(ISO 11268-1:1993). Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) - Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. Soil quality

(ISO 11268-2:1998). Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) - Part 2: Determination of effects on reproduction. Soil quality

(ISO 11268-3:1999). Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre - Partie 3 : Lignes directrices relatives à la détermination des effets sur site. Qualité du sol

(ISO 12890:1999). Détermination de la toxicité vis-à-vis des embryons et larves de poissons d'eau douce - Méthode semi-statique. Qualité de l'eau

(ISO 15088:2007). Détermination de la toxicité aiguë des eaux résiduaires vis-à-vis des œufs de poisson-zèbre (*Danio rerio*). Qualité de l'eau

(ISO 15952:2006). Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae). Determination of the effects on growth by soil contamination. Soil quality.

(ISO 16387:2004). Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus sp*.) Determination of effects on reproduction and survival. Soil quality

(ISO 20963:2005). Effets des polluants vis-à-vis des larves d'insectes (*Oxythyrea funesta*) - Détermination de la toxicité aiguë. Qualité du sol

(XP T90-382, 2009). Bio indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux - Détermination de la toxicité potentielle d'échantillons aqueux sur le développement embryo-larvaire de bivalve. Qualité de l'eau

Accinelli C, Screpanti C, Vicari A et Catizone P (2004). "Influence of insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki on the degradation of glyphosate and glufosinate-ammonium in soil samples." Agriculture Ecosystems & Environment **103**(3): 497-507.

Achiorno CL, de Villalobos C et Ferrari L (2008). "Toxicity of the herbicide glyphosate to *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha)." Chemosphere **71**(10): 1816-1822.

Adam O, Badot PM, Degiorgi F et Crini G (2009). "Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.)." Ecotoxicology and Environmental Safety **72**(2): 441-449.

Adewunmi CO, Becker W, Kuehnast O, Oluwole F et Dörfler G (1996). "Accumulation of copper, lead and cadmium in freshwater snails in southwestern Nigeria." Science of the Total Environment **193**(1): 69-73.

Al Rajab AJ, Amellal S et Schiavon M (2008). "Sorption and leaching of 14C-glyphosate in agricultural soils." Agronomy for Sustainable Development **28**(3): 419-428.

Albers CN, Banta GT, Hansen PE et Jacobsen OS (2009). "The influence of organic matter on sorption and fate of glyphosate in soil - Comparing different soils and humic substances." Environmental Pollution **157**(10): 2865-2870.

Amorim MJD, Römbke J, Schallnass HJ, Mortagua A et Soares VM (2005). "Effect of soil properties and aging on the toxicity of copper for *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus luxuriosus*, and *Folsomia candida*." Environmental Toxicology and Chemistry **24**(8): 1875-1885.

Ansaldo M, Nahabedian DE, Di Fonzo C et Wider EA (2009). "Effect of cadmium, lead and arsenic on the oviposition, hatching and embryonic survival of *Biomphalaria glabrata*." Science of the Total Environment **407**(6): 1923-1928.

Arias-Estévez M, López-Periago E, Martínez-Carballo E, Simal-Gándara J, Mejuto J-C et García-Río L (2008). "The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources." Agriculture Ecosystems & Environment **123**(4): 247-260.

Arslan OC, Parlak H, Oral R et Katalay S (2007). "The effects of nonylphenol and octylphenol on embryonic development of sea urchin (*Paracentrotus lividus*)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **53**(2): 214-9.

Aubertot JN, Barbier JM, Carpentier A, Gril JJ, Guichard L, Lucas P, Savary S, Savini I et Voltz M (2005). Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'expertise scientifique collective, synthèse du rapport. INRA et Cemagref (France).

Babic S, Zelenika A, Macan J et Kastelan-Macan M (2005). "Ultrasonic extraction and TLC determination of glyphosate in the spiked red soils." Agriculturae Conspectus Scientificus **70**(3): 99-103.

Barker GM (2004). Natural enemies of terrestrial mollusks. Wallingford, UK, CABI Publishing 644p.

Barker GM (2001). The Biology of terrestrial molluscs. Wallingford U.K, C.A.B. International.

Beeby A et Richmond L (2002). "Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution." Ecological Indicators **1**(4): 261-270.

Bellas J, Granmo A et Beiras R (2005). "Embryotoxicity of the antifouling biocide zinc pyrithione to sea urchin (*Paracentrotus lividus*) and mussel (*Mytilus edulis*)." Marine Pollution Bulletin **50**(11): 1382-1385.

Belotti E (1998). "Assessment of a soil quality criterion by means of a field survey." Applied Soil Ecology **10**(1-2): 51-63.

Bending G, Rodriguez-Cruz S et Lincoln S (2007). "Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories." Chemosphere **69**(1): 82-88.

Bernard JL et Marzin D (2010). "Alimentation et pesticides." Lettre Scientifique de l'IFN **146**.

Bhide M, Gupta P, Khan M, Dubey U, Thakur P, Nema P et Jain S (2006). "Morphological and biochemical studies on the different developmental stages of a fresh water snail, *Lymnaea stagnalis* (Lymnaeidae) after treatment with some pesticides." Journal of Environmental Biology **27**(2 SUPPL.): 359-366.

Bouvier G (2009). Exposition de la population générale aux résidus de pesticides en France. Synthèse des données d'utilisation, de contamination des milieux et d'imprégnation de la population. affset. RAPPORT du groupe d'étude « Expositions, déterminants des expositions et imprégnation de la population générale aux pesticides ».

Brasfield SM, Bradham K, Wells JB, Talent LG, Lanno RP et Janz DM (2004). "Development of a terrestrial vertebrate model for assessing bioavailability of cadmium in the fence lizard (*Sceloporus undulatus*) and in ovo effects on hatchling size and thyroid function." Chemosphere **54**(11): 1643-1651.

Braunbeck T, Böttcher M, Hollert H, Kosmehl T, Lammer E, Leist E, Rudolf M et Seitz N (2005). "Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species - An update." Altex **22**(2): 87-102.

Brausch JM, Beall B et Smith PN (2007). "Acute and sub-lethal toxicity of three POEA surfactant formulations to *Daphnia magna*." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **78**(6): 510-514.

Briand O, Millet M, Bertrand F, Clement M et Seux R (2002). "Assessing the transfer of pesticides to the atmosphere during and after application. Development of a

multiresidue method using adsorption on tenax and thermal desorption-GC/MS." Analytical and Bioanalytical Chemistry **374**(5): 848-857.

Bringolf RB, Cope WG, Mosher S, Barnhart MC et Shea D (2007). "Acute and chronic toxicity of glyphosate compounds to glochidia and juveniles of *Lampsilis siliquoidea* (Unionidae)." Environmental Toxicology and Chemistry **26**(10): 2094-2100.

Burrows HD, Canle L M, Santaballa JA et Steenken S (2002). "Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **67**(2): 71-108.

Burrows LA et Edwards CA (2002). "The use of integrated soil microcosms to predict effects of pesticides on soil ecosystems." European Journal of Soil Biology **38**(3-4): 245-249.

Cachot J, Law M, Pottier D, Peluhet L, Norris M, Budzinski H et Winn R (2007). "Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the λ transgenic Medaka." Environmental Science & Technology **41**(22): 7830-7836.

Caldas ED, Miranda MCC, Conceição MH et de Souza LCKR (2004). "Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potential risk for consumers." Food and Chemical Toxicology **42**(11): 1877-1883.

Candolfi MP, Barrett KL, Campbell PJ, Forster R, Grandy N, Huet MC, Lewis G, Oomen PA, Schmuck R et Vogt H (2001). "Guidance document on regulatory testing and risk assessment procedures for plant pretection products with non-target arthropods. From the ESCORT 2 workshop. SETAC, Pensacola, 46 p."

Carbonell G, Pablos MV, García P, Ramos C, Sánchez P, Fernández C et Tarazona JV (2000). "Rapid and cost-effective multiparameter toxicity tests for soil microorganisms." The Science of The Total Environment **247**(2-3): 143-150.

Carlsen S, Spliid N et Svensmark B (2006). "Drift of 10 herbicides after tractor spray application. 2. Primary drift (droplet drift)." Chemosphere **64**(5): 778-786.

Carson R (1962). Silent spring. Boston, Mariner Books 400p.

Casabe N, Piola L, Fuchs J, Oneto ML, Pamparato L, Basack S, Gimenez R, Massaro R, Papa JC et Kesten E (2007). "Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field." Journal of Soils and Sediments **7**(4): 232-239.

Chang F-C, Simcik MF et Capel PD (2011). "Occurrence and fate of the herbicide glyphosate ans its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere." Environmental Toxicology and Chemistry **30**(3): 548-555.

Chen ZL, He WX, Beer M, Megharaj M et Naidu R (2009). "Speciation of glyphosate, phosphate and aminomethylphosphonic acid in soil extracts by ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction system." Talanta **78**(3): 852-856.

Coeurdassier M (2001). Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymnaea stagnalis* et *lymnaea palustris*) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques organiques. Académie de Besançon. Besançon, Thèse de l'Université de Franche-Comté, n°886

Coeurdassier M, de Vaufleury A et Badot PM (2003). "Bioconcentration of cadmium and toxic effects on life-history traits of pond snails (*Lymnaea palustris* and *Lymnaea stagnalis*) in laboratory bioassays." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **45**(1): 102-9.

Coeurdassier M, Gomot de Vaufleury A, Saint-Denis M, Ribera D, Narbonne JF et Badot PM (2002). "Effects of dimethoate on snail B-esterase and growth as a function of dose, time and exposure route in a laboratory bioassay." Biomarkers **7**(2): 138-150.

Coeurdassier M, Saint-Denis M, Gomot de Vaufleury A, Ribera D et Badot PM (2001). "The garden snail (*Helix aspersa*) as a bioindicator of organophosphorus exposure: Effects

of dimethoate on survival, growth, and acetylcholinesterase activity." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(9): 1951-1957.

Coignard F et Lorente C (2006). Exposition aérienne aux pesticides des populations à proximité de zones agricoles. Bilan et perspectives du programme régional intercire. Institut de Veille Sanitaire (InVS).

Contardo-Jara V, Klingelmann E et Wiegand C (2009). "Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes." Environmental Pollution **157**(1): 57-63.

CORPEN (2007). Les produits phytosanitaires dans l'air : origine, surveillance et recommandations pratiques en agriculture. Comité d'orientation pour des pratiques agricoles respectueuses de l'environnement, Groupe Phyt'air.

Coutellec MA, Delous G, Cravedi JP et Lagadic L (2008). "Effects of the mixture of diquat and a nonylphenol polyethoxylate adjuvant on fecundity and progeny early performances of the pond snail *Lymnaea stagnalis* in laboratory bioassays and microcosms." Chemosphere **73**(3): 326-336.

Crnogorac G et Schwack W (2009). "Residue analysis of dithiocarbamate fungicides." TrAC Trends in Analytical Chemistry **28**(1): 40-50.

Crommentuijn T, Doornekamp A et van Gestel CAM (1997). "Bioavailability and ecological effects of cadmium on *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate as influenced by pH and organic matter." Applied Soil Ecology **5**(3): 261-271.

Dallinger R, Berger B, Triebskorn-Köhler R et Köhler H (2001). Soil biology and ecotoxicology. The biology of terrestrial molluscs. Barker GM. Oxon, CABI**:** 489-525.

Dallinger R et Wieser W (1984). "Patterns of accumulation, distribution and liberation of zn, cu, cd and pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology **79**(1): 117-124.

de Lopez Sabando O, de Gomez Balugera Z, Goicolea M, Rodriguez E, Sampedro M et Barrio R (2002). "Determination of simazine and cymoxanil in soils by microwave-assisted solvent extraction and HPLC with reductive amperometrical detection." Chromatographia **55**(11-12): 667-671.

de Vaufleury A, Coeurdassier M, Pandard P, Scheifler R, Lovy C, Crini N et Badot PM (2006a). "How terrestrial snails can be used in risk assessment of soils." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(3): 797-806.

de Vaufleury A, Gimbert F et Gomot L (2006b). Bioaccumulation, bioamplification des polluants dans la faune terrestre : un outil pour la biosurveillance des écosytèmes. ADEME et Laboratoire Chrono-Environnement.

Dinehart SK, Smith LM, McMurry ST, Anderson TA, Smith PN et Haukos DA (2009). "Toxicity of a glufosinate- and several glyphosate-based herbicides to juvenile amphibians from the Southern High Plains, USA." Science of the Total Environment **407**(3): 1065-1071.

DREAL (2010). Les pesticides dans les eaux franc-comtoises. Bilan 1995-2007. Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement.

EC (1986). "Directive du Conseil (86/609/CEE) du 24 novembre 1986 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques."

EC (1991). "Council directive of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. 91/414/EC." Official Journal of the European Union **L230**: 1-154.

EC (1998). "Directive 98/8/CE du Parlement européen et du Conseil du 16 février 1998 concernant la mise sur le marché des produits biocides." Journal Officiel des Communautés européennes **L123/1**.

EC (2000). "Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau." Journal Officiel des Communautés européennes **L327/1**.

EC (2002a). DRAFT working document. Guidance document on terrestrial ecotoxicology under Council directive 91/414/EC. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General.

EC (2002b). Review report for the active substance glyphosate. Finalised in the Standing Committee on Plant Health at its meeting on 29 June 2001 in view of the inclusion of glyphosate in Annex I of Directive 91/414/EEC. European Comission. Health & Consumer Protection Directorate-General. Directorate E – Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions. E1 - Plant health.

EC (2003a). Technical Guidance Document on risk assessment. Part II. Institute for health and consumer protection.

EC (2003b). Technical Guidance Document on risk assessment. Part III. Institute for health and consumer protection.

EC (2005). "Règlement (CE) n°396/2005 du Parlement européen et du Conseil du 23 février 2005 concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale et modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil." Journal Officiel des Communautés européennes **L70/1**.

EC (2006a). "Proposition de directive du Parlement européen et du Conseil définissant un cadre pour la protection des sols et modifiant la directive 2004/35/CE."

EC (2006b). "Règlement (CE) No 178/2006 de la Commission du 1er février 2006 modifiant le règlement (CE) no 396/2005 du Parlement européen et du Conseil par l'établissement d'une annexe I énumérant les denrées alimentaires et aliments pour animaux dont la teneur en résidus de pesticides est soumise à des limites maximales." Journal Officiel des Communautés européennes **L29/3**.

EC (2006c). "Regulation No 1907/2006 of The European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC." Official Journal of the European Union **49**(L396): 1-849.

EC (2008). "Commission Regulation (EC) No 839/2008 of 31 July 2008 amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards Annexes II, III and IV on maximum residue levels of pesticides in or on certain products." Official Journal of the European Union **L 234**: 1-216.

EC (2009a). "Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides (Text with EEA relevance)." Official Journal of the European Union **L309/71**.

EC (2009b). "Règlement (CE) No 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CEE du Conseil." Journal Officiel des Communautés européennes **L309/1**.

EC et ECB (2000). IUCLID Dataset Glyphosate. European Comission and European Chemicals Bureau. pdf: http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/index.php?PGM=ein.

Eeva T, Rainio K et Suominen O (2010). "Effects of pollution on land snail abundance, size and diversity as resources for pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca*." Science of the Total Environment **408**(19): 4165-4169.

EFSA (2009a). "Reasoned opinion of EFSA prepared by the Pesticides Unit (PRAPeR) on the 2007 Annual Report on Pesticide Residues." EFSA Scientific Report **305**: 1-106.

EFSA (2009b). "Scientific Opinion of the Panel on Plant Protection Products and their Residues on a request from EFSA on the usefulness of total concentrations and pore water concentrations of pesticides in soil as metrics for the assessment of ecotoxicological effects." The EFSA Journal **922**: 1-90.

El-Gendy KS, Radwan MA et Gad AF (2009). "In vivo evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail, *Theba pisana* exposed to copper-based pesticides." Chemosphere **77**(3): 339-344.

Evans DD et Batty MJ (1986). "Effects of high dietary concentrations of glyphosate (Roundup®) on a species of bird, marsupial and rodent indigenous to Australia." Environmental Toxicology and Chemistry **5**(4): 399-401.

Faber MJ, Stephenson GR et Thompson DG (1997). "Persistence and leachability of glufosinate-ammonium in a northern Ontario terrestrial environment." Journal of Agricultural and Food Chemistry **45**(9): 3672-3676.

Ferreira D, Motta ACd, Kreutz LC, Toni C, Loro VL et Barcellos LJG (2010). "Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals." Chemosphere **79**(9): 914-921.

Fidente P, Di Giovanni, C, Seccia, S, Morrica, P. (2005). "Determination of cymoxanil in drinking water and soil using high-performance liquid chromatography." Biomedical Chromatography **19**(10): 766-770.

Forlani G, Mangiagalli A, Nielsen E et Suardi CM (1999). "Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms." Soil Biology and Biochemistry **31**(7): 991-997.

Forster B, Van Gestel CAM, Koolhaas JE, Nentwig G, Rodrigues JML, Sousa JP, Jones SE et Knacker T (2004). "Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME) - An instrument for testing potentially harmful substances: Effects of carbendazim on organic matter breakdown and soil fauna feeding activity." Ecotoxicology **13**(1-2): 129-141.

Frampton GK, Jansch S, Scott-Fordsmand JJ, Rombke J et Van Den Brink PJ (2006). "Effects of pesticides on soil invertebrates in laboratory studies: A review and analysis using species sensitivity distributions." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(9): 2480-2489.

Fränzle O (2006). "Complex bioindication and environmental stress assessment." Ecological Indicators **6**(1): 114-136.

Freuze I, Jadas-Hecart A, Royer A et Communal P-Y (2007). "Influence of complexation phenomena with multivalent cations on the analysis of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water." Journal of Chromatography A **1175**(2): 197-206.

Geffard O, Budzinski H et His E (2002). "The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin." Ecotoxicology **11**(6): 403-416.

Gerritse R, Beltran J et Hernandez F (1996). "Adsorption of atrazine, simazine, and glyphosate in soils of the Gnangara Mound, Western Australia." Australian Journal of Soil Research **34**: 599–607.

Gil Y et Sinfort C (2005). "Emission of pesticides to the air during sprayer application: A bibliographic review." Atmospheric Environment **39**(28): 5183-5193.

Gil Y, Sinfort C, Brunet Y, Polveche V et Bonicelli B (2007). "Atmospheric loss of pesticides above an artificial vineyard during air-assisted spraying." Atmospheric Environment **41**(14): 2945-2957.

Gomot A (1998). "Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring." Ecotoxicology and Environmental Safety **41**(3): 288-297.

Gomot A et Pihan F (1997). "Comparison of the bioaccumulation capacities of copper and zinc in two snail subspecies (*Helix*)." Ecotoxicology and Environmental Safety **38**(2): 85-94.

Gomot-de Vaufleury A (2000). "Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*." Ecotoxicology and Environmental Safety **46**: 41-50.

Guida M, Inglese M et Meriç S (2008). "A multi-battery toxicity investigation on fungicides." Desalination **226**(1-3): 262-270.

Gust M, Garric J, Giamberini L, Mons R, Abbaci K, Garnier F et Buronfosse T (2010). "Sensitivity of New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) to a specific aromatase inhibitor." Chemosphere **79**(1): 47-53.

Hallare AV, Kosmehl T, Schulze T, Hollert H, Köhler H-R et Triebskorn R (2005). "Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos." Science of the Total Environment **347**(1-3): 254-271.

Hamm JT et Hinton DE (2000). "The role of development and duration of exposure to the embryotoxicity of diazinon." Aquatic Toxicology **48**(4): 403-418.

Hartnik T, Sverdrup LE et Jensen J (2008). "Toxicity of the pesticide alpha-cypermethrin to four soil nontarget invertebrates and implications for risk assessment." Environmental Toxicology and Chemistry **27**(6): 1408-1415.

Hoang TC, Rogevich EC, Rand GM, Gardinali PR, Frakes RA et Bargar TA (2008). "Copper desorption in flooded agricultural soils and toxicity to the Florida apple snail (*Pomacea paludosa*): Implications in Everglades restoration." Environmental Pollution **154**(2): 338-347.

Hoffman DJ et Eastin WC (1981). "Effects of malathion, diazinon, and parathion on mallard embryo development and cholinesterase activity." Environmental Research **26**(2): 472-485.

Howe CM, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Werry K et Veldhoen N (2004). "Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species." Environmental Toxicology and Chemistry **23**(8): 1928-1938.

Ibanez M, Pozo OJ, Sancho JV, Lopez FJ et Hernandez F (2005). "Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1081**(2): 145-155.

IFEN (2007). "Les pesticides dans les eaux. Données 2005." Les dossiers de l'Ifen(09).

Iglesias J, Castillejo J, Ester A, Castro R et Lombardia MJ (2002). "Susceptibility of the eggs of the field slug *Deroceras reticulatum* to contact with pesticides and substances of biological origin on artificial soil." Annals of Applied Biology **140**(1): 53-59.

Iglesias J, Castillejo J, Parama R, Mascato R et Lombardia MJ (2000). "Susceptibility of the eggs of the pest slug *Deroceras reticulatum* to contact with metal salts." Journal of Molluscan Studies **66**: 171-176.

INERIS (2005). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Cuivre et ses dérivés. Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques.

Jansch S, Frampton GK, Rombke J, Van Den Brink PJ et Scott-Fordsmand JJ (2006). "Effects of pesticides on soil invertebrates in model ecosystem and field studies: A review and comparison with laboratory toxicity data." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(9): 2490-2501.

Jolivet C, Boulonne L et Ratié c (2006). Manuel du Réseau de Mesures de la Qualité des Sols, édition 2006. Unité Infosol, INRA Orléans, France 190p.

Jones D, Stringham EG, Babich SL et Candido EPM (1996). "Transgenic strains of the nematode *C. elegans* in biomonitoring and toxicology: Effects of captan and related compounds on the stress response." Toxicology **109**(2-3): 119-127.

Kang S, Choi WI et Ryoo MI (2001). "Demography of *Paronychiurus kimi* (Lee) (Collembola: Onychiuridae) under the influence of glufosinate-ammonium on plaster charcoal substrate and in artificial soil." Applied Soil Ecology **18**(1): 39-45.

Kerney M, Cameron R et Bertrand A (2006). A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe, French ed. Paris, Delachaux et Niestlé SA.

Knacker T, van Gestel CAM, Jones SE, Soares A, Schallnass HJ, Forster B et Edwards CA (2004). "Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME) - An instrument for testing potentially harmful substances: Conceptual approach and study design." Ecotoxicology **13**(1-2): 9-27.

Komárek M, Cadková E, Chrastný V, Bordas F et Bollinger J-C (2010). "Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects." Environment International **36**(1): 138-151.

Konwick BJ, Garrison AW, Avants JK et Fisk AT (2006). "Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Aquatic Toxicology **80**(4): 372-381.

Koolhaas JE, Van Gestel CAM, Rombke J, Soares A et Jones SE (2004). "Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME) - An instrument for testing potentially harmful substances: Effects of carbendazim on soil microarthropod communities." Ecotoxicology **13**(1-2): 75-88.

Kreutz LC, Barcellos LJG, Silva TO, Anziliero D, Martins D, Lorenson M, Marteninghe A et Da Silva LB (2008). "Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings." Ciencia Rural **38**(4): 1050-1055.

Laguerre C, Sanchez-Hernandez JC, Köhler HR, Triebskorn R, Capowiez Y, Rault M et Mazzia C (2009). "B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: An enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure." Environmental Pollution **157**(1): 199-207.

Lalah JO, Severin GF, Schramm KW, Lenoir D, Behechti A, Guenther K et Kettrup A (2007). "Effects of a branched p-nonylphenol isomer (4(3 ',6 '-dimethyl-3 '-heptyl)-phenol) on embryogenesis in *Lymnae stagnalis* L." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **52**(1): 104-112.

Landau-Ossondo M, Rabia N, Jos-Pelage J, Marquet LM, Isidore Y, Saint-Aimé C, Martin M, Irigaray P et Belpomme D (2009). "Why pesticides could be a common cause of prostate and breast cancers in the French Caribbean Island, Martinique. An overview on key mechanisms of pesticide-induced cancer." Biomedicine & Pharmacotherapy **63**(6): 383-395.

Landry D, Dousset S, Fournier J-C et Andreux F (2005). "Leaching of glyphosate and AMPA under two soil management practices in Burgundy vineyards (Vosne-Romanée, 21-France)." Environmental Pollution **138**(2): 191-200.

Lemos MFL, van Gestel CAM et Soares AMVM (2010). "Reproductive toxicity of the endocrine disrupters vinclozolin and bisphenol A in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Latreille, 1804)." Chemosphere **78**(7): 907-913.

Lors C, Ponge J-F, Martínez Aldaya M et Damidot D (2010). "Comparison of solid-phase bioassays and ecoscores to evaluate the toxicity of contaminated soils." Environmental Pollution **158**(8): 2640-2647.

Lupwayi NZ, Harker KN, Clayton GW, O'Donovan JT et Blackshaw RE (2009). "Soil microbial response to herbicides applied to glyphosate-resistant canola." Agriculture Ecosystems & Environment **129**(1-3): 171-176.

Mann RM et Bidwell JR (1999). "The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern australian frogs." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **36**(2): 193-199.

Mansour M, Feicht EA, Behechti A et Scheunert I (1997). "Experimental approaches to studying the photostability of selected pesticides in water and soil." Chemosphere **35**(1-2): 39-50.

Manzo S (2004). "Sea urchin embryotoxicity test: proposal for a simplified bioassay." Ecotoxicology and Environmental Safety **57**(2): 123-128.

Marc J, Le Breton M, Cormier P, Morales J, Belle R et Mulner-Lorillon O (2005). "A glyphosate-based pesticide impinges on transcription." Toxicology and Applied Pharmacology **203**(1): 1-8.

Martikainen E, Haimi J et Ahtiainen J (1998). "Effects of dimethoate and benomyl on soil organisms and soil processes - a microcosm study." Applied Soil Ecology **9**(1-3): 381-387.

Mazzia C, Capowiez Y, Sanchez-Hernandez JC, Köhler H-R, Triebskorn R et Rault M (2011). "Acetylcholinesterase activity in the terrestrial snail *Xeropicta derbentina* transplanted in apple orchards with different pesticide management strategies." Environmental Pollution **159**(1): 319-323.

McComb BC, Curtis L, Chambers CL, Newton M et Bentson K (2008). "Acute toxic hazard evaluations of glyphosate herbicide on terrestrial vertebrates of the oregon coast range." Environmental Science and Pollution Research **15**(3): 266-272.

Menezes Filho A, dos Santos FN et de Paula Pereira PA (2010). "Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes." Talanta **81**(1-2): 346-354.

Michalková V et Pekár S (2009). "How glyphosate altered the behaviour of agrobiont spiders (Araneae: Lycosidae) and beetles (Coleoptera: Carabidae)." Biological Control **51**(3): 444-449.

Millet M, Wortham H, Sanusi A et Mirabel P (1997). "Atmospheric contamination by pesticides: Determination in the liquid, gaseous and particulate phases." Environmental Science and Pollution Research **4**(3): 172-180.

Mirlean N, Roisenberg A et Chies JO (2007). "Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil)." Environmental Pollution **149**(1): 10-17.

Modesto KA et Martinez CBR (2010). "Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*." Chemosphere **78**(3): 294-299.

Moser T, Schallnass HJ, Jones SE, Van Gestel CAM, Koolhaas JE, Rodrigues JML et Rombke J (2004a). "Ring-testing and field-validation of a terrestrial model ecosystem (TME) - An instrument for testing potentially harmful substances: Effects of carbendazim on nematodes." Ecotoxicology **13**(1-2): 61-74.

Moser T, Van Gestel CAM, Jones SE, Koolhaas JE, Rodrigues JML et Rombke J (2004b). "Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME) - An instrument for testing potentially harmful substances: Effects of carbendazim on enchytraeids." Ecotoxicology **13**(1-2): 89-103.

Mougin C, Boukcim H et Jolivalt C (2009). Soil Bioremediation Strategies Based on the Use of Fungal Enzymes. Advances in Applied Bioremediation, Springer Berlin Heidelberg. **17:** 123-149.

Nagel R (2002). "DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* - a general model in ecotoxicology and toxicology." Altex-Alternativen Zu Tierexperimenten **19**: 38-48.

Newman M, Crane M et Holloway G (2006). "Does pesticide risk assessment in the European Union assess long-term effects?" Reviews of Environmental Contamination and Toxicology **187**: 1-65.

Notten MJM, Oosthoek AJP, Rozema J et Aerts R (2005). "Heavy metal concentrations in a soil-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient." Environmental Pollution **138**(1): 178-190.

Novais SC, Soares AMVM et Amorim MJB (2010). "Can avoidance in *Enchytraeus albidus* be used as a screening parameter for pesticides testing?" Chemosphere **79**(2): 233-237.

OCDE (1984a). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2 : Effets sur les systèmes biologiques. Essai n° 205: Oiseaux, essai de toxicité liée au régime alimentaire. Organisation de coopération et de développement économiques

OCDE (1984b). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2 : Effets sur les systèmes biologiques. Essai n° 206: Oiseaux, essai de reproduction. Organisation de coopération et de développement économiques

OCDE (1998a). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2 : Effets sur les systèmes biologiques. Essai n° 213: Abeille domestique, essai de toxicité aiguë par voie orale. Organisation de coopération et de développement économique

OCDE (1998b). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2 : Effets sur les systèmes biologiques. Essai n° 214: Abeille domestique, essai de toxicité aiguë par contact. Organisation de coopération et de développement économiques

OCDE (2000a). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2 : Effets sur les systèmes biologiques. Essai n° 216: Micro-organismes du sol : essai de transformation de l'azote. Organisation de coopération et de développement économiques

OCDE (2000b). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2 : Effets sur les systèmes biologiques. Essai n° 217: Micro-organismes du sol : essai de transformation du carbone. Organisation de coopération et de développement économiques

OCDE (2010). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2 : Effets sur les systèmes biologiques. Essai n° 223 : Oiseaux, essai de toxicité orale aiguë. Organisation de coopération et de développement économiques

Oliveira-Filho EC, Geraldino BR, Grisolia CK et Paumgartten FJ (2005). "Acute toxicity of endosulfan, nonylphenol ethoxylate, and ethanol to different life stages of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835)." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **75**(6): 1185-90.

Pagano G (2001). "Factors affecting R6 fungicide toxicity on sea urchin fertilization and early development: Roles of exposure routes and mixture components." Human & Experimental Toxicology **20**(8): 404-411.

Pampulha M et Oliveira A (2006). "Impact of an herbicide combination of bromoxynil and prosulfuron on soil microorganisms." Current Microbiology **53**(3): 238-243.

PAN-Europe et MDRGF (2008). "Message dans une bouteille". Etude sur la présence de résidus de pesticides dans le vin.

Pergher G, Gubiani R et Tonetto G (1997). "Foliar deposition and pesticide losses from three air-assisted sprayers in a hedgerow vineyard." Crop Protection **16**(1): 25-33.

Perkins PJ, Boermans HJ et Stephenson GR (2000). "Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay - *Xenopus*." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(4 I): 940-945.

Peveling R, Rafanomezantsoa J-J, Razafinirina R, Tovonkery R et Zafimaniry G (1999). "Environmental impact of the locust control agents fenitrothion, fenitrothion-esfenvalerate and triflumuron on terrestrial arthropods in Madagascar." Crop Protection **18**(10): 659-676.

Pietrock M, Meinelt T et Marcogliese DJ (2008). "Effects of cadmium exposure on embryogenesis of *Stagnicola elodes* (Mollusca, Gastropoda): Potential consequences for parasite transmission." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **55**(1): 43-48.

Powell JR, Levy-Booth DJ, Gulden RH, Asbil WL, Campbell RG, Dunfield KE, Hamill AS, Hart MM, Lerat S, Nurse RE, Pauls KP, Sikkema PH, Swanton CJ, Trevors JT et Klironomos JN (2009). "Effects of genetically modified, herbicide-tolerant crops and their management on soil food web properties and crop litter decomposition." Journal of Applied Ecology **46**(2): 388-396.

Prischmann DA, James DG, Wright LC, Teneyck RD et Snyder WE (2005). "Effects of chlorpyrifos and sulfur on spider mites (Acari: Tetranychidae) and their natural enemies." Biological Control **33**(3): 324-334.

Radwan MA, El-Gendy KS et Gad AF (2010). "Biomarkers of oxidative stress in the land snail, *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution." Chemosphere **79**(1): 40-46.

Readman JW, Albanis TA, Barcelo D, Galassi S, Tronczynski J et Gabrielides GP (1993). "Herbicide contamination of Mediterranean estuarine waters: Results from a MED POL pilot survey." Marine Pollution Bulletin **26**(11): 613-619.

Readman JW, Albanis TA, Barcelo D, Galassi S, Tronczynski J et Gabrielides GP (1997). "Fungicide contamination of Mediterranean estuarine waters: Results from a MED POL pilot survey." Marine Pollution Bulletin **34**(4): 259-263.

Regoli F, Gorbi S, Fattorini D, Tedesco S, Notti A, Machella N, Bocchetti R, Benedetti M et Piva F (2006). "Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicological effects of urban pollution: an integrated approach." Environmental Health Perspectives **114**(1): 63-69.

Reinecke S et Reinecke A (2007). "The impact of organophosphate pesticides in orchards on earthworms in the Western Cape, South Africa." Ecotoxicology and Environmental Safety **66**(2): 244-251.

Rombke J, Van Gestel CAM, Jones SE, Koolhaas JE, Rodrigues JML et Moser T (2004). "Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME) - An instrument for testing potentially harmful substances: Effects of carbendazim on earthworms." Ecotoxicology **13**(1-2): 105-118.

Russel WMS et Burch RL (1959). The principles of humane experimental technique. London, Methuen 238p.

Salbego J, Pretto A, Gioda CR, de Menezes CC, Lazzari R, Radünz Neto J, Baldisserotto B et Loro VL (2010). "Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava

(*Leporinus obtusidens*)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology: 1-6.

Sancho E, Villarroel MJ, Fernandez C, Andreu E et Ferrando MD (2010). "Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*)." Ecotoxicology and Environmental Safety **73**(3): 370-376.

Santos MJG, Soares AMVM et Loureiro S (2010). "Joint effects of three plant protection products to the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus* and the collembolan *Folsomia candida*." Chemosphere **80**(9): 1021-1030.

Sawasdee B et Köhler H-R (2009). "Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia)." Chemosphere **75**(11): 1539-1547.

Schaeffer A, Van Den Brink PJ, Heimbach F, Hoy SP, de Jong FMW, Rombke J, Roß-Nickoll M et Sousa JP (2010). Semi-field methods for the environmental risk assessment of pesticides in soil, 1st ed. Boca Raton, CRC Press 144pp.

Scheifler R, Gomot de Vaufleury A et Badot PM (2002). "Transfer of cadmium from plant leaves and vegetable flour to the snail *Helix aspersa*: bioaccumulation and effects." Ecotoxicology and Environmental Safety **53**(1): 148-153.

Scheyer A, Morville S, Mirabel P et Millet M (2007). "Variability of atmospheric pesticide concentrations between urban and rural areas during intensive pesticide application." Atmospheric Environment **41**(17): 3604-3618.

Scheyer A, Morville S, Mirabel P et Millet M (2008). "Gas/particle partitioning of lindane and current-used pesticides and their relationship with temperature in urban and rural air in Alsace region (east of France)." Atmospheric Environment **42**(33): 7695-7705.

Schirling M, Bohlen A, Triebskorn R et Köhler HR (2006). "An invertebrate embryo test with the apple snail *Marisa cornuarietis* to assess effects of potential developmental and endocrine disruptors." Chemosphere **64**(10): 1730-1738.

Schmidt B et Butzbach T (2003). Field leaching of glufosinate-ammonium following application to oilseed rape in autumn. Institut Fresenius, Chemische und Biologische Laboratorien AG, Germany and Bayer CropScience GmbH. Frankfurt, Germany. Document No: C030188, unpublished, reported in "Final addendum to the Draft Assessment Report (DAR)".

Schneider MI, Sanchez N, Pineda S, Chi H et Ronco A (2009). "Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach." Chemosphere **76**(10): 1451-1455.

Schreck E, Geret F, Gontier L et Treilhou M (2008). "Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*." Chemosphere **71**(10): 1832-1839.

Schummer C, Mothiron E, Appenzeller BMR, Rizet AL, Wennig R et Millet M (2010). "Temporal variations of concentrations of currently used pesticides in the atmosphere of Strasbourg, France." Environmental Pollution **158**(2): 576-584.

Schuytema GS, Nebeker AV et Griffis WL (1994). "Effects of dietary exposure to forest pesticides on the brown garden snail *Helix aspersa* Muller." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **26**(1): 23-28.

Siimes K, Ramo S, Welling L, Nikunen U et Laitinen P (2006). "Comparison of the behaviour of three herbicides in a field experiment under bare soil conditions." Agricultural Water Management **84**(1-2): 53-64.

Smit MGD, Kater BJ, Jak RG et van den Heuvel-Greve MJ (2006). "Translating bioassay results to field population responses using a Leslie-matrix model for the marine amphipod *Corophium volutator*." Ecological Modelling **196**(3-4): 515-526.

Snyman RG, Reinecke AJ et Reinecke SA (2005). "Quantitative changes in the digestive gland cells of the snail *Helix aspersa* after exposure to the fungicide copper oxychloride." Ecotoxicology and Environmental Safety **60**(1): 47-52.

Sochová I, Hofman J et Holoubek I (2006). "Using nematodes in soil ecotoxicology." Environment International **32**(3): 374-383.

SOeS (2010). "Les pesticides dans les milieux aquatiques: données 2007." Etudes et Documents **26**.

Sparling DW, Matson C, Bickham J et Doelling-Brown P (2006). "Toxicity of glyphosate as Glypro® and LI700 to red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) embryos and early hatchlings." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(10): 2768-2774.

Stokes JD, Paton GI et Semple KT (2005). "Behaviour and assessment of bioavailability of organic contaminants in soil: relevance for risk assessment and remediation." Soil Use and Management **21**: 475-486.

Strickland TC, Potter TL et Joo H (2004). "Tebuconazole dissipation and metabolism in Tifton loamy sand during laboratory incubation." Pest Management Science **60**(7): 703-709.

Strmac M, Oberemm A et Braunbeck T (2002). "Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae." Journal of Fish Biology **60**(1): 24-38.

Sutherland AM, Gubler WD et Parrella MP (2010). "Effects of fungicides on a mycophagous coccinellid may represent integration failure in disease management." Biological Control **54**(3): 292-299.

Tate TM, Spurlock JO et Christian FA (1997). "Effect of glyphosate on the development of *Pseudosuccinea columella* snails." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **33**(3): 286-289.

Tejada M (2009). "Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides." Chemosphere **76**(3): 365-373.

Tsui MTK et Chu LM (2003). "Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: Comparison between different organisms and the effects of environmental factors." Chemosphere **52**(7): 1189-1197.

UIPP (2009). Rapport d'activité 2008-2009. Union des Industries et de la Protection des Plantes.

van Gestel CAM, Koolhaas JE, Schallnass HJ, Rodrigues JML et Jones SE (2004). "Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME) - An instrument for testing potentially harmful substances: Effects of carbendazim on nutrient cycling." Ecotoxicology **13**(1-2): 119-128.

van Gestel CAM et Weeks JM (2004). "Recommendations of the 3rd international workshop on earthworm ecotoxicology, Aarhus, Denmark, August 2001." Ecotoxicology and Environmental Safety **57**(1): 100-105.

Veiga F, Zapata JM, Fernandez Marcos ML et Alvarez E (2001). "Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain." The Science of The Total Environment **271**(1-3): 135-144.

Villanneau E, Saby NPA, Arrouays D, Jolivet CC, Boulonne L, Caria G, Barriuso E, Bispo A et Briand O (2009). "Spatial distribution of lindane in topsoil of Northern France." Chemosphere **77**(9): 1249-1255.

Vischetti C, Cardinali A, Monaci E, Nicelli M, Ferrari F, Trevisan M et Capri E (2008). "Measures to reduce pesticide spray drift in a small aquatic ecosystem in vineyard estate." Science of the Total Environment **389**(2-3): 497-502.

Vismara C, Battista V, Vailati G et Bacchetta R (2000). "Paraquat induced embryotoxicity on *Xenopus laevis* development." Aquatic Toxicology **49**(3): 171-179.

Volkmar C, Lübke-Al Hussein M, Jany D, Hunold I, Richter L, Kreuter T et Wetzel T (2003). "Ecological studies on epigeous arthropod populations of transgenic sugar beet at Friemar (Thuringia, Germany)." Agriculture Ecosystems & Environment **95**(1): 37-47.

Vong P-C, Nguyen C et Guckert A (2007). "Fertilizer sulphur uptake and transformations in soil as affected by plant species and soil type." European Journal of Agronomy **27**(1): 35-43.

Walorczyk S et Gnusowski B (2009). "Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction and gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1216**(37): 6522-6531.

Wang YS, Jaw CG et Chen YL (1994). "Accumulation of 2,4-D and glyphosate in fish and water hyacinth." Water Air and Soil Pollution **74**(3-4): 397-403.

Weisbrod AV, Sahi J, Segner H, James MO, Nichols J, Schultz I, Erhardt S, Cowan-Ellsberry C, Bonnell M et Hoeger B (2008). "The state of in vitro science for use in bioaccumulation assessments for fish." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(1): 86-96.

White PM, Potter TL et Culbreath AK (2010). "Fungicide dissipation and impact on metolachlor aerobic soil degradation and soil microbial dynamics." Science of the Total Environment **408**(6): 1393-402.

Yasmin S et D'Souza D (2007). "Effect of pesticides on the reproductive output of *Eisenia fetida*." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **79**(5): 529-532.

PARTIE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1 Biologie, élevage et exposition des escargots

II.1.1 L'escargot *Helix aspersa*

L'escargot *Helix aspersa* (syn. *Cantareus aspersus* ou *Cornu aspersum* O.F. Müller, 1774) sous-espèce *aspersa*, communément appelé Petit-Gris, est un mollusque gastéropode pulmoné appartenant à l'ordre des stylommatophores, famille des helicidae, sous-famille des helicinae (http://inpn.mnhn.fr/isb/index.jsp).

Sa coquille, dextre, est de couleur brun-jaunâtre avec un diamètre variant de 20 à 35 mm et une hauteur de 25 à 40 mm (Figure II.1). Deux grandes parties sont distinguées : le pied et les viscères (Figure II.2). Les viscères correspondent aux organes situés à l'intérieur de la coquille et comprennent le rein, l'hépatopancréas, le cœur et une partie de l'appareil génital qui se prolonge également dans le pied (Figure II.3). Le pied comporte essentiellement la sole pédieuse, musculeuse, la partie antérieure du tube digestif et le système nerveux.

Figure II.1. Escargot *Helix aspersa.*

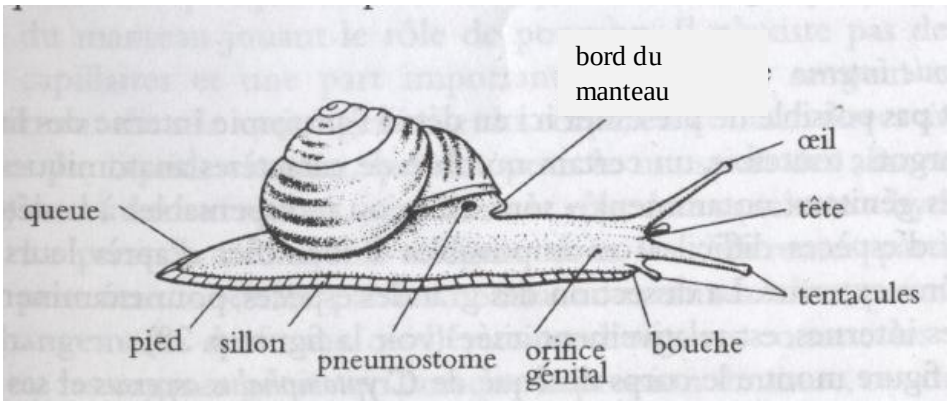


Figure II.2. Morphologie externe de l'escargot (d'après Kerney *et al.* 2006).

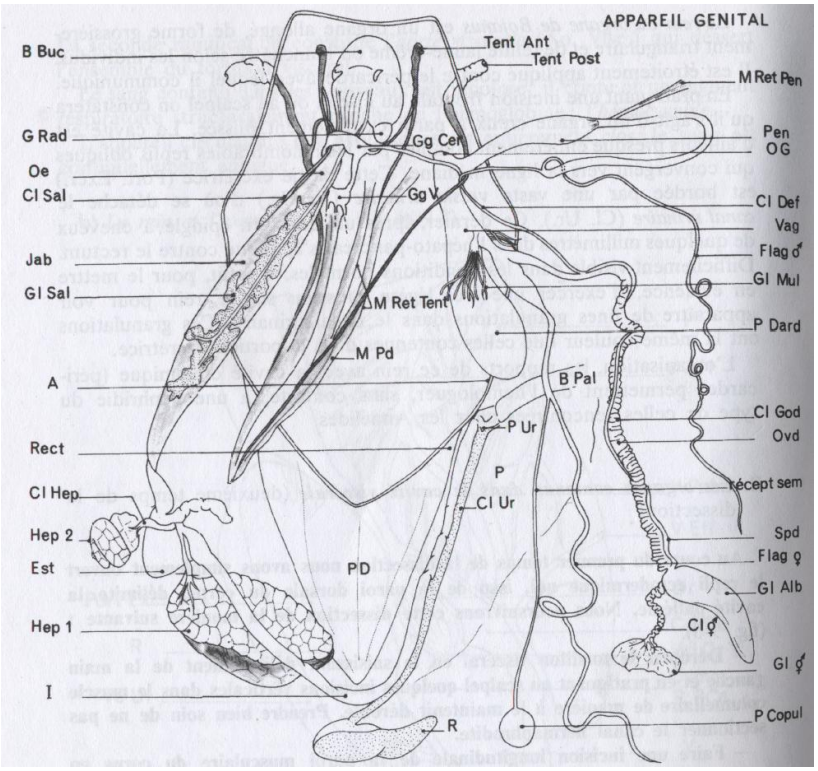


Figure II.3. Anatomie interne (appareils génital et digestif) de l'escargot *Helix aspersa* (d'après Beaumont et Cassier 1998). Légende : Tube digestif : A, anus ; B.Buc, bulbe buccal ; Cl.Hep, canal hépatopancréatique ; Cl.sal, canal salivaire ; Est, estomac ; Gl.Sal, glande salivaire ; G.rad, gaine de la radula ; Hep.1, lobe hépatopancréatique principal (lobe droit) ; Hep.2, lobe hépatopancréatique accessoire ou du tortillon (lobe gauche) ; I, intestin ; Jab, jabot ; Oe, œsophage ; Rect, rectum. Principaux organes : B.Pal, bourrelet palléal ; Cl.Ur, canal urinaire ; Gg.Cer, ganglions cérébroïdes ; Gg.V, masse ganglionnaire ventrale ; M.Pd, muscles pédieux ; M.Rect.Tent, muscles rétracteurs des tentacules ; P, poumon ; PD, pied ; P.Ur, pore urinaire ; R, rein ; Tent.Ant, tentacule antérieur ; Tent.Post, tentacule postérieur. Appareil génital : Cl.Def, canal déférent ; Cl.God, canal godronné ; Cl.♀♂, canal hermaphrodite ; Flag♂, flagelle mâle ; Flag♀, flagelle femelle ; Gl.Alb, glande à albumen ; Gl.Mul, glande multifide ; Gl♀♂, glande hermaphrodite ou gonade ; M.Ret.Pen, muscle rétracteur du pénis ; O.G, orifice génital ; Ovd, oviducte ; P.Copul, poche copulatrice ; P.Dard, poche du dard ; Pen, pénis ; recept.sem, réceptacle séminal ; Spd, spermiducte ; Vag, vagin.

L'escargot Petit-Gris est très répandu en Europe, en particulier dans les régions méditerranéennes et océaniques. Il colonise les milieux anthropisés et peut être considéré comme une peste dans les jardins. On le retrouve également dans les dunes, les bois, les rochers, les haies mais également dans les zones cultivées (Kerney *et al.* 2006). Il se nourrit principalement de plantes, de lichens et de champignons. Son régime alimentaire n'est pas spécialisé et l'escargot s'adapte en fonction des plantes qui colonisent le milieu (Chevalier *et al.* 2001). Le sol fait également partie de son alimentation et peut influencer sa croissance (Gomot *et al.* 1989). Des sols pauvres en calcium peuvent constituer un facteur limitant à la croissance des escargots, le calcium étant un élément indispensable à la formation de la

coquille (Dallinger *et al.* 2001). L'escargot compte de nombreux prédateurs, aussi bien des vertébrés, comme les oiseaux (grive), les petits mammifères (musaraigne, hérisson), les reptiles (lézard, couleuvre), que des invertébrés, comme les carabes, les vers luisants et les limaces (Barker 2004). L'homme le consomme également pour sa chair très appréciée, bien qu'en quantité moindre (15 tonnes de conserves en France en 2008) que l'escargot de Bourgogne *Helix pomatia* (876 tonnes de conserves en France en 2008). Le marché de l'escargot (toutes espèces comestibles confondues) est évalué à environ 2000 tonnes de conserves et 3000 tonnes de préparations culinaires à base d'escargot pour un chiffre d'affaire de l'ordre de 100 millions d'euros (http://www.adepale.org/index.php?id=153).

Le Petit-Gris est surtout actif la nuit et en période humide. Le jour ou lorsqu'il fait trop sec, il entre en estivation en se fixant contre une paroi et en obturant sa coquille d'un voile blanchâtre, l'épiphragme. A partir du mois d'octobre en Europe, l'escargot hiberne en s'enfouissant dans le sol. Sa coquille est alors obturée par un épiphragme épais. Il reprend généralement son activité au printemps quand les températures avoisinent les 12-14°C (Marasco et Murciano 2003; Kerney *et al.* 2006).

La reproduction des escargots a lieu au printemps et en été. Les escargots terrestres sont hermaphrodites protandres (d'abord mâles puis femelles) et s'accouplent une ou plusieurs fois avant la ponte. Au cours de l'accouplement réciproque, ils vont échanger leurs spermatophores qui contiennent les spermatozoïdes. La fécondation croisée est la règle générale, l'autofécondation étant extrêmement rare. Lors de l'accouplement, il se peut qu'un seul des deux escargots reçoive un spermatophore du fait que les spermatozoïdes ne soient pas encore arrivés à maturation chez l'autre escargot. En effet, ils ne sont pas tous matures au même moment du fait de l'asynchronisme du développement du tractus génital pendant la croissance (Bride et Gomot 1991). Avant l'accouplement, les deux escargots effectuent une parade amoureuse durant laquelle ils se touchent avec leurs tentacules puis pour initier l'accouplement, ils piquent le pied du partenaire avec un dard calcaire (Figure II.4), fabriqué dans la poche du dard (Figure II.3). Ils se placent ensuite tête-bêche pour que leurs orifices génitaux soient en vis-à-vis et permettent l'introduction réciproque des pénis (Figures II.5). L'accouplement peut durer plus de 12h. Les spermatozoïdes échangés, préalablement développés dans l'ovotestis (également appelé gonade), rejoignent le réceptacle séminal ou la spermathèque divisée en tubules (Figure II.6) où ils vont être conservés jusqu'à la maturation des ovules. La fécondation a lieu au niveau de la chambre de fertilisation, à la surface de la glande à albumen, généralement une quinzaine de jours après l'accouplement. Les ovocytes fécondés sont alors entourés d'albumen secrété par la glande à albumen, qui constitue les

réserves nutritives pour le développement embryonnaire, puis d'une coque calcaire (Figure II.7). Pour pondre, l'escargot creuse avec sa tête une cavité d'une profondeur de 2-3 cm dans le sol, et y dépose une ponte constituée d'une centaine d'œufs en moyenne (Figure II.8). La ponte peut durer jusqu'à 36 heures. Les œufs vont ensuite se développer pendant 12-15 jours avant d'éclore. Les escargots éclos remontent ensuite en surface, ce qui peut encore prendre 4 à 5 jours (Le Calve 1989). Les jeunes éclos pèsent alors environ 25-35 mg.

Figure II.4. Escargots en accouplement avec le dard (flèche) du partenaire planté dans la masse pédieuse.

Figure II.5. Escargots en accouplement.

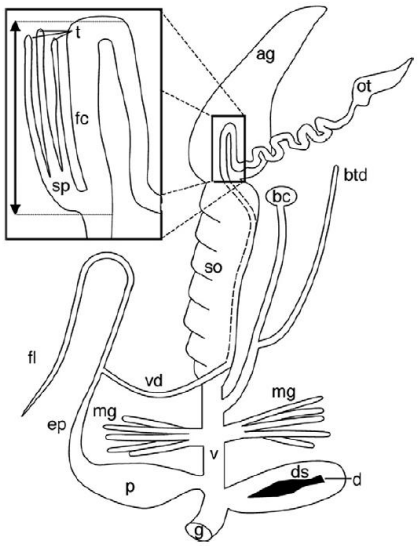


Figure II.6. Spermathèque *d'Helix aspersa* d'après Evanno et Madec (2007). Légende : Ag, glande à albumen ; bc, bourse copulatrice ; btd, diverticule de la bourse copulatrice ; d, dard ; ds, sac du dard ; ep, epiphallus ; fc, chambre de fertilisation ; fl, flagelle ; g, pore génital ; mg, glandes multifides ; ot, ovotestis ; p, penis ; so, spermoviducte (canal godronné) ; sp, spermathèque ; t, tubule ; v, vagin ; vd, canal déférent.

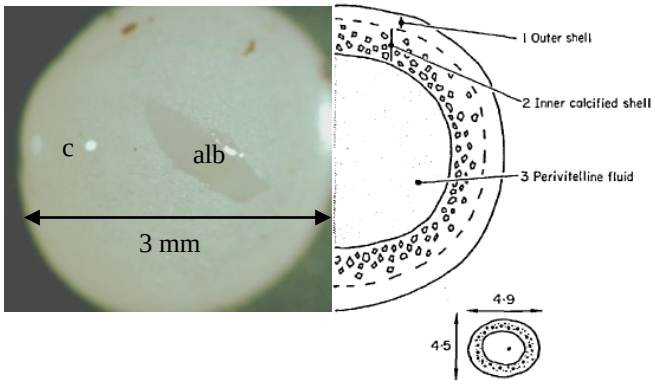


Figure II.7. Photographie et structure d'un œuf d'*Helix aspersa* d'après Bayne (1968). Légende : c, coque calcaire ; alb, albumen.

Figure II.8. Ponte d'*Helix aspersa* incubant sur du papier humidifié.

La croissance de l'escargot correspond à une prise de poids pouvant atteindre jusqu'à 14 g en conditions contrôlées favorables (photopériode 18 h de lumière par 24 h, 20°C et 80-90% d'humidité) et à un accroissement de la coquille en longueur, mais également en épaisseur (Gomot de Vaufleury 2001). La croissance des escargots est caractérisée par 4 phases. Ils sont appelés « jeunes éclos » jusqu'à environ 1 g (correspondant à 1 mois), puis sont qualifiés de juvéniles jusqu'à environ 5 g et de subadultes jusqu'à 8-9 g. Lorsque les escargots atteignent la taille adulte après environ 4 mois de croissance en conditions contrôlées favorables, ils se bordent (phénomène caractérisé par le bord de la coquille qui s'incurve et par un épaississement du bord du manteau). La croissance de la coquille s'arrête alors, du moins en longueur, et les escargots, devenus adultes, terminent leur maturation sexuelle et deviennent aptes à se reproduire.

En milieu naturel, la croissance est beaucoup plus longue et dure de 1 à 2 ans selon les conditions climatiques. La durée de vie en milieu naturel est en moyenne de 3-4 ans.

II.1.2 Les conditions de l'élevage au laboratoire Chrono-Environnement (LCE)

Le laboratoire maîtrise l'élevage des escargots depuis de nombreuses années (Gomot et Deray 1987; Gomot 1997; Gomot de Vaufleury 2000; ISO 15952:2006). Les escargots adultes provenant soit d'élevages extérieurs (souche originaire du sud de la France à Cavaillon, utilisée généralement au laboratoire), soit de l'élevage interne du laboratoire, sont élevés en cages pour la reproduction (environ 40 à 50 individus par m²) dans une enceinte régulée où la photopériode est de 18 heures de lumière par jour, la température de 20 ± 2°C et l'humidité d'environ 80% maintenue grâce à des humidificateurs (Figure II.9).

Figure II.9. Salle d'élevage des escargots sous conditions contrôlées.

Les cages (mises au point par Gomot et Deray 1987) sont nettoyées 3 fois par semaine au jet. De la farine alimentaire Helixal® Finition (Chays Co. Ltd., Valdahon, 25800, France) est ensuite déposée ad libitum dans chaque cage. Lorsque des accouplements sont observés, des « pots de ponte », récipients en verre remplis de terreau (terreau horticole SEM support de culture NF 44-551, avec engrais. Matière organique : 82% et pH : 6,5), sont placés dans les cages le soir. Le lendemain matin, les escargots en cours de ponte (Figure III.2.1) sont isolés dans des boîtes à souris. Une fois la ponte terminée, l'escargot est replacé dans sa cage d'origine et les œufs sont sortis du substrat de ponte. Ils sont déposés dans une passoire et lavés dans une bassine d'eau à 20 ± 1°C pour éviter de déposer des particules de sol dans le support d'incubation. Puis ils sont comptés et pesés dans la boîte de Pétri (Stérilin, 90 x 14,2 mm, polystyrène cristal, 3 ergots) contenant du papier absorbant humidifié où se déroulera l'incubation. Les boîtes sont ensuite placées en chambre d'incubation (conditions identiques à celles de la reproduction) jusqu'à l'éclosion des œufs.

La *nursery* est réalisée dans des boîtes à souris, contenant une feuille de papier absorbant humidifiée, fermées par un couvercle plat (Figure II.10). Les jeunes éclos peuvent être une centaine par boîte durant les deux premières semaines de croissance.

Figure II.10. Système d'élevage en boîtes à souris pour la *nursery*.

L'entretien des boîtes (changement du papier et nettoyage des parois et du couvercle) est effectué 3 fois par semaine, tout comme le nourrissage avec de l'aliment Helixal® 1er âge. Pour éviter un effet de groupe négatif (Lucarz et Gomot 1985), la surface est doublée après deux semaines par l'ajout d'une seconde boîte à souris faisant office de couvercle. Un premier tri est effectué pour les escargots ayant atteint 1 g (après environ 3 à 4 semaines), qui sont regroupés afin de former des groupes de masse homogènes. Les escargots atteignant 1 g peuvent désormais:

- être conservés en boîtes en bois (type boîte à camembert) en vue d'être utilisés pour les expériences de toxicité (c'est à ce stade que les escargots sont utilisés dans la norme ISO15952). Cette conservation en boîte sèche, dans un environnement non humide mais à température ambiante (12-18°C) peut durer plusieurs semaines : l'escargot entre en estivation, se fixe et forme un épiphragme.
- continuer leur phase de croissance dans les cages (conditions identiques à la reproduction) et être nourris avec de l'aliment Helixal® 2ème âge. Un second tri est effectué quand les escargots atteignent 5 à 6 g, stade auquel ils sont utilisés pour les essais *in situ* (Figure II.11). Si l'on souhaite produire de nouveaux reproducteurs, la croissance continue avec l'aliment Helixal® Finition jusqu'à ce que les escargots atteignent la maturité sexuelle. Ils peuvent alors servir de reproducteurs pour recommencer un cycle (Figure II.11) ou être placés en hibernation, dans des caisses en bois conservées en chambre froide (4°C).

Le cycle d'élevage des escargots est décrit dans la Figure II.11 qui permet par ailleurs de préciser les différents stades utilisés dans les expériences de la thèse.

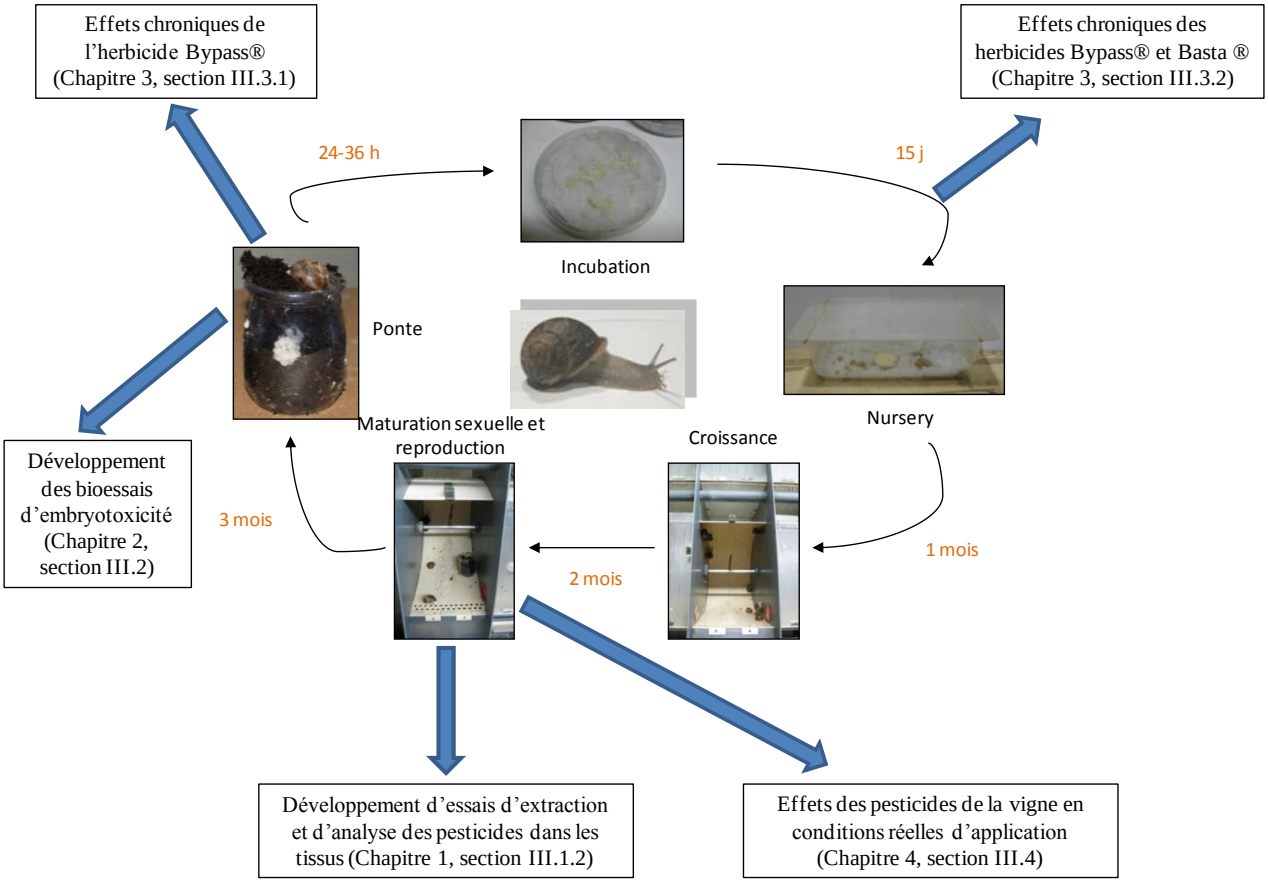


Figure II.11. Cycle d'élevage de l'escargot *Helix aspersa* en conditions contrôlées (d'après Gomot de Vaufleury 2000) en relation avec l'utilisation des différents stades de vie dans les expériences présentées dans la partie de Résultats (Partie III).

II.1.3 Les systèmes d'exposition

II.1.3.1 Les bioessais d'embryotoxicité

Après avoir récupéré les œufs d'une ponte, comme décrit précédemment, ceux-ci sont répartis, au nombre de 10 par réplicat pour le test en phase liquide, ou au nombre de 15 pour les tests en phase solide et gazeuse, dans les supports d'exposition. Ce nombre de réplicats différents en fonction des supports d'exposition a été optimisé en fonction du type de support et de la taille des pontes (ainsi, une ponte de 90 œufs permet de tester 6 à 9 doses d'une substance, en fonction du type de test). A la fin du développement embryonnaire, le pourcentage d'éclosion est déterminé.

Pour le bioessai en phase liquide, les œufs sont déposés dans des boîtes de Pétri (Greiner Bio-one, 35 x 10 mm, polystyrène cristal, 3 ergots) dont le fond est recouvert par 4 feuilles de papier filtre (Whatman grade 1 ; 32 mm de diamètre) imbibées de 0,8 ml de solutions à tester ou d'eau déminéralisée pour le témoin (Figure III.2.7a). Dans un premier temps, ce sont des papiers Whatman de grade 40, filtres quantitatifs en cellulose qui ont été utilisés pour les tests car sans cendre (<0,007%). Cependant, ce papier avait tendance à sécher rapidement ne permettant pas de maintenir une humidité suffisante pour les œufs durant la période d'incubation. Il a donc été remplacé par le Whatman grade 1 (0,06% de cendres), filtre qualitatif en cellulose classiquement utilisé pour les tests de germination des plantes.

Pour le bioessai en phase solide, les œufs sont déposés dans des ramequins en verre contenant du sol témoin ou contaminé, humidifié jusqu'à un certain pourcentage de la capacité au champ. Les ramequins sont recouverts par un couvercle de boîte de Pétri afin de maintenir le taux d'humidité le plus constant possible. Une modalité avec les œufs enfouis dans le sol (environ 2-3 cm) a également été testée (Figures III.2.7b-c).

Pour le bioessai en phase gazeuse, les œufs sont déposés sur un filtre en nylon (180 µm NY8H Millipore) tendu par un élastique sur un pot en verre qui contient le sol humidifié dont on veut tester la toxicité des substances volatiles. Le tout est transposé dans une boîte en plastique ronde fermée dont le fond est recouvert par du papier absorbant humidifié afin de maintenir le plus constant possible le taux d'humidité pendant le développement embryonnaire (Figure III.2.7d).

II.1.3.2 Enceintes pour l'évaluation des effets à long terme (croissance et reproduction)

Les matrices d'exposition pour les deux expériences sont le sol (sol naturel de Bergbieten, cf. section II.2.2) et la nourriture. Les matrices ont été contaminées par des solutions de pesticides pulvérisées sur le sol et la nourriture (préalablement séchés) pour atteindre la concentration souhaitée et un pourcentage d'humidité défini (20% pour la nourriture et 45-60% pour le sol). Afin d'éviter toute dégradation des pesticides, les matrices ont été conservées au congélateur (-30°C) jusqu'au début de l'expérience. Le sol a ensuite été décongelé puis introduit dans les boîtes, les pesticides se dégradant ainsi naturellement au cours du temps. Ce mode d'exposition est qualifié de statique (au sens « normatif » du terme, à savoir sans renouvellement de l'apport de substance ou de matrice à tester). En revanche, la nourriture, aliquotée par petites quantités, a été conservée au congélateur (-30°C) et un

aliquote a été décongelé lors de chaque nourrissage des escargots. Il y a donc eu un nouvel apport de contaminant à chaque nourrissage (3 fois par semaine). Cette exposition est qualifiée de semi-statique ou continue.

Lors de la première expérience (cf. Chapitre 3, section III.3.1), le système d'exposition en boîte à souris (Figure II.12) a été adapté de celui utilisé dans la norme d'évaluation des effets des polluants sur la croissance des escargots juvéniles (ISO 15952:2006). Cependant, à la différence de cette norme, les escargots étaient de jeunes éclos pesant 30-35 mg et non des juvéniles de 1 g. Ils ont été placés par 5 (provenant de 5 pontes différentes) dans les boîtes à souris contenant environ 3 cm de sol contaminé ou non, et humidifié à 45% de sa capacité au champ. Les boîtes à souris ont été entourées de papier aluminium pour éviter la prolifération d'algues ou de moisissures sur les parois de la boîte et ont été fermées par un couvercle plat en polystyrène puis par une autre boîte après 45 jours d'exposition pour adapter la taille du dispositif à l'augmentation de taille des escargots. Le nettoyage des boîtes (ramassage des fèces, nettoyage des parois à l'aide d'un papier absorbant humidifié, rinçage du couvercle à l'eau et pulvérisation du sol avec de l'eau déminéralisée) a été effectué 3 fois par semaine. La nourriture (distribuée à chaque nettoyage) était disposée dans des petites coupelles au centre de la boîte (Figure II.12). Cette expérience a duré 168 jours et a été arrêtée par la fin de la maturation sexuelle marquée par le début des accouplements.

Figure II.12. Système d'exposition des escargots par le sol et la nourriture pour la mesure des effets à long terme durant la 1ère expérience (Chapitre 3, section III.3.1).

Lors de la seconde expérience (cf. Chapitre 3, section III.3.2) évaluant les effets des pesticides sur l'ensemble du cycle de vie, l'exposition a débuté dès le stade embryonnaire. Les œufs ont été exposés par 20, dans le bioessai en phase solide et non recouverts de sol (Figure II.13a). Après l'éclosion, les jeunes éclos ont été placés par 4 (provenant de 4 pontes différentes) dans les boîtes de croissance. Un dispositif différent de la 1ère expérience a été

employé (boîtes rondes), permettant de limiter la quantité de sol à contaminer ; la taille choisie convenait également pour le maintien jusqu'en fin d'expérience des animaux par couple pour le suivi de la reproduction. Ces boîtes contenaient environ 3 cm de sol contaminé ou non, humidifié à 60% de la capacité au champ. Le nettoyage des boîtes et le nourrissage des escargots s'opéraient de la même façon que pour la 1ère expérience. Après les 28 premiers jours d'exposition, les deux escargots les plus légers ont été retirés de chaque dispositif afin de ne suivre qu'un seul couple par boîte durant les phases suivantes de croissance et de reproduction (Figure II.13b). Lorsque les premiers accouplements ont été observés, des supports de ponte contenant du terreau non contaminé ont été enterrés dans le sol des boîtes (Figure II.13c). Lorsque l'escargot avait fini de pondre, le support de ponte était retiré et les œufs, après avoir été comptés et pesés, étaient placés en chambre d'incubation selon le protocole décrit en II.1.2. Le nombre d'éclos, ainsi que le pourcentage d'éclosion ont été déterminés à la fin de l'incubation. Cette expérience a duré 240 jours.

Figure II.13. Dispositifs d'exposition par le sol et la nourriture pour l'évaluation des effets des pesticides sur l'ensemble du cycle de vie de l'escargot durant la 2nde expérience (Chapitre 3, section III.3.2) : (a) développement embryonnaire; (b) croissance; (c) reproduction.

Pour les deux expériences, la masse et le diamètre de la coquille ont été mesurés tous les 28 jours. Chaque escargot a été pesé individuellement et le diamètre de sa coquille a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse.

II.1.3.3 Les microcosmes, exposition in situ

Les microcosmes utilisés pour évaluer les effets sur l'escargot des applications de pesticides en conditions réelles, dans une parcelle de vigne, sont une adaptation de ceux mis au point par Scheifler et *al.* (2003) pour évaluer le transfert de métaux depuis un sol amendé en boues de stations d'épuration. La différence principale réside dans l'utilisation d'une cage entièrement grillagée (parois et couvercle) permettant le passage des pesticides. Chaque microcosme renferme 10 escargots qui disposent d'abris sous formes de 3 morceaux de tuiles posés contre les bords internes de la cage. Les microcosmes sont placés là où la végétation est abondante, généralement sur un pissenlit (plante appréciée des escargots) lorsque c'est possible. Le couvercle est maintenu par 4 piquets s'enfonçant de 15 cm dans le sol à chaque coin de la cage (Figure II.14).

Figure II.14. Microcosme utilisé pour l'évaluation des effets des pesticides appliqués sur une parcelle de vigne sur l'escargot (Chapitre 4, section III.4). Dimensions : cage : 25x25x15 cm ; couvercle : 30x30 cm scellé par 4 piquets. Le maillage est de 1x1 cm.

Les escargots utilisés pour cette expérience pesaient entre 4 et 7 g et ont été conservés, avant d'être placés sur le terrain, dans des boîtes en bois (type « boîte à camembert », cf. section II.1.2). Ils ont été réveillés en boîte à souris (humidité + nourriture), 48 h avant le traitement, puis ont été pesés et mesurés (diamètre de la coquille) 24 h avant. Ils ont ensuite été remis dans les boîtes en bois jusqu'à leur mise en place dans les microcosmes le jour du traitement.

Les escargots sont restés dans les microcosmes jusqu'au jour du traitement suivant (entre 10 et 16 jours suivant les traitements) sauf si l'intervalle de temps entre 2 traitements était de plus de 16 jours (dans ce cas, les escargots ont été récupérés avant le traitement suivant). Ils ont ensuite été prélevés et placés pendant 24 h en boîte à souris humide et sans nourriture au laboratoire ; cette période de jeûne permet aux escargots d'excréter le contenu de leur tube digestif afin d'éviter des biais dans les analyses. Enfin, avant congélation, la masse fraîche totale a été mesurée, de même que le diamètre de coquille.

II.2 Etude *in situ* : une parcelle de vigne à Bergbieten, Alsace

II.2.1 Situation du site d'étude : vigne de Bergbieten

La parcelle viticole d'étude est située à Bergbieten (Bas-Rhin, Alsace), à environ 200 m d'altitude (Figure II.15). Sa surface est de 50 ares et son cépage, du Riesling. Deux zones ont été définies, la parcelle (P) et la bordure (B) (Figure II.16). Une troisième zone constituant le témoin (T), est située chez le propriétaire de la vigne, à Soultz-les-Bains, à environ 1,4 km de la parcelle (Figures II.15-16).

Figure II.15. Photo satellite (Google Maps) de la zone d'étude. La parcelle est délimitée en rouge et la zone témoin en bleue.

Figure II.16. Les 3 zones d'étude : la parcelle (P), la bordure de la parcelle (B) et la zone témoin (T).

II.2.2 Description du sol

Tout au long de ces travaux, le sol de Bergbieten a été utilisé comme substrat d'exposition, que ce soit pour les bioessais d'embryotoxicité ou pour l'étude en laboratoire des effets

chroniques des pesticides ou encore pour étudier la dégradation des herbicides. Il a été prélevé dans la parcelle, dans 2-3 rangs différents sur environ 5 cm de profondeur. Il a ensuite été ramené au laboratoire, séché à l'air libre puis tamisé à 4 mm.

Un échantillon a été envoyé au laboratoire d'analyse des sols d'Arras. Les résultats sont présentés dans le tableau II.1.

Tableau II.1. Résultats d'analyses du sol de Bergbieten caractérisé comme une argile limon-sableuse selon la classification française GEPPA (Baize 2000) ou « clay loam » selon la classification américaine USDA (Soil Survey Staff 1993).

Granulométrie 5 fractions sans décarbonatation (NF X 31-107)	
Argile (< 2 µm)	351 g kg^{-1}
Limons fins (2/20 µm)	292 g kg^{-1}
Limons grossiers (20/50 µm)	103 g kg^{-1}
Sables fins (50/200 µm)	89 g kg^{-1}
Sables grossiers (200/2000 µm)	165 g kg^{-1}
Carbone (C) organique et azote (N) total (NF ISO 10694 et NF ISO 13878)	
Carbone (C) organique	16,8 g kg^{-1}
Azote (N) total	1,59 g kg^{-1}
C/N	10,6
Matière organique	29 g kg^{-1}
pH eau (NF ISO 10390)	8,38
Calcaire (CaCO3) total (NF ISO 10693)	277 g kg^{-1}
Capacité d'échange cationique cobaltihexamine (spectrocolorimétrie) (NF X 31-130)	
CEC cobaltihexamine	20,3 cmol+ kg^{-1}
Ca, Mg, Na, K, Fe, Mn, Al échangeables à la cobaltihexamine (ICP-AES) (Meth. INRA)	
Calcium (Ca)	17,4 cmol+ kg^{-1}
Magnésium (Mg)	4,07 cmol+ kg^{-1}
Sodium (Na)	0,0267 cmol+ kg^{-1}
Potassium (K)	1,26 cmol+ kg^{-1}
Fer (Fe)	0,0258 cmol+ kg^{-1}
Manganèse (Mn)	< 0,005 cmol+ kg^{-1}
Aluminium (Al)	0,136 cmol+ kg^{-1}
Aluminium (Al) méthode Mehra-Jackson (ICP-AES) (Meth. INRA)	0,112 g/100 g
Fer (F) méthode Mehra-Jackson (ICP-AES) (Meth. INRA)	0,818 g/100 g
Cuivre (Cu) total HF (ICP-AES) (selon NF EN ISO 11885)	41,1 mg kg^{-1}

En complément de ces analyses, le pH a été déterminé dans notre laboratoire ainsi que la capacité au champ :

pH eau : 8,05

pH KCl : 7,42

pH $CaCl_2$: 7,45

Capacité au champ : 434,3 ml kg^{-1}.

II.2.3 Entretien de la vigne

Comme cela a déjà été précisé en section I.1.3, le propriétaire de la vigne, Matthieu Moser, fait partie de l'association Tyflo (http://www.tyflo.org) et pratique la viticulture intégrée selon les directives de l'OILB (Organisation Internationale de Lutte Intégrée et Biologique). Cela consiste en une production économiquement viable de raisins de haute qualité, donnant priorité à des méthodes écologiquement plus saines, minimisant les effets non intentionnels indésirables et l'utilisation des produits phytopharmaceutiques, en vue de préserver l'environnement et la santé humaine. Le viticulteur adhérant à Tyflo tient un cahier d'enregistrement dans lequel sont répertoriées toutes les opérations effectuées ainsi que leur justification. Il s'engage à respecter ces directives sur la totalité des surfaces en vigne de son exploitation. Il accepte également de se soumettre aux contrôles réalisés par l'organisme extérieur (Ecotest).

II.2.4 Le cycle cultural des traitements

En 2008, l'année où a eu lieu l'expérimentation dans la parcelle de vigne, 7 traitements ont été effectués du 1er mai à mi-août. Les 6 premiers traitements ont été suivis pour notre expérimentation :

1) Le premier traitement (H1) a eu lieu le 1er mai 2008. C'est un herbicide (H), le Roundup® Flash, qui a été appliqué avec pour action de détruire les herbes poussant sous les pieds de vigne. Il s'effectue par jet projeté (sans air) au niveau du sol (Figure II.17) pour limiter la dérive. Habituellement, le traitement a lieu un jour de beau temps sans vent. La dose était de 4 l ha^{-1} de surface traitée.

2) Le deuxième traitement (F1) a eu lieu le 29 mai 2008. Deux fongicides (F), Valiant® Flash et Corail®, ont été appliqués à raison de 1,8 kg ha^{-1} et 0,24 l ha^{-1}, respectivement. Ils ont pour but de traiter les parties aériennes de la vigne contre le mildiou et l'oïdium. Ce traitement s'effectue par jet porté avec trois buses d'ouvertes de chaque côté (Figure II.18).

Figure II.17. Désherbage sous le rang et traitement des rejets de la vigne au glyphosate par jet projeté (traitement H1).

Figure II.18. Traitement F1 des feuilles de vigne par jet porté.

3) Le troisième traitement (F2) a eu lieu le 11 juin 2008. Les mêmes produits que pour F1 ont été appliqués, aux mêmes concentrations mais avec 5 buses d'ouvertes de chaque côté et donc plus de débit, soit 2,74 kg ha^{-1} de Valiant® Flash et 0,37 l ha^{-1} de Corail®.

4) Le quatrième traitement (F3) a eu lieu le 27 juin 2008. Le fongicide Cabrio® Top a été appliqué à raison de 1,78 kg ha^{-1} pour lutter contre le mildiou avec un débit des buses identique au traitement F2.

5) Le cinquième traitement (F4) a eu lieu le 15 juillet 2008. Les fongicides Bouillie Bordelaise et Thiovit® ont été appliqués à raison de 5,35 kg ha^{-1} avec un débit des buses identique au traitement F2.

6) Le dernier traitement (H2) suivi dans notre étude a été effectué le 25 juillet 2008. L'herbicide Basta® a été appliqué de la même façon que le traitement H1, par jet projeté, à raison de 5 l ha^{-1} de surface traitée.

II.2.5 Mesure des dépôts au sol

Afin de déterminer l'exposition des escargots aux pesticides et d'évaluer l'importance des phénomènes de dérive, les dépôts au sol dans la parcelle et à des distances croissantes de la parcelle ont été mesurés. Deux types de supports de dépôts ont été utilisés : des plaques en acier inoxydable (d'une surface de 1078 cm²) pour les herbicides et des boîtes de Pétri en verre (d'une surface de 154 cm²) pour les fongicides. Ces supports ont été placés (en triplicats) juste avant le traitement, sur la bordure à intervalles réguliers et sous le vent. Pour

les herbicides, la dérive étant limitée, seuls les points à 0, 1, 2 et 3 m ont été quantifiés (Figure II.19). En raison de la proximité des autres vignes (notamment nord-est et sud-ouest, Figure III.4.1), il n'a pas été possible de quantifier les dépôts au sol au-delà de 20 m pour les traitements F1 et F2 et au-delà de 8 m pour le traitement F3, le traitement F4 n'ayant pas été quantifié en termes de dépôts au sol. Une autre contrainte est apparue pour les traitements F1 et F2 car les boîtes de Pétri en verre étant placées en bout de rang (du fait de la direction sud-est du vent ces jours-là, Figure III.4.1), certaines ont été brisées par le passage du tracteur. A la fin du traitement, les supports de dépôt ont été rincés avec le solvant approprié au type de pesticide (Figure II.20) et les flacons ont été conservés au congélateur (-20°C) jusqu'à l'analyse.

Figure II.19. Emplacement des 3 plaques inox permettant de mesurer le dépôt au sol à (a) 0, (b) 1 et (c) 3 m de la parcelle sous le vent lors du traitement H1.

Figure II.20. Récupération des gouttelettes de pesticides sur la plaque de dépôt par rinçage à l'eau (traitement H1).

II.2.6 Bioindication active : protocole d'exposition des escargots sentinelles

Lors de l'étude *in situ* de l'évaluation des effets et du transfert de pesticides à l'escargot en conditions réelles d'application, des microcosmes ont été utilisés (cf. section II.1.3.3).

L'emplacement des microcosmes dans les 3 zones a été déterminé de façon aléatoire. La parcelle a été subdivisée en mailles. Une maille résulte du croisement d'un rang avec un segment défini par 2 piquets, les piquets étant disposés le long de chaque rang (Figure II.21). On obtient ainsi 21 rangs complets et 14 segments (Figure III.4.1). A partir de là, la surface utile a été définie, prenant en compte uniquement les rangs complets et éliminant l'effet de bord en supprimant un segment de part et d'autre du rang et le rang n°1 (en partant du côté N-E). On obtient donc 20 rangs (dont 1 sur 2 est enherbé) et 12 segments (Figure III.4.1, partie grisée).

Figure II.21. Parcelle divisée en rangs (→) et en segments (→).

Pour la parcelle, un tirage aléatoire pour l'emplacement des 3 microcosmes a été réalisé à l'intérieur de la surface utile (Figure III.4.1). Ils ont d'abord été placés sous le pied de vigne (Figure II.22), notamment parce que, pour les herbicides, la pulvérisation est dirigée à cet endroit puis ensuite déplacés après le traitement au centre du rang où la végétation, qui constitue la nourriture de l'escargot, est plus abondante (Figure II.23).

Figure II.22. Microcosme placé sous le pied de vigne.

Figure II.23. Microcosme placé au centre du rang.

Les 3 microcosmes de la bordure ont été placés aux mêmes emplacements que les plaques de dérive, sous le vent à chaque traitement. Lors des traitements H1, F4 et H2, le vent soufflant en direction du Nord, ils ont été placés à intervalle régulier sur la bordure nord-est, plutôt vers le nord (Figure III.4.1). Lors des traitements F1 et F2, les 3 microsomes ont été placés sur la bordure sud-est (côté est). Enfin pour le traitement F3, les microcosmes ont été placés sur la bordure nord-est (côté est). Les 3 microcosmes de la zone témoin ont été placés en fonction de l'abondance de la végétation.

II.3 Les techniques analytiques

Le développement des méthodes analytiques présentées dans ces travaux (mise au point des techniques d'extraction et de dosages), ainsi que les analyses des échantillons, se sont déroulés au Laboratoire des Matériaux, Surfaces et Procédés pour la Catalyse (LMSPC) au sein de l'équipe de Physico-Chimie de l'Atmosphère (LPCA) à Strasbourg.

II.3.1 Présentation des techniques et des appareillages

II.3.1.1 Techniques d'extraction et de purification

II.3.1.1.1 Extraction « Soxhlet »

Le Soxhlet est un appareil qui permet l'extraction de substances chimiques d'une matrice solide. Il peut également être utilisé pour conditionner ou nettoyer un support. C'est dans ce cadre là que nous l'avons utilisé au cours de cette thèse. De la résine SPE (solid phase extraction) est placée dans l'enceinte du Soxhlet. Le principe est de chauffer une quantité de solvant dans un ballon placé sous l'appareil qui, sous l'effet de la température, va se vaporiser. Cette vapeur va monter jusqu'au système de refroidissement (tuyaux en verre dans lesquels passe de l'eau froide), se condenser et retomber dans la partie qui contient la résine. Le solvant va progressivement s'accumuler dans cette partie, puis par un système de siphon, va retourner dans le ballon entrainant avec lui les substances extraites.

II.3.1.1.2 Extraction accélérée par solvant (Accelerated Solvent Extraction, ASE)

L'appareil ASE (ASE 300 Dionex) utilisé dans ce travail est composé de 12 cellules de 33 ou 100 ml. Cette technique consiste à extraire les contaminants d'une matrice solide par un solvant porté à haute température et sous pression de façon à rester liquide. Cela permet de solubiliser et de désorber plus facilement et plus rapidement les analytes tout en utilisant une quantité moindre de solvant qu'avec une extraction au Soxhlet.

Les échantillons solides (sols ou broyats d'escargots) sont placés dans les cellules qui sont complétées avec du sable de Fontainebleau. Les paramètres de la méthode sont ensuite programmés : choix de la température, de la pression, des solvants et de leur pourcentage respectif (s'il y a plusieurs solvants), du pourcentage de « flush » (pourcentage de solvant avec lequel la cellule est renouvelée entre chaque cycle), du temps de purge (temps donné pour vider la cellule du solvant), du nombre de cycles et de leur durée.

A la fin des cycles, le solvant contenant les composés extraits est récupéré et généralement concentré à l'évaporateur rotatif.

II.3.1.1.3 Extraction en phase solide (Solid Phase Extraction, SPE)

Cette technique consiste à faire passer un échantillon aqueux sur des cartouches (contenant de la résine échangeuse d'ions par exemple) qui vont retenir les molécules à analyser. Une élution avec un faible volume de solvant permet de concentrer l'échantillon de départ. Cette technique peut également être utilisée pour changer de solvant ou purifier l'échantillon (Chapuis *et al.* 2005). Trois étapes sont nécessaires. L'adsorbant contenu dans la cartouche d'extraction est conditionné (cela permet de mouiller le support en solvatant les groupements fonctionnels présents à sa surface). La deuxième étape consiste à faire passer l'échantillon sur la cartouche ce qui va permettre aux molécules-cibles d'être retenues par affinité. Une étape de lavage peut être mise en place afin de retirer les interférents (on choisit un solvant de faible force éluante afin de maintenir en place les composés d'intérêts). Enfin, les composés d'intérêt sont élués avec un éluant spécifique. Dans ces travaux, la SPE a fait l'objet d'essais pour la purification d'extraits d'escargots contenant du glyphosate.

II.3.1.1.4 Réduction du volume à l'évaporateur rotatif

L'appareil utilisé (Rotovapor Büchi R 200/205) est un système qui permet de concentrer des échantillons : il est composé d'une pompe qui permet de faire le vide dans le système ce qui permet d'abaisser la température d'ébullition. L'échantillon à concentrer est placé dans le ballon d'évaporation qui, tout en tournant, baigne dans le bain chauffant (la rotation assure un mélange intime et homogène de l'échantillon tout en évitant une surchauffe stationnaire dans le ballon). Le solvant se transforme ainsi en vapeur et pénètre dans le système réfrigérant qui est traversé par une colonne où circule de l'eau froide. Il y a phénomène de condensation et le solvant retombe dans le ballon récepteur sous forme liquide.

II.3.1.1.5 Chromatographie flash

Cette technique sert à séparer différents composés d'un mélange ou éliminer des impuretés par passage de l'échantillon sur une colonne (ou cartouche) à l'aide de différents solvants. L'appareil comprend une pompe interne qui va puiser le solvant dans un flacon et l'entrainer dans la cartouche (selon un débit défini) avant d'être récupéré dans un autre flacon. La cartouche est généralement conditionnée avec du solvant avant d'injecter l'échantillon à l'aide d'une seringue.

Dans ces travaux de thèse, la chromatographie flash a été utilisée avec un Combi Flash graduate (Teledyne Isco) dans le but d'éliminer les impuretés contenues dans un extrait d'escargot et d'obtenir différentes élutions dont une contenant uniquement les composés que l'on souhaite analyser.

II.3.1.2 Techniques de séparation et d'identification

II.3.1.2.1 Chromatographie en phase liquide haute performance (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) et détection par spectrofluorimétrie (HPLC-Fluo)

Appareillage : Kontron Instruments : pompes : Pump 420 ; mélangeur : M491 ; dégazeur : Bio-Tek Kontron Instruments 3493 ; injecteur : autosampler 465 ; thermostat controller 402, détecteur Bio-Tek Instruments.

Cette technique consiste à séparer les différents constituants d'un échantillon par rétention sur une colonne (en jouant notamment sur la polarité des molécules). Les aires obtenues aux

différents temps de rétention permettent de quantifier les constituants. Dans ces travaux, l'HPLC a permis la séparation et la détection du glyphosate, de son métabolite l'AMPA et du glufosinate.

Deux solvants sont entraînés à l'aide de pompes, ils passent d'abord dans un dégazeur (élimination des gaz dissous dans le solvant) puis ensuite un mélangeur (ils sont mélangés de façon homogène et constituent la phase mobile) et arrivent ensuite au niveau de la colonne où l'échantillon a été déposé. Le flux constant de la phase mobile va entraîner l'échantillon sur la phase stationnaire et des affinités plus ou moins fortes vont se créer entre elle et les solutés. La phase mobile élue au fur et à mesure les composés liés à la phase stationnaire. C'est le temps passé en phase stationnaire qui va déterminer la progression du soluté. A la sortie de la colonne, les composés sont détectés par le spectromètre à fluorescence, formant des pics sur le chromatogramme dont les aires sont proportionnelles à la quantité du composé injecté. La colonne utilisée dans ces travaux est une C_{18} en phase inverse (Waters NovaPak C_{18}, 300 x 3,9 mm), c'est à dire que la phase stationnaire est apolaire et les solvants sont l'eau (le plus polaire) et l'acétonitrile (ACN). Deux modes d'élution peuvent être utilisés, le mode isocratique où le pourcentage entre les deux solvants en mélange reste constant durant l'analyse ou le mode « gradient d'élution » où les pourcentages des deux solvants varient durant l'analyse afin d'éluer au mieux les molécules. C'est le gradient d'élution qui a été utilisé dans ce travail avec un débit de 1 ml min^{-1} (Figure II.24).

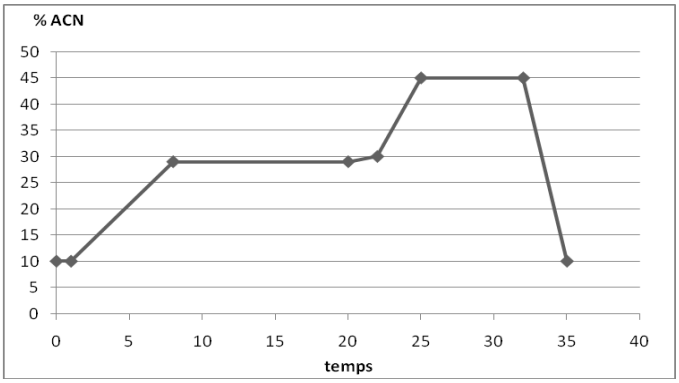


Figure II.24. Gradient d'élution utilisé pour l'analyse des herbicides par HPLC-Fluo.

Pour la détection, les longueurs d'onde ont été sélectionnées à 260 nm pour l'excitation et 310 nm pour l'émission. Les temps d'élution moyens obtenus sont : glyphosate = 15,76 ± 0,85 min; AMPA = 18,47 ± 1,02 min ; glufosinate = 22,02 ± 1,28 min (calculés sur une période d'environ un mois).

II.3.1.2.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Gaz-chromatography – Mass spectrometry, GC-MS)

Appareillage : Chromatographe Autosystem XL GC Perkin Elmer équipé d'un « auto-sampler » et d'un injecteur split-splitless couplé à un quadripôle Turbomass Gold SM Perkin Elmer. Caractéristiques de la colonne : colonne semi-polaire (50% phenyl polysilphenylène-siloxane) Thermo (Electron Corporation) TR-50MS, 60 m x 0,25 mm, épaisseur de film = 0,25µm.

Cette méthode consiste à séparer les éléments d'un mélange liquide par passage sur une colonne après leur transformation en phase gazeuse. Elle est surtout basée sur la volatilité des molécules (qui varie suivant la température). L'échantillon est introduit au moyen d'une seringue dans l'injecteur où il est instantanément vaporisé sous l'effet de la température (280°C). L'injection se fait en mode « sans division de flux » (*splitless* en Anglais). Ce type d'injection est généralement utilisé pour introduire des analytes en solution diluée. L'électrovanne située dans l'injecteur est fermée pendant les quelques dizaines de secondes qui suivent l'injection, de manière à ce que la totalité des analytes présents pénètrent dans la colonne (Bouchonnet et Danielle 2004). Elle est ensuite ouverte pour purger l'injecteur d'éventuels résidus, 1 min après le début du *run* à un débit de 20 ml min^{-1}. Les composés sont ensuite entraînés vers la colonne par le gaz vecteur qui constitue la phase mobile (ici l'hélium). Les molécules s'adsorbent à la phase stationnaire de la colonne puis sont progressivement désorbées par augmentation de la température. Les molécules sortent ainsi une à une de la colonne selon leur température d'ébullition et leur polarité. Quand elles passent au niveau de la source du spectromètre de masse, elles sont bombardées d'électrons (ionisation) ce qui entraîne leur désintégration en plusieurs fragments. Ces fragments sont des ions caractérisés par leur rapport masse sur charge (*m/z*), qui permettent ainsi de déterminer la molécule.

La GC-MS est utilisée ici pour analyser les fongicides : cymoxanil, folpel, tébuconazole et pyraclostrobine.

La première étape consiste à déterminer les temps de rétention de chaque molécule selon un gradient de température défini (Figure II.25). Pour cela, toutes les molécules à analyser, ainsi que les étalons internes, sont passés en mode « *full scan* », c'est à dire que le détecteur va analyser tous les ions de chaque molécule. Chaque composé est injecté (à un débit de 1 ml min^{-1}) séparément à une forte concentration, en l'occurrence 80 mg l^{-1}. Grâce à leur spectre de

masse (abondance des ions en fonction de leur rapport *m/z*), on vérifie qu'il s'agit bien de la molécule attendue.

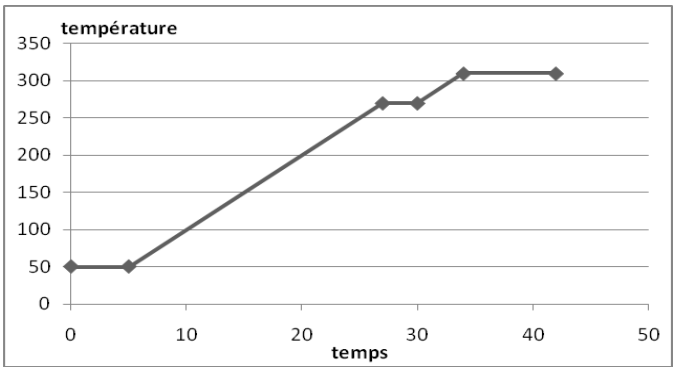


Figure II.25. Gradient de température utilisé pour l'analyse des fongicides en GC-MS.

Les temps de rétention obtenus sont :

Nitrophénol (étalon interne) : 22,46 min

Cymoxanil : 23,49 min

Atrazine (étalon interne) : 26,88 min

Folpel : 32,81 min

Tébuconazole : 34,76 min

Pyraclostrobine : 40,23 min

La deuxième étape consiste à cadrer les fenêtres de scan pour le mode « SIM ». Le mode SIM (*Single Ion Monitoring*) signifie que le détecteur ne va sélectionner que quelques ions caractéristiques d'une molécule pendant un intervalle de temps défini. Les intervalles de temps ainsi que les ions caractéristiques sont déterminés à partir des chromatogrammes et des spectres de masse obtenus en *full-scan*. Pour nos composés, le mode SIM est le suivant :

- Solvant : 0 à 21 min,
- Nitrophénol : 21,5 à 23 min (masses retenues : 139 ; 153 ; 199),
- Cymoxanil : 23 à 24,5 min (masses retenues : 72 ; 198),
- Solvant : 24,5 à 26,5 min,
- Atrazine : 26,5 à 27,5 min (masses retenues : 132 ; 173 ; 200),
- Solvant : 27,5 à 32 min,
- Folpel : 32 à 33,5 min (masses retenues : 104 ; 130 ; 260),
- Tébuconazole : 33,5 à 35,5 min (masses retenues : 168 ; 250),
- Solvant : 35,5 à 39,5 min,
- Pyraclostrobine : 39,5 à 46 min (masses retenues : 111 ; 132 ; 183).

Les paramètres de la méthode GC en mode SIM sont les mêmes qu'en mode *full scan*. Afin de vérifier que toutes les molécules sont détectées et que les fenêtres sont bien cadrées, un standard est injecté.

II.3.2 Préparation des standards

II.3.2.1 Herbicides

Avant de commencer les manipulations, toute la verrerie qui va être en contact avec les composés doit être traitée au dimethyldichlorosilane (DMDCS) afin d'empêcher que les molécules ne s'adsorbent sur les parois (Crissman 2004) : les récipients (vials, flacons) sont remplis de DMDCS qui reste en contact pendant 10 min, puis ils sont rincés deux fois à l'hexane et une fois au méthanol.

Des solutions mères de 100 mg l^{-1} sont préparées dans de l'eau ultra-pure à partir des poudres standards de glyphosate, glufosinate et d'AMPA puis un mélange à 50 mg l^{-1} des 3 composés est réalisé. Pour préparer un standard des 3 composés à 0,5 mg l^{-1}, 30 µl du mélange à 50 mg l^{-1} sont prélevés auxquels sont ajoutés 2470 µl d'eau ultra-pure, 250 µl de tampon borate (tampon qui maintient le pH à 9), et 250 µl de FMOC-Cl (9-fluorenylmethyl chloroformate). Le FMOC-Cl est un composé fluorescent qui va se lier aux sites amines des 3 molécules et ainsi permettre leur détection par spectrofluorimètrie. De plus, les composés étant des molécules très polaires, leur rétention chromatographique sur la colonne (qui est en phase inverse) n'est pas facilitée mais l'ajout de FMOC-Cl constitue ce qu'on appelle la dérivation, qui tend à rendre la molécule moins polaire. De ce fait, le FMOC-Cl joue un double rôle (facilite la rétention et permet la détection) (Ibanez *et al.* 2005). La réaction de dérivation est effectuée sous agitation, à température ambiante (entre 20 et 30°C) durant 1 heure. A la fin de la réaction, l'excès de FMOC-Cl est éliminé par une extraction liquide-liquide avec 2 ml d'éther. Le flacon est mélangé manuellement ce qui va permettre au FMOC-Cl de passer en phase organique. La phase aqueuse est prélevée à l'aide d'une pipette, puis transvasée dans un *vial* pour être analysée en HPLC-Fluo.

II.3.2.2 Fongicides

Une solution contenant un mélange des pesticides à analyser (concentration = 0,75 mg l^{-1}) et des étalons internes (concentration = 0,075 mg l^{-1}) est préparée à partir des solutions mères

à 100 mg l^{-1} de chaque composé, par dilution dans le mélange de solvants, acétonitrile et dichlorométhane (*v/v* = 50/50). Pour préparer un standard des 4 composés à 0,58 mg l^{-1}, 1 ml de cette solution auquel sont ajoutés 300 µl de réactif de dérivation (BSTFA+1%TMCS) sont transvasés dans un *vial* qui va être placé sous agitation pendant une heure à 80°C. Toutes les molécules ne dérivent pas, c'est pourquoi il est nécessaire d'avoir deux étalons internes, un pour les molécules qui dérivent (4-nitrophénol pour cymoxanil et tébuconazole) et un pour celles qui ne dérivent pas (atrazine pour folpel et pyraclostrobine). Sans le processus de dérivation, le cymoxanil et le 4-nitrophénol sont indétectables sur le chromatogramme.

II.3.3 Etablissement des courbes d'étalonnage

Le principe de l'étalonnage interne a été utilisé que ce soit avec les herbicides ou les fongicides. L'étalon interne (ei) permet, lors de la quantification des composés, de corriger l'éventuelle erreur due à l'analyse. L'étalon interne est choisi avec des propriétés analytiques proches des composés à quantifier.

Les courbes d'étalonnage de chaque composé permettent de calculer les concentrations des pesticides dans les échantillons à analyser. Pour cela, on prépare des standards dont les concentrations des composés d'intérêt varient dans une gamme qui doit théoriquement encadrer les concentrations qu'on obtiendra dans les échantillons à analyser. Dans chaque solution, sont ajoutés le ou les étalon(s) interne(s) à des concentrations constantes. Après analyse des standards, les aires de chaque pic sont intégrées et les droites d'étalonnage sont ensuite établies par la relation :

$$A/Aei = a\ C/Cei + b, \qquad (3)$$

où A est l'aire du compose d'intérêt, Aei est l'aire de l'étalon interne, C est la concentration du composé d'intérêt et Cei est la concentration de l'étalon interne.

A partir de ces données, il est possible de trouver la concentration d'un composé dans un échantillon, à qui il a été attribué au préalable l'étalon de référence correspondant, par la relation :

$$C = (((A/Aei)-b) / a) * Cei. \qquad (4)$$

II.3.3.1 Herbicides

N'ayant pas d'échantillon qui contienne à la fois du glyphosate et du glufosinate, les étalons internes sont le glufosinate pour la quantification du glyphosate et de l'AMPA et le glyphosate pour la quantification du glufosinate.

Les gammes d'étalonnage ont été construites sur 9 ou 10 points de concentrations de 0,02 à 2 mg l^{-1} avec une concentration de l'étalon interne à 0,5 mg l^{-1} (Figure II.26).

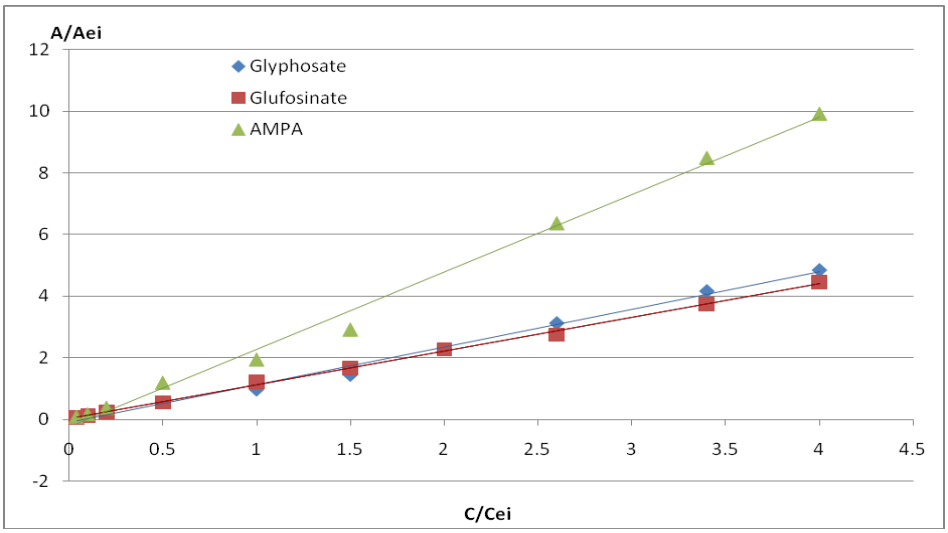


Figure II.26. Droites d'étalonnage des herbicides analysés en HPLC-Fluo.

Les équations des droites ainsi que leur coefficient de détermination sont donnés ci-dessous :

Glyphosate : $y = 1,228x – 0,101$ ($R^2 = 0,9945$),

Glufosinate : $y = 1,0945x + 0,031$ ($R^2 = 0,9986$),

AMPA : $y = 2,5126x – 0,2255$ ($R^2 = 0,9943$).

Il faut préciser que pour les échantillons de dépôts au sol d'herbicides (cf. section II.2.5), les concentrations n'ont pas été déterminées à partir des droites d'étalonnage car pour cette expérience, l'étalonnage interne n'a pas été utilisé. Les concentrations des composés ont été déterminées par la simple relation entre l'aire et la concentration d'un standard injecté avant chaque passage d'échantillon.

II.3.3.2 Fongicides

Les gammes d'étalonnage ont été construites sur 6 ou 7 points de concentrations de 0,058 à 40 mg l^{-1} suivant les composés, avec une concentration de l'étalon interne à 0,058 mg l^{-1} (Figure II.27). Les équations des droites ainsi que leur coefficient de détermination sont donnés ci-dessous :

Cymoxanil : y = 1,1787x – 3,4772 (R^2 = 0,9923),

Tébuconazole : y = 0,1157 – 0,359 (R^2 = 0,997),

Pyraclostrobine : y = 0,3588 – 0,2423 (R^2 = 0,9827),

Folpel : y = 0,7672x – 11,127 (R^2 = 0,9964).

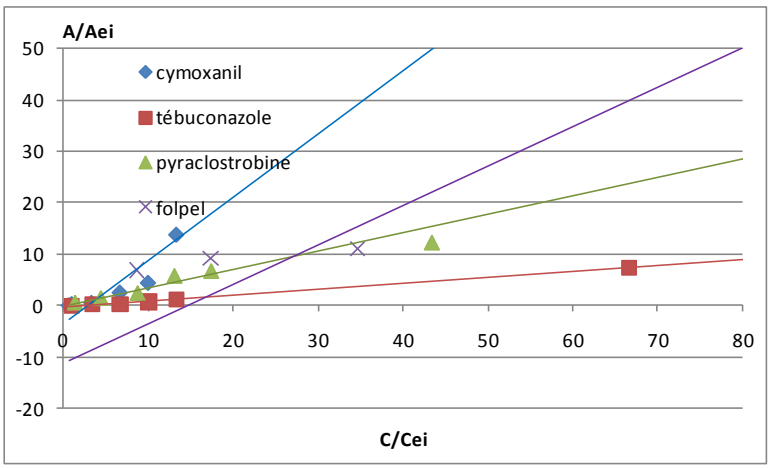


Figure II.27. Droites d'étalonnage des fongicides analysés en GC-MS.

II.4 Analyses histologiques

II.4.1 Dissection de l'escargot pour le prélèvement des organes

L'escargot est sacrifié par injection, dans le pied juste à la base de la coquille du coté droit, de 200 µl de solution de succinyl-choline (anesthésiant) à 10 mg l^{-1} (concentration létale). Il est décoquillé puis disséqué afin de prélever les organes sur lesquels va être réalisée une analyse histologique. Dans cette étude, des coupes histologiques ont été réalisées sur les gonades des escargots exposés en laboratoire aux herbicides sur l'ensemble de leur cycle de vie (cf. Chapitre 3, sections III.3.1 et III.3.2).

II.4.2 Fixation, inclusion des organes et préparation des coupes pour observation

Fixation de la gonade

Les organes sont fixés dans environ 2 ml de liquide de Bouin (fixateur à base d'acide picrique, d'acide acétique et de formol) pendant 12 à 24 h. Le maximum de Bouin est retiré des piluliers dans lesquels les organes sont immergés puis un morceau de gaze est fixé à l'aide d'un élastique sur le haut de chaque pilulier. Les piluliers sont placés sous l'eau courante durant 3-4 h afin d'éliminer le reste de Bouin. Après ce rinçage, 3 bains successifs d'alcool à 95%, d'une demi-journée chacun, sont effectués, suivis par 2 bains de butanol d'environ 24 h.

Inclusion des organes dans la paraffine

Les organes sont placés à l'étuve (56°C) dans des piluliers contenant de la paraffine. Trois bains successifs de paraffine sont effectués, d'environ 8 h chacun. Les organes sont ensuite disposés dans des petits blocs en plastique dans lesquels est coulée de la paraffine chaude. Puis ces blocs sont laissés à température ambiante jusqu'à durcissement complet de la paraffine.

Réalisation des coupes au microtome

Les blocs sont fixés sur un microtome à manivelle (Leica Reichert-Jung 2030 Biocut) après avoir été taillés afin d'obtenir une section de coupe enserrant étroitement l'organe. L'avancement de l'axe de coupe est réglé pour que l'épaisseur de la coupe soit de 5 µm. Les rubans de coupes sont placés dans un support fermé en attendant de procéder au collage.

Collage des coupes sur lames

De l'eau gélosée est préparée en faisant dissoudre à chaud environ 4 cm² de gélatine alimentaire dans 100 ml d'eau déminéralisée. Quelques gouttes sont déposées sur une lame mince puis 2 ou 3 rubans de 4-5 coupes chacun sont placés sur la lame. Les lames sont ensuite posées sur une plaque chauffante (45°C) ce qui permet d'étendre la paraffine et donc les coupes. Les bulles d'air ainsi que le surplus d'eau gélosée sont éliminés et les lames sont placées à l'étuve à 37°C pendant une nuit pour séchage.

Coloration des coupes selon le trichrome de Masson

Il est d'abord nécessaire de préparer les réactifs et les colorants, pour un volume individuel de 250 ml minimum (volume qui permet d'immerger totalement les lames dans les bacs de coloration).

- Lugol (2,5 g d'iode et 5 g d'iodure de potassium dans 250 ml d'eau déminéralisée).
- Métabisulfite de sodium à 5% (12,5 g de métabisulfite de sodium dans 250 ml d'eau déminéralisée).
- Hématoxyline de Groat : solution A : 4 ml d'acide sulfurique concentré dans 250 ml d'eau déminéralisée + 5 g d'alun de fer. Solution B : 2,5 g d'hématoxyline de Groat dans 250 ml d'éthanol à 95%. Les 2 solutions sont mélangées puis après un repos d'1 h, la solution est filtrée.
- Eosine : 2,5 g d'éosine dans 250 ml d'eau déminéralisée + une goutte d'acide acétique.
- Bleu d'aniline : 1,5 g de bleu d'aniline dans 250 ml d'eau déminéralisée + 16,4 ml d'acide acétique.
- Eau acétique : 2 ml d'acide acétique pour 250 ml d'eau déminéralisée.

Les lames sont disposées dans les paniers et sont trempées successivement dans les bacs dans l'ordre suivant :

<u>Déparaffinage :</u>

- 3 bains de xylène (10 min chacun)
- bain d'éthanol 100% (10 min)
- bain d'éthanol 95% (10 min)
- bain d'éthanol 70% (5 min)
- bain d'eau déminéralisée (10 min)
- bain de Lugol (5 min)
- bain de métabisulfite de sodium (juste tremper et retirer)
- rinçage à l'eau courante (au minium 15 min)

<u>Coloration</u> (les temps/nombres d'immersion dans les bacs ne sont qu'indicatifs et peuvent être réadaptés suivant la fraicheur des colorants) :

- bain d'hématoxyline de Groat (2 min)
- rinçage à l'eau courante (15 min)
- bain d'éosine (2 min en remuant)
- bain d'eau acétique (tremper 5 fois)

- bain de bleu d'aniline (tremper 10 fois)
- bain d'eau acétique (tremper 5 fois)

Déshydratation :

- bain d'éthanol 70% (tremper 4-5 fois)
- bain d'éthanol 95% (tremper 4-5 fois)
- 2 bains d'éthanol 100% (tremper 4-5 fois)

Montage des lames

Après 3 bains successifs de xylène de 5 min chacun, le panier reste dans le dernier bac de xylène le temps que toutes les lames soient montées. Quelques gouttes de baume du Canada (résine) sont déposées sur une lamelle et étalées sur sa surface à l'aide d'une baguette en verre. La lamelle est retournée délicatement contre la lame sur la zone des coupes. En appuyant légèrement sur la lamelle, le baume du Canada s'étale entre les 2 surfaces et les bulles d'air sont éliminées. Les lames sont posées à plat sur un plateau et sont séchées à l'étuve à 57°C pendant 48 h avant observation

Observation

L'observation des coupes histologiques de gonades est réalisée avec un microscope (Zeiss Axio Imager 2) équipé d'une caméra (Zeiss AxioCam MRc5) permettant la prise d'images avec un logiciel d'imagerie numérique (AxioVision release 4.8.2).

II.5 Références

Sites internet

ADEPALE : Association des entreprises de produits alimentaires élaborés.

http://www.adepale.org/index.php?id=153

Association Tyflo « Des vignerons alsaciens s'engagent ».

http://www.tyflo.org/

INPN: Inventaire national du patrimoine naturel, classification d'*Helix aspersa.*

http://inpn.mnhn.fr/isb/servlet/ISBServlet?action=Espece&typeAction=10&pageReturn=ficheEspeceTaxonomy.jsp&numero_taxon=199863

Publications

(ISO 15952:2006). Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae). Determination of the effects on growth by soil contamination. Soil quality.

(Soil Survey Staff 1993). Soil survey manual. Washington, DC, US Government printing office.

Baize D (2000). Guides des analyses en pédologie, 2ème édition revue et augmentée, INRA Edition 266p.

Barker GM (2004). Natural enemies of terrestrial mollusks. Wallingford, UK, CABI Publishing 644p.

Bayne CJ (1968). "Histochemical studies on the egg capsules of eight gastropod molluscs." proceedings of the Malacological Society of London **38**: 199-212.

Beaumont A et Cassier P (1998). Travaux pratiques de biologie animale. Zoologie Embryologie Histologie, Dunod. Paris 502p.

Bouchonnet S et Danielle L (2004). "Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse." L'actualité chimique **275**: 7-14.

Bride J et Gomot L (1991). "Asynchronous development of the genital-tract during growth and reproduction in the snail, *Helix aspersa*." Reproduction Nutrition Development **31**(1): 81-96.

Chapuis F, Pichon V et Hennion MC (2005). "Preconcentration by solid phase extraction: Principles and applications in the environmental and petroleum industries." Méthode de préconcentration par extraction en phase solide: Principe et application aux industries environnementales et pétrolières **60**(6): 899-912.

Chevalier L, Desbuquois C, Le Lannic J et Charrier M (2001). "Poaceae in the natural diet of the snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda, Pulmonata)." Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie **324**(11): 979-987.

Crissman J (2004). "Deactivating glass surfaces with dimethyldichlorosilane (DMDCS)." Restek Advantage Chromatography Newsletter **2**: 11.

Dallinger R, Berger B, Triebskorn-Köhler R et Köhler H (2001). Soil biology and ecotoxicology. The biology of terrestrial molluscs. Barker GM. Oxon, CABI**:** 489-525.

Evanno G et Madec L (2007). "Variation morphologique de la spermathèque chez l'escargot terrestre *Cantareus aspersus*." Comptes Rendus Biologies **330**(10): 722-727.

Gomot A (1997). "Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **33**: 209-216.

Gomot A, Gomot L, Boukraa S et Bruckert S (1989). "Influence of soil on the growth of the land snail *Helix aspersa* - an experimental study of the absorption route for the stimulating factors." Journal of Molluscan Studies **55**: 1-7.

Gomot de Vaufleury A (2000). "Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*." Ecotoxicology and Environmental Safety **46**: 41-50.

Gomot de Vaufleury A (2001). Regulation of growth and reproduction. The biology of terrestrial molluscs. Barker GM. Oxon, CABI**:** 331-355.

Gomot L et Deray A (1987). "Les escargots." La recherche **186**: 302-311.

Ibanez M, Pozo OJ, Sancho JV, Lopez FJ et Hernandez F (2005). "Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1081**(2): 145-155.

Kerney M, Cameron R et Bertrand A (2006). A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe, French ed. Paris, Delachaux et Niestlé SA.

Le Calve D (1989). "Influence des conditions d'incubation des œufs sur les six premières semaines de la croissance d'escargots petits-gris, *Helix aspersa* Müller (Gasteropode, Pulmone, Stylommatophore)." Bulletin de la Société zoologique de France **114**: 101-110.

Lucarz A et Gomot L (1985). "Influence of the population density on diametric and ponderal growth of the snail *Helix aspersa* Muller in different growth conditions." Journal of Molluscan Studies **51**(FAL): 105-115.

Marasco F et Murciano C (2003). Les escargots. Elevage. Paris, Editions de Vecchi.

Scheifler R, Brahim MB, Gomot de Vaufleury A, Carnus JM et Badot PM (2003). "A field method using microcosms to evaluate transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from sewage sludge amended forest soils to *Helix aspersa* snails." Environmental Pollution **122**(3): 343-350.

PARTIE III

RÉSULTATS

III.1 Chapitre 1 : Développement de techniques d'analyse pour la quantification de l'exposition et du transfert des pesticides à l'escargot

III.1.1 Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil

Cette partie a fait l'objet d'une publication acceptée dans la revue *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Les auteurs sont Coline Druart, Olivier Delhomme, Annette de Vaufleury, Evodie Ntcho et Maurice Millet.

Résumé

Une méthode d'extraction et d'analyse a été développée pour évaluer les concentrations en glyphosate, glufosinate et en AMPA dans des échantillons de sol naturel. Après avoir testé la faisabilité et le rendement de différentes méthodes d'extraction, comme l'extraction accélérée par solvant ou l'extraction par ultrasons, c'est finalement l'agitation qui a donné les meilleurs rendements. L'eau a été retenue comme extractant car elle extrait moins d'impuretés que les solvants basiques et permet ainsi une meilleure lisibilité des chromatogrammes. L'analyse est effectuée par une pré-dérivation au FMOC-Cl suivie d'une séparation en chromatographie liquide haute performance sur une colonne C_{18} de 300 mm. Cette colonne permet une meilleure sensibilité et une meilleure séparation des composés que la colonne C_{18} classique de 250 mm et montre également une meilleure résistance que les colonnes NH_2 généralement utilisées pour l'analyse de ces composés. Les résultats ont montré que l'extraction et l'analyse de ces 3 composés dans une argile limon-sableuse pouvaient être effectuées en un minimum d'étapes tout en restant efficaces et sensibles, avec des limites de détection de 103 µg kg^{-1} pour le glyphosate, 15 µg kg^{-1} pour le glufosinate et 16 µg kg^{-1} pour l'AMPA.

Mots-clés : Herbicides, glyphosate et glufosinate, extraction, sol, dérivation au FMOC.

Anal Bioanal Chem (2011) 399:1725–1732
DOI 10.1007/s00216-010-4468-z

ORIGINAL PAPER

Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil

Coline Druart · Olivier Delhomme · Annette de Vaufleury · Evodie Ntcho · Maurice Millet

Received: 22 September 2010 / Revised: 15 November 2010 / Accepted: 23 November 2010 / Published online: 12 December 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Analysing herbicides in soil is a complex issue that needs validation and optimization of existing methods. An extraction and analysis method was developed to assess concentrations of glyphosate, glufosinate and aminomethylphophonic acid (AMPA) in field soil samples. After testing extractions by accelerated solvent extraction and ultrasonic extraction, agitation was selected with the best recoveries. Water was preferred as solvent extraction because it resulted in a cleaner chromatogram with fewer impurities than was the case with alkaline solvents. Analysis was performed by FMOC pre-column derivatization followed by high-performance liquid chromatography (HPLC) on a 300 mm C_{18} column which permitted enhanced separation and sensitivity than a 250 mm C_{18} column and increased resistance than the NH_2 column for soil samples. This extraction and analysis method allowing a minimum of steps before the injection in the HPLC with fluorescence detection is efficient and sensitive for a clay-loamy soil with detection limits of 103 μg kg^{-1} for glyphosate, 15 μg kg^{-1} for glufosinate and 16 μg kg^{-1} for AMPA in soil samples.

Keywords Glyphosate and glufosinate herbicides · Extraction · Soil · FMOC derivatization

Introduction

Ammonium glufosinate (ammonium 2-amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)butyrate; CAS number: 77182-82-2; molecular formula, $C_5H_{12}NO_4P.H_3N$) and glyphosate (*N*-(phosphonomethyl)glycine; CAS number: 1071-83-6; molecular formula:, $C_3H_8NO_5P$) are non-selective herbicides and so, applied on a large variety of crops such as vineyards, potatoes, peas, orchards and private gardens. They are known to be non persistent in environment because they are degraded rapidly in water, principally due to the light [1] and in soil principally due to micro-organisms [2]. However, they are regularly

III.1.1.1 Introduction

Ammonium glufosinate (ammonium 2-amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)butyrate; CAS number: 77182-82-2; molecular formula, $C_5H_{12}NO_4P.H_3N$) and glyphosate (*N*-(phosphonomethyl)glycine; CAS number: 1071-83-6; Molecular formula, $C_3H_8NO_5P$) are non-selective herbicides and so, applied on a large variety of crops such as vineyards, potatoes, peas, orchards and private gardens. They are known to be non persistent in environment because they are degraded rapidly in water, principally due to the light (Mallat et Barceló 1998) and in soil principally due to micro-organisms (Accinelli *et al.* 2004). However, they are regularly found in surface waters, notably glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA), the major metabolite of glyphosate (IFEN 2007).

Due to the extensive worldwide use of these compounds, very sensitive and selective methods for their detection are required. Different methods for the analysis of glyphosate, AMPA and glufosinate have been developed (Kataoka *et al.* 1996; Börjesson et Torstensson 2000; Le Bot *et al.* 2002; Ibanez *et al.* 2005; Qian *et al.* 2009) but liquid chromatography,

with a derivatization step, preferred over GC because of the ionic character and the low volatility of these compounds. The easier, less demanding and more current popular method to analyse these compounds is by pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) followed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection (ISO 21458:2008).

Risk assessment of chemicals can be based on the comparison of predicted environmental concentration and predicted no effect concentration values (PEC / PNEC). PNEC are determined with ecotoxicological bioassays that relate the dose-dependent response of various organisms to chemicals. Indeed, it was demonstrated that these compounds or their commercial formulations are toxic to certain organisms of soil fauna (Kang *et al.* 2001; Yasmin et D'Souza 2007). For the evaluation of organism exposure (i.e. the PEC value), adapted methods are still needed for accurate analysis of concentrations and degradation of herbicides in soils. Indeed, the analysis of glyphosate, glufosinate and AMPA at low concentrations in soil is complicated, due to the complexity of this matrix sample and their high adsorption to soil clays and organic matter (Stalikas et Konidari 2001). Several authors reported extraction methods of these compounds from soil (Aubin et Smith 1992; Faber *et al.* 1997; Accinelli *et al.* 2004; Ibanez *et al.* 2005; Chen *et al.* 2009b) but frequently, one extraction method in soil was applicable for one type of soil, because following the composition in clay and organic matter, extraction was more or less difficult (Stalikas et Konidari 2001).

The aim of this paper was to develop a sensitive and selective method by liquid chromatography with the fluorescence detection for the determination of low concentrations of glyphosate, glufosinate and AMPA in a clay-loamy soil. The different factors affecting the efficiency of this method such as the soil extraction, the FMOC derivatization reaction and the liquid chromatography parameters (solvent, column …) have been evaluated and optimised.

III.1.1.2 Materials and methods

III.1.1.2.1 Chemicals and solutions

Solvents of HPLC grade quality (acetonitrile, ethyl ether, methanol, n-hexane, ethyl acetate and methylene chloride), sodium hydroxide Normapur (NaOH), $CaCl_2$, potassium hydroxide (38 %) Normapur (KOH), potassium dihydrogen phosphate Normapur (phosphate buffer), phosphoric acid (65 %) Suprapur (H_3PO_4) and disodium tetraborate decahydrate (borate

buffer) were purchased from VWR Prolabo (Paris, France). Pesticide high purity standards (>98%) were supplied by Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-la-Grande, France) for glufosinate and by Aldrich (l'Isle d'Abeau, France) for glyphosate and AMPA.

FMOC and dimethyl-dichloride silane (DMDCS) were purchased from Fluka and Aldrich respectively (l'Isle d'Abeau, France).

Stock solutions of each pesticides at 1 g l^{-1} and calibration standard solutions were prepared in ultrapure water. Solution of 0.05 M borate buffer (pH approximately 9) in ultrapure water and solution containing 1 g l^{-1} of FMOC in acetonitrile were used for the derivatization step prior to the determination. The solution for silanisation was prepared by diluting 5% of DMDCS in n-hexane.

III.1.1.2.2 HPLC fluorescence analysis

The HPLC fluorescence analysis was performed using a Kontron (Serlabo Technologies, Avignon, France) HPLC system, equipped with a Jasco (Bouguenais, France) FP-1520 scanning fluorescence detector.

The separation was performed using a reverse phase column (Waters NovaPak C_{18}, 300 × 3.9 mm, i.d.), with H_3PO_4 at 0.2 % (solvent A) / acetonitrile (solvent B) eluent as the mobile phase at a flow rate of 1 ml min^{-1}. The column oven temperature was set to 25° C and the injection volume was 20 µl. The gradient programme was a discontinuous increase of solvent B from 10% to 45% in 32 min then a decrease from 45% to 10% in 3 min. Detection of FMOC derivatives of each herbicide was done at λ_{ex} = 260 nm and λ_{em} = 310 nm.

III.1.1.2.3 Sampling

Soil samples

The soil used in this work came from a vineyard parcel in Bergbieten (Alsace, France); it was collected from the 0-5 cm soil horizon, air-dried and screened through a 4-mm sieve. It has been characterised by the Soil Analyses Laboratory from Arras (France). Results indicated that clay content was 35.1%, 39.5 % silt, 25.4 % sand, 1.7 % organic C, a high CEC of 20.3 cmol+ kg^{-1} and a pH of 8.38. The organic matter is humified and rich in nitrogen in the topsoil (C/N ratio of 10.6). The texture is mainly controlled by the clay-loamy fraction, according to the USDA soil texture classification (Soil Survey Staff 1993).

Soil extraction

Before extraction and analysis, all glassware was silanised. After 10 min of contact, two rinses with n-hexane and one rinse with methanol were done before drying (Ghanem *et al.* 2007). Losses of compounds due to the absence of the treatment of glassware by DMDCS were studied.

Different solvents and different extraction apparatus were tested: accelerated solvent extraction (ASE; Dionex, USA), ultrasonic extraction (USE) and agitation by magnetic stirrer. Soil samples were spiked at 5 mg kg^{-1} of glyphosate and AMPA or glufosinate. Various solvents and parameters were tested for the three extraction procedures, which were reported in Table IV.1. Extracts were then centrifuged and if necessary, the pH was readjusted to 7-10, the conditions for the derivatization step.

FMOC derivatization

A 2.47 ml of extract and 30 µl of internal standard were derivatized with 250 µl of FMOC and 250 µl of borate buffer under agitation (by magnetic stirrer) during 1 h at room temperature. In order to eliminate the excess of FMOC, a liquid-liquid extraction with 2 ml of ethyl ether was performed. The aqueous phase was recovered and analysed by the HPLC system.

Effect of drying of soil

Influence of temperature and duration of soil drying on pesticide losses in soil was studied. Five samples of dried soils were spiked with the same concentration of glyphosate and AMPA or glufosinate (10 mg kg^{-1}): one sample was directly analyzed, one sample was kept in oven during 24 h (time needed to dry soil samples moistened at 45% of the field water holding capacity (WHC) at 50°C) and the three others were kept at room temperature during 48 h (time needed to dry soil samples moistened at WHC-45% at 22-25°C), then they were analyzed.

III.1.1.2.4 Calibration and validation study

HPLC system

The HPLC system was internally calibrated for the quantification of these three compounds with triplicate measurements of standard solutions at 9 different concentrations ranging between 0.02 mg l^{-1} and 2 mg l^{-1} and with the internal standard (glufosinate for

glyphosate and AMPA analyses and glyphosate for glufosinate analysis) at 0.5 mg l^{-1}. Relative standard deviation (RSD) was determined by 23 standards at 0.5 mg l^{-1} injected every day on a period about 1 month.

Soil extraction and HPLC analysis

For the extraction method by agitation, which was chosen for the following assays, the accuracy of the method was tested. Calibration was performed on soil matrix; the soil was spiked with 5 concentrations in the range of 0.2-20 mg kg^{-1} in triplicates and extractions were performed. The internal standards were added before derivatization step and the extracts were analyzed. Uncertainty was then determined by 4 replicates of soils, spiked at 0.915 mg l^{-1} (corresponding to 10 mg kg^{-1} in soil) and realised the same day. The limits of detection in soil were estimated as the analyte concentrations producing signal to noise ratios of 3:1 and the limits of quantification as noise ratio of 5:1.

III.1.1.3 Results and discussion

III.1.1.3.1 Derivatization optimization

Optimization of the molar ratio of compounds to FMOC, the addition of acetonitrile, the temperature and the time reaction were performed. FMOC is soluble in acetonitrile and not soluble in water, contrary to glyphosate, AMPA and glufosinate which are soluble in water and insoluble in organic solvents. Nedelkoska and Low (2004) reported that the optimum ratio of water to acetonitrile for derivatising glyphosate with FMOC could be 50:50 (*v/v*) as the compromise between compounds solubility and FMOC reactivity in water. However, in our work, the addition of acetonitrile in the reaction induced a very small change on the derivatization yield.

The derivatization yield was slightly improved by the duration of the reaction. By increasing the time reaction from 30 to 180 min we noted that above 60 min no significant increase is observed anymore. Therefore the reaction will be completed after 60 min.

A strong influence of the reaction temperature was observed. In fact, higher temperature reaction tended to decrease the yield of product. By increasing the temperature from 15 to 80°C, a decrease in product recovery was observed (Figure III.1.1).

Finally the stability of these FMOC products was found to stay unchanged after 10 days.

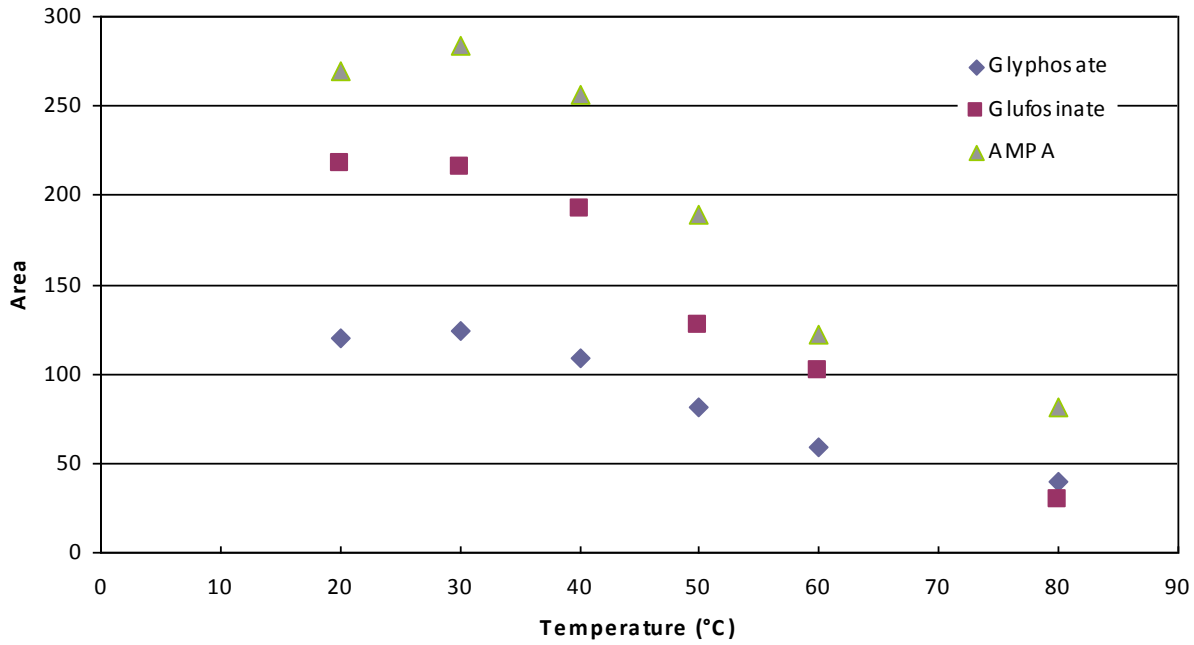


Figure III.1.1. Influence of the temperature on the FMOC derivatization yield for glyphosate, glufosinate and AMPA.

Taking into consideration the results obtained in the experiments described above, the optimum conditions for FMOC derivatization were: excess FMOC reagent, derivatization in pure water, a temperature included between 15 and 30 °C and a reaction time of 60 min.

III.1.1.3.2 Liquid chromatography optimization

Firstly, we used a phosphate buffer as solvent (A) as performed previously by several authors analysing by HPLC fluorescence in a concentration range of 0.05-0.15 M (Le Bot *et al.* 2002; Hidalgo *et al.* 2004; Nedelkoska et Low 2004). However, although phosphate buffer was filtered after its preparation, we observed that it was crystallising in the bottle and in the capillaries, consequently driving to an over-pressure of the pumps and the loss of analyse. We thus replaced this solvent by phosphoric acid at 0.2% which was well adapted for the column and the separation of the compounds.

In the same way, several columns were tested in order to find the most adapted for soil extracts. Typically two types of columns are used for glyphosate, glufosinate and AMPA analyses by HPLC-fluo: one filled with reverse-phase C_{18} and the other with normal phase NH_2. The NH_2 column provides an increased separation than C_{18} but its lifetime is very short (Le Bot *et al.* 2002) and is not adapted for analysis of more complex matrixes, such as soil

because it could need often change the column as we observed during our assays. Moreover, Sancho *et al.* (1994) reported a gradual decrease in efficiency of the silica-based amino column after two months use, observation verified in our work (decrease after about 50 injections). On the other hand, the Supelco C_{18} column of 250 mm, which was used in this work, did not allow well separating the three constituents which have similar retention time (Figure III.1.2a). The Waters C_{18} column of 300 mm allowed a better separation between glyphosate and AMPA and also a better sensitivity than the Supelco of 250 mm (Figure III.1.2b). Moreover, it was very resistant and allowed analysing complex matrixes, like soil or animal tissue extracts. Consequently, this column was chosen for analysis of soil extracts. However, after about 50 injections, the sensibility decreased due to the site saturation of the stationary phase by organic matter and it was necessary to regenerate the column. After reversing the column, regeneration was performed by flushing succession of solvents (acetonitrile, ethyl acetate and methylene chloride).

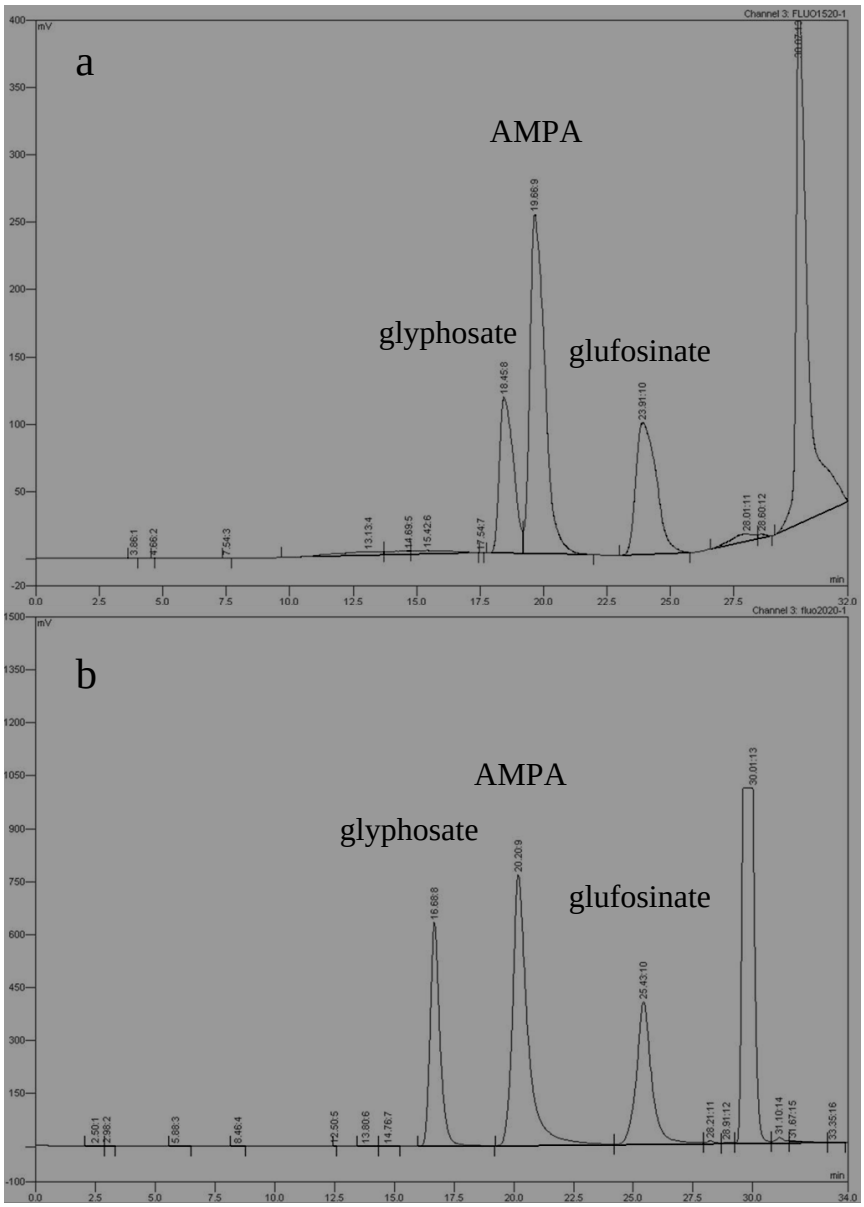


Figure III.1.2. HPLC-Fluo Standard chromatograms of glyphosate, AMPA and glufosinate at 0.5 mg l^{-1} obtained on C_{18} reverse phase Supelco 250 mm column (a) and C_{18} reverse phase Waters 300 mm column (b). Peak areas and retention times are 63.11 (18.45 min), 148.15 (19.66 min) and 86.4 (23.91 min), respectively for glyphosate, AMPA and glufosinate (a) and 291.57 (16.68 min), 526.25 (20.20 min) and 282.25 (25.43 min) respectively for glyphosate, AMPA and glufosinate (b).

III.1.1.3.3 Extraction optimization

Losses of 20%, 25% and 23% were observed for glyphosate, glufosinate and AMPA respectively, when glassware was not previously treated with DMDCS. Moreover, when the glassware was not treated, the peak areas of the three compounds were less reproducible. For all following tests, it was chosen to treat all glassware likely to be in contact with these three compounds.

The results of soil extraction with the three methods are summarised in Table III.1.1.

Table III.1.1. Results of the extraction method for glyphosate, AMPA and glufosinate in soil with different solvents and parameters.

Extraction method	Solvent	Parameters	Recoveries (%)			Notices
			Glyphosate	AMPA	glufosinate	
ASE	Water	Only soil in cell 3 cycles (5 min); Purge: 120 sec; Flush: 60%	0	0	0	The cell is filled with water
	Water	Only soil in cell 3 cycles (15 min); Purge: 120 sec; Flush: 100%	7.3	0.2	14.0	The cell is filled with water
	Water	Mixture soil and sand in cell 2 cycles (20 min); Purge:300 sec; Flush: 100%	17.9	29.5	>31.6	The cell is dry
	NaOH 0.1M	Mixture soil and sand in cell 2 cycles (20 min); Purge:300 sec; Flush: 100%	5.8	12.4	-	Glufosinate peak is co-eluted with an impurity and could not be integrated
USE	Water	2 x 10 min extraction Filtration of the extract	9.8	16.4	7.8	-
	Water	1 x 10 min extraction Centrifugation	18	34	49	After 10 min extraction, loss of recovery
	NaOH 0.1M	1 x 10 min extraction Centrifugation	9	24	12	-
Agitation	Water	15 h agitation	1.3	3.8	7.9	Slow method
	H_3PO_4	15 h agitation	0	0	0	Slow method
	Water	1 h agitation + 12h break + 1 h agitation	14	48	75	Slow method
	$CaCl_2$	1 h agitation + 12h break + 1 h agitation	7	17	36	Slow method
	Water	1 h agitation + 1h30 break + 1 h agitation	18.5 ± *2.7*	42.9 ± *5.3*	73.7 ± *6.4*	-
	NaOH 0.1M	1 h agitation + 1h30 break + 1 h agitation	27.5 ± *0.4*	51.6 ± *1.2*	42.6 ± *1.5*	A lot of impurities on the chromatograms

Values in italic were the standard deviations on 4 replicates

ASE accelerated solvent extraction, *USE* ultrasonic extraction, *NaOH* sodium hydroxide Normapur, $CaCl_2$ calcium dichloride Suprapur, H_3PO_4 phosphoric acid (65%) Suprapur

The advantage of extraction by ASE was the rapidity and the automation of the process, which permitted several extractions in succession and required no centrifugation step. However, our results demonstrate that ASE is not efficient for the extraction of hydrophilic herbicides in soil, but preferably for substances solvable in organic solvents, such as

diflufenican (Conte *et al.* 1997). However, the results showed that soils rich in clay should blended with sand in the cell to permit solvent getting across the cell.

For the USE, recoveries were increased relative to ASE (Table III.1.1) and were obtained with water and for an extraction of 10 min. When the time of extraction was increased, the recovery was decreased twofold for glyphosate and AMPA and per seven for glufosinate. This method was the fastest among the three tested. One study reported extraction of glyphosate by USE where authors extracted during 1 h in phosphate buffer and found an efficiency of about 44% (Babic *et al.* 2005) versus 18% in this work.

Among the three tested methods, extraction by agitation provided the best efficiency. Best recoveries were obtained for glufosinate in water (75%) and for glyphosate and AMPA in NaOH 0.1 M (27.5% and 51.6%, respectively). In the literature, best recoveries were reported for extraction by agitation in basic environment (Accinelli *et al.* 2004; Ibanez *et al.* 2005; Chen *et al.* 2009b; Jan *et al.* 2009) like as reviewed by Stalikas and Konidari (2001). However, it was chosen to keep the method with water extraction in order to avoid the loss of compounds at the time of readjustment of pH (step which could highly vary from an extraction to another) and the risk of co-eluted peaks with impurities in chromatograms. Indeed, we observed that NaOH and also other strong bases like KOH which was reported as extraction solvent by several authors (Ibanez *et al.* 2005; Chen *et al.* 2009b), extracted more impurities than water. These impurities could be co-eluted with other compounds, preventing good lecture of chromatograms (see chromatograms on Figure III.1.3a compared with Figures III.1.3b, III.1.3c). Best recoveries were obtained with an agitation time of 2 h and an extended time to break the resulting emulsion (12 h) for glufosinate or a short time of break for glyphosate and AMPA (1.5 h). Agitation times between 30 min and 2 h without break, as reported by several authors (Ibanez *et al.* 2005; Chen *et al.* 2009b; Jan *et al.* 2009) were evaluated but were found not sufficient to obtain good recoveries (results not shown). Due to the low difference of recoveries between extraction with short break and long break between agitations, the short break was chosen to gain time. The absolute recoveries reported in Table III.1.1 were all lower than 80% but the texture and composition of the Bergbieten soil could be at issue. Indeed, it was rich in clay with a high CEC that yielded extraction more difficult, as reported by Stalikas and Konidari (2001) and Accinelli *et al.* (2004). Indeed, several extraction methods were tried with Bergbieten soil without reaching the same recoveries reported in literature. But, on the other hand, this extraction method being developed with a hard soil, it can be applied with soils where sorption phenomena were lower.

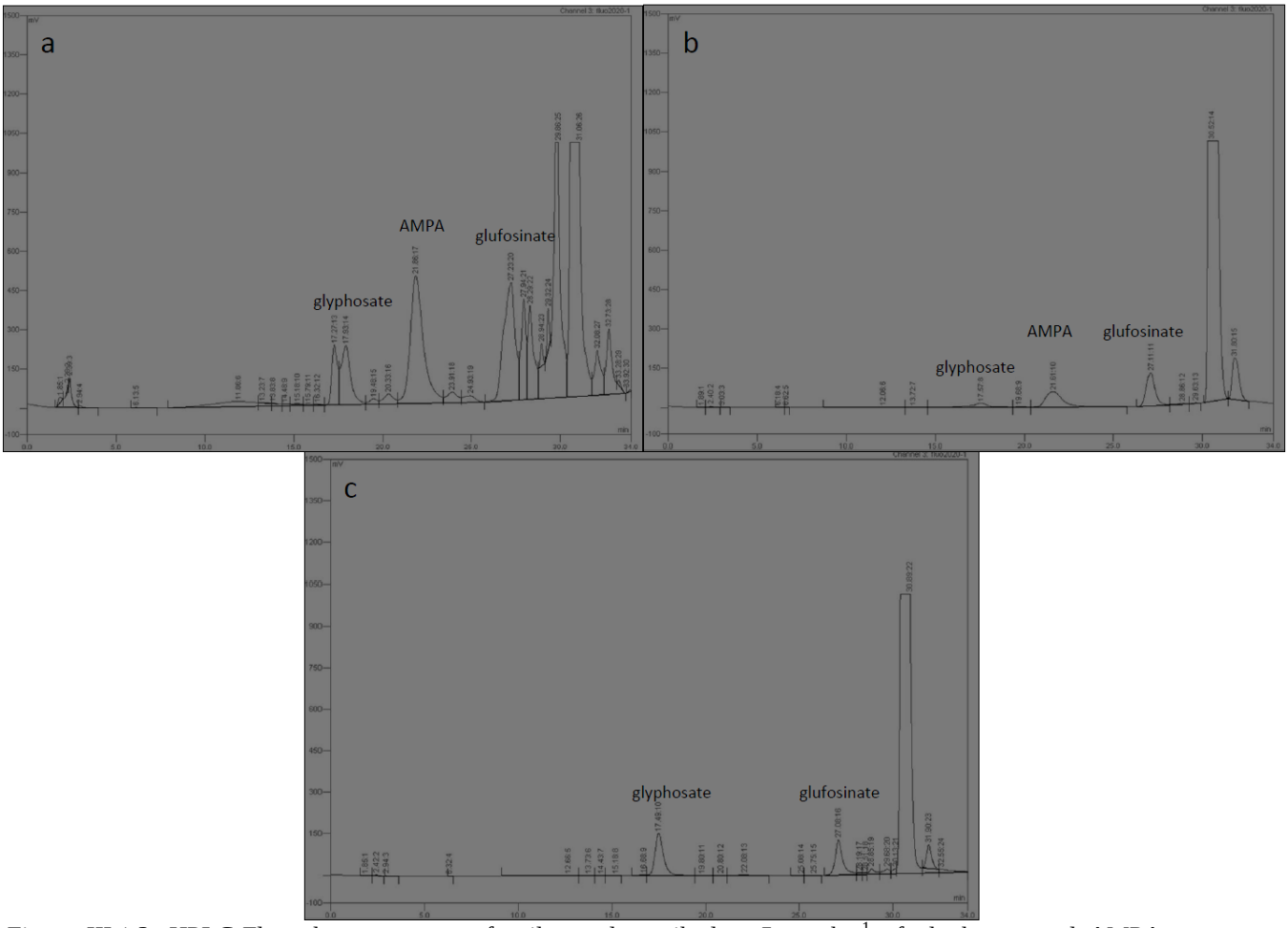


Figure III.1.3. HPLC-Fluo chromatograms of soil samples spiked at 5 mg kg^{-1} of glyphosate and AMPA extracted by NaOH 0.1M (a) or water (b) and glufosinate extracted by water (c). Glufosinate (a,b) and glyphosate (c) were internal standards at 0.5 mg l^{-1}.

One method was retained for glyphosate, AMPA and glufosinate extraction in soil: 40 ml of water with 5 g of air-dried soil were shaken for 1 h followed by a break of 1.5 h and again extraction for 1 h. Extract was transferred in a 50-ml tube, then 5 ml of ultrapure water were added. After centrifugation for 20 min at 3,000 rpm, 2.47 ml was directly taken in the extract without filtration or concentration steps and used for the derivatization and analyse. Indeed, concentration step was studied by testing the recovery after evaporation (pressure of 10 hPa and bath temperature of 40°C) of a water sample spiked with known concentrations of the compounds. Recoveries for 4 replicates were 17% (±1.8) for glyphosate, 47.5% (±8.3) for AMPA and 23.5% (±4.2) for glufosinate. Because of these important losses, it was chosen not to make this step, especially since concentration to a volume of 20 ml, took more than 1 h.

III.1.1.3.4 Calibration and uncertainties

The HPLC system was calibrated with standard solutions. The linearity of the response was more than adequate (see Table III.1.2). It was not possible to determine the FMOC derivatization efficiencies of the target compounds due to a lack of glyphosate-FMOC, glufosinate-FMOC and AMPA-FMOC standards. However, even if the efficiencies were not 100 % using the optimum parameters (Table III.1.2), the repeatability of the derivatization was excellent as suggested by the RSD lower than 10% (Table III.1.2). The variation of the retention times could be explained by the variation of the temperature, especially during summer where thermostat could not any more regulate the temperature of the column. However, these variations did not prevent the good lecture of the chromatograms.

The accuracy of the selected extraction method by agitation was studied by a calibration directly made on the soil. Because no suitable internal standard was found for the analysis, glyphosate and glufosinate were chosen due to the fact that the field soil samples were contaminated either with glyphosate or glufosinate but not with both substances all at once. The linearity of the response was good (upper than 0.97 for the three compounds, Table III.1.2). The compound concentrations determined in the four parallel experiments were comparable; the slight differences observed were not significant considering the uncertainty of the method (Table III.1.2). Good repeatabilities were observed for glufosinate and AMPA (RSD<15%) but slightly decreased for glyphosate (Table III.1.2). However, relative recoveries were higher than 90% for the three compounds and detection limits of the method were in the range of 15 to 103 µg kg^{-1} (Table III.1.2). This method is more sensitive than those reported by others authors, who are detection limits of 50 µg kg^{-1} for AMPA, 100 µg kg^{-1} for glufosinate and 200 µg kg^{-1} for glyphosate (Accinelli *et al.* 2004) or 1.1 mg l^{-1} for glyphosate (Jan *et al.* 2009). It is appreciably simpler and more rapid than others (Faber *et al.* 1997; Accinelli *et al.* 2004; Babic *et al.* 2005; Ibanez *et al.* 2005; Jan *et al.* 2009), without steps of solid phase extraction, concentration by evaporation, filtration or neutralisation, that allows producing a cost effective analysis, feasible in routine.

Table III.1.2. Parameters of calibration and validation for the extraction and analysis method of soil samples.

	Compound	R^2	Recoveries (%)	RSD (%)	RT (min)
Standard calibration[a]	Glyphosate	0.9945	88.87 ± 8.24	9.27	15.76 ± 0.85
	AMPA	0.9943	80.79 ± 4.13	5.11	18.47 ± 1.02
	Glufosinate	0.9986	90.29 ± 9.00	9.97	22.02 ± 1.28
Soil calibration[b]	Glyphosate	0.9778	96.65 ± 17.43	18.03	17.43 ± 0.21
	AMPA	0.9822	90.33 ± 11.66	12.91	21.39 ± 0.35
	Glufosinate	0.9956	95.64 ± 7.86	8.22	27.09 ± 0.50

	LOD (in soil)	LOQ (in soil)
Glyphosate	9.5 µg l^{-1} (103 µg kg^{-1})	15.7 µg l^{-1} (172 µg kg^{-1})
AMPA	1.5 µg l^{-1} (16 µg kg^{-1})	2.5 µg l^{-1} (28 µg kg^{-1})
Glufosinate	1.4 µg l^{-1} (15 µg kg^{-1})	2.3 µg l^{-1} (25 µg kg^{-1})

RSD relative standard deviation, *LOD* limit of detection, *LOQ* limit of quantification, *AMPA* aminomethylphophonic acid

[a] Values of recoveries, uncertainties and retention time were determined on 23 replicates

[b] Values of relative recoveries, uncertainties and retention time were determined on four replicates

Effects of air-drying on the degradation of compounds were determined to be unimportant. Indeed, recoveries, determined from the calibration on the soil matrix, indicated 91.27 ± 8.06% for glyphosate, 86.92 ± 6.5% for AMPA and 93.97 ± 2.28% for glufosinate versus 102.83%, 88.21% and 92.82% for the sample analyzed directly, respectively. These recoveries, which did not reach 100%, could be attributed as the error of the method. However, oven-drying showed appreciable losses of 90%, 74% and 49% for glyphosate, AMPA and glufosinate, respectively. Consequently, air-drying will be used for field soil samples.

The proposed method was tested with 300 clay-loamy soil samples from Bergbieten contaminated with Bypass® (a glyphosate-based herbicide) or Basta® (a glufosinate-based herbicide), confirming its very good sensibility to follow the degradation of glyphosate and glufosinate and the synthesis of AMPA during 168 days.

III.1.1.4 Conclusions

Further improvements might be available with better suitable internal standard to permit the analysis of soils contaminated all at once by glyphosate and glufosinate and on assessing the present method developed with a clay-loamy soil on other types of soils.

The extraction and analysis method of soil samples developed in this work, is simple, efficient, low-budget and applicable on a large set of samples. New elements were brought to current analyse methods like the use of phosphoric acid as polar solvent and the 300 mm C_{18}

reverse phase column. Although basic solvents gave better recoveries, water was preferred for extraction, to be sure to regain the three herbicides in field soil samples.

Acknowledgements

This work was financially supported by grants from the Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME), the Conseil Régional, Franche-Comté, the RE.A.LI.SE network, the Alsace région and the network of CNRS, Evaluer et Réduire l'Impact de la Chimie sur l'Environnement (ERICHE). We thank all trainees of the lab LMSPC, which took part in the realisation of this work by their technical assistance. We thank also Brice Mourier for his help for the soil characterisation.

III.1.2 Résultats sur le développement de méthodes d'extraction et d'analyse d'herbicides et de fongicides dans les escargots

III.1.2.1 Introduction

A l'heure actuelle, trop peu de méthodes sont disponibles pour mesurer l'accumulation des pesticides dans les tissus animaux. Les pesticides les plus couramment étudiés pour développer ces techniques sont les organochlorés (Winter *et al.* 2005; Wolkers *et al.* 2006; Ozmen *et al.* 2008) et il existe très peu d'études concernant certaines molécules, comme le glyphosate, qui est pourtant l'herbicide le plus répandu dans le monde. En effet, seuls deux publications reportent avoir déterminé du glyphosate dans des tissus de carpe (Wang *et al.* 1994) et de ver aquatique (Contardo-Jara *et al.* 2009). Cependant, dans ces deux cas, la technique des molécules marquées au ^{14}C fut utilisée, ne pouvant pas s'appliquer à des échantillons naturels et ne permettant pas une quantification fine du glyphosate réel (mais seulement une mesure de la radioactivité). D'après leur K_{ow}, les herbicides glyphosate et glufosinate ne sont pas supposés s'accumuler dans les tissus animaux, ce qui peut expliquer le manque de méthodes disponibles sur le marché. Une autre raison peut reposer sur les difficultés analytiques généralement rencontrées avec ces deux molécules, très polaires, ioniques (amphotères) et facilement adsorbées à la matière organique. Concernant les autres molécules organiques étudiées dans ce travail (cymoxanil, tébuconazole, pyraclostrobine, folpel, fosétyl-Al et métirame-Zn), peu d'études également présentent des mesures d'accumulation dans les tissus animaux et le développement préalable de méthodes d'extraction et d'analyse de ces composés. Dans les études trouvées dans la littérature actuelle, ces substances sont généralement extraites dans des solvants organiques par broyage, puis les extraits sont concentrés par évaporation et les échantillons analysés en GC-MS (Konwick *et al.* 2006; Schreck *et al.* 2008; Crnogorac et Schwack 2009; Walorczyk et Gnusowski 2009).

Il est nécessaire de disposer de méthodes analytiques permettant de mesurer les concentrations en pesticides dans les tissus, notamment pour établir les LMR et vérifier que les produits d'origine animale destinés à la consommation ne les dépassent pas. De plus, concernant notre modèle, l'escargot, il est fondamental de savoir s'il peut contribuer au transfert de pesticides couramment appliqués en milieu agricole, dans les nombreuses chaînes alimentaires dans lesquelles il est impliqué.

Notre objectif est donc de développer deux méthodes d'extraction et d'analyse, une première avec les fongicides et une seconde avec les herbicides, permettant ainsi de mesurer les concentrations dans les escargots exposés aux pesticides lors des diverses expériences menées dans ces travaux (cf. Chapitres 3 et 4).

III.1.2.2 Extraction et analyse des fongicides en GC-MS

Pour développer cette méthode, nous nous somme basés sur celle mise au point par Schreck *et al.* (2008) pour l'extraction et l'analyse de 6 pesticides, dont le folpel et le fosétyl-Al, dans les vers de terre. Le fosétyl-Al et le métirame-Zn font partie du cocktail de fongicides appliqués sur la vigne, mais n'ont pas été retenus dans notre développement de méthode du fait d'une analyse plus complexe s'opérant avec des appareils dont nous ne disposions pas.

Pour les essais de mise au point, nous avons travaillé avec des escargots exempts de contamination provenant de l'élevage du LCE et dopés post-décongélation. L'extraction s'effectue à l'ASE et l'analyse en GC-MS.

1ère étape : préparation de l'échantillon

Les escargots sont décongelés, puis séchés avec du papier absorbant. Les viscères et le pied sont séparés en sectionnant juste au dessus du bord du manteau (Figure II.2) afin de mettre au point deux méthodes, une pour la détermination des concentrations dans le pied et une pour les viscères. En effet, du fait de la composition très différente de ces deux parties, les pieds étant riches en tissus musculaires, cellules à calcium et cellules à mucus (contenant des mucopolysaccharides, Skingsley *et al.* 2000), tandis que les viscères contiennent plus de lipides (Gomot 1998), il est très possible d'obtenir des rendements d'extraction différents. Les viscères et les pieds sont poolés par 3, afin d'obtenir une masse suffisante pour constituer un échantillon (environ 2 g).

Dans un premier temps, nous avons voulu broyer les tissus à l'ultra-turax, mais cette méthode nécessitant de rajouter du solvant, ce qui n'est pas compatible avec l'ASE, les échantillons ont finalement été finement fragmentés à l'aide de ciseaux fins. Une solution d'un mélange des 4 composés (cymoxanil, folpel, tébuconazole et pyraclostrobine) d'une concentration de 1 mg l^{-1} par molécule, est ajoutée au broyat. Du sulfate de sodium anhydre est également ajouté afin de donner à l'échantillon un aspect plus solide.

2ème étape : extraction solide / liquide

Les broyats sont placés dans les cellules ASE (d'un volume de 33 ml) qui sont complétées avec du sable. La méthode d'extraction est programmée selon les paramètres suivants (cf. Matériels et Méthodes, section II.3.1.1.2) :

- température : 100°C,
- pression : 103,45 Bar,
- solvants et pourcentage : 50% d'acétonitrile (ACN) et 50% de dichlorométhane,
- pourcentage de flush : 60%,
- temps de purge : 120 secondes,
- nombre de cycles : 3,
- durée d'un cycle : 3 min.

A la fin du dernier cycle, les extraits sont concentrés à l'évaporateur rotatif (la pression choisie est celle de l'ACN : 220 mBar) jusqu'à l'obtention d'un volume final entre 1,5 ml et 2 ml.

Les échantillons sont ensuite soit directement dérivés après cette étape, soit ils subissent une purification par chromatographie flash (cf. Matériels et Méthodes, section II.3.1.1.5) en utilisant une phase polaire (cartouche Si Redi Sep 4-80mg, Isco).

4ème étape : préparation de l'échantillon pour analyse.

Les étalons internes (atrazine pour folpel et pyraclostrobine et 4d-nitrophénol pour cymoxanil et tébuconazole) sont ajoutés aux échantillons et les *vials* sont complétés avec du solvant afin d'obtenir un volume final de 1 ml. Le réactif de dérivation (BSTFA+1%TMCS) est ajouté pour permettre la réaction (cf. Matériels et Méthodes, section II.3.2.2) puis les échantillons sont injectés en GC-MS.

Résultats et discussion

Grâce aux courbes d'étalonnage (cf. Matériels et Méthodes, section II.3.3.2), les rendements d'extraction de la méthode ASE / (Chromatographie Flash) / GC-MS peuvent être déterminés (Tableau III.1.3).

Tableau III.1.3. Rendements (%) obtenus pour les 4 fongicides des extraits ASE d'escargots purifiés ou non par chromatographie flash.

Purification	NON		OUI	
Tissus	Viscères	Pieds	Viscères	pieds
Cymoxanil	95	85	60	42
Folpel	0	0	0	0
Tebuconazole	84	92	104	95
Pyraclostrobine	0	0	0	0

Les chromatogrammes de GC-MS d'extraits d'escargots dopés aux fongicides et subissant une purification (Figure III.1.4) ne sont pas plus propres que ceux obtenus sans purification et les rendements sont équivalents. Seuls les pics du nitrophénol (ei), du cymoxanil et du tébuconazole peuvent être intégrés. Une impureté est contigüe au temps de rétention de l'atrazine (ei), ce qui ne permet pas d'intégrer son pic. Aucun pic correspondant au temps de rétention du folpel n'est visible sur les chromatogrammes. Le tébuconazole est légèrement coélué et la ligne ne base ne revient pas à zéro (Figure III.1.4) mais il peut cependant être intégré. La pyraclostrobine est coéluée avec une impureté importante sortant aux environs de 40 min (Figure III.1.4) et il n'est donc pas possible de l'intégrer.

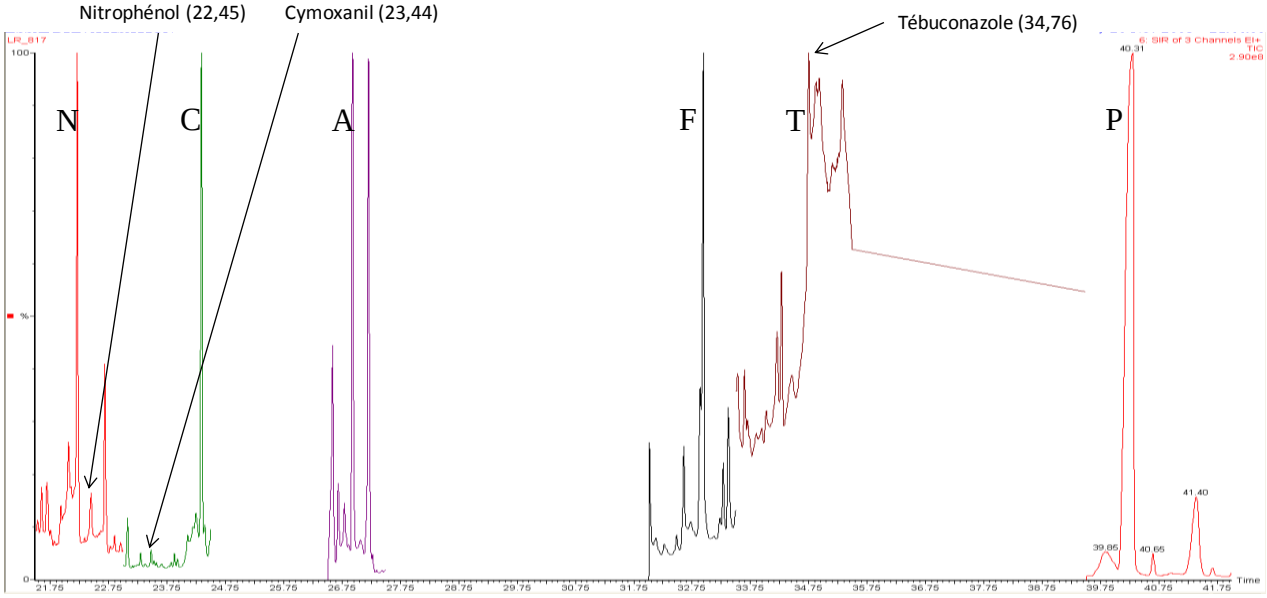


Figure III.1.4. Chromatogramme des 4 composés d'intérêt (vert/C : cymoxanil ; noir/F : folpel ; brun/T : tébuconazole et orange/P : pyraclostrobine) et des deux étalons internes (rouge/N : nitrophénol et violet/A : atrazine) lors du passage d'un extrait d'escargot purifié.

Il semblerait que les rendements soient un peu plus importants dans les viscères que dans les pieds (Tableau III.1.3). Cela pourrait s'expliquer par la présence des mucopolysaccharides

dans les pieds, protéines qui peuvent provoquer un effet de matrice plus important mais qui peuvent également rendre l'extraction plus difficile.

La purification par chromatographie flash n'étant pas efficace, d'autres techniques permettant d'éliminer les impuretés pourront être mises en œuvre afin d'améliorer les rendements comme par exemple, l'ajout d'une étape de délipidation selon la méthode décrite par Chen *et al.* (2009a). Après passage à l'ASE, les échantillons sont conservés 12 h au congélateur pour permettre une séparation des lipides, puis ils sont filtrés avant les étapes de concentration et de dérivation. L'efficacité de cette méthode n'a pas encore été testée.

III.1.2.3 Extraction et analyse des herbicides en HPLC-Fluo

La première partie est consacrée à une série d'essais d'extraction basés sur ceux développés pour le sol (cf. section III.1.1). Dans une seconde partie, des essais adaptés d'un protocole sur l'extraction du glyphosate et de l'AMPA sont présentés.

III.1.2.3.1 Essais d'extraction ASE, USE et agitation

Comme pour le sol (cf. section III.1.1), différentes techniques d'extraction sont testées :

- ASE : selon le même protocole que pour les fongicides (cf. section III.1.2.2) mais en faisant varier les paramètres du programme.
- Ultra Sonic Extraction (USE) : un bécher contenant le broyat d'escargots ainsi qu'un volume de solvant déterminé est placé dans un bain à ultra-sons. Plusieurs temps d'extraction sont testés. Le surnageant peut ensuite être récupéré et filtré ou alors la totalité peut être centrifugée.
- Agitation : un échantillon de broyat d'escargots est placé sous agitation magnétique dans un volume choisi de solvant. Les paramètres en jeu sont le temps d'agitation et le nombre de répétitions, ainsi que la durée du repos entre deux agitations. Comme après l'USE, l'échantillon peut être filtré ou centrifugé.

Des escargots exempts de contamination provenant de l'élevage du LCE sont décongelés, séchés avec du papier absorbant puis dopés par injection de 0,5 ou 1 ml d'un mélange des 3 composés à 50 mg l^{-1}. Ils sont ensuite fragmentés à l'aide de ciseaux fins et soit directement introduits dans les béchers pour l'extraction USE ou par agitation, ou soit broyés avec du sable de Fontainebleau puis introduits dans la cellule ASE. A partir de l'extrait obtenu, 2,5 ml sont prélevés auxquels sont ajoutés les réactifs de dérivation et l'échantillon est ensuite dérivé

puis analysé en HPLC-Fluo selon le protocole décrit en matériels et méthodes (cf. section II.3.2.1). Les résultats et les difficultés rencontrées sont présentés dans le Tableau III.1.4.

Tableau III.1.4. Résumé des différents essais d'extraction des herbicides réalisés à partir des escargots.

Type d'extraction	Matrice	Solvant utilisé	Paramètres	Observations
ASE	broyat de viscères avec $NaSO_4$ anhydre	eau	3 cycles: 5min ; flush: 60% ; purge: 12sec ; Temp: 120°C	extrait très sale avec résidus
	broyat d'escargot entier avec sable	eau	3 cycles: 15min ; Temp : 70°C	extrait beaucoup plus propre sans le $NaSO_4$ anhydre
	"	NaOH 1M	"	il est nécessaire de réajuster le pH pour permettre la dérivation
	résine XAD-2	"	"	pH réajusté
	pierre ponce	"	"	
	bille de verre	eau	"	
	sable	eau	100% flush 300sec purge	
USE	viscères	eau	2 x 5min 25ml solvant Filtration 0,22µm	récupération du surnageant entre les bains
	escargot entier	eau	1 x 10 min centrifugation filtration 0,22µm	obtention de plusieurs pics dans la zone concernée mais identification impossible
Agitation	escargot entier	eau	1h x repos 12h x 1h 30ml centrifugation	non injecté car obtention d'un surnageant très visqueux, épais
	"	NaOH 0,1M	"	impossibilité de réajuster le pH car l'HCl ne se dissout pas dans le surnageant

Aucun rendement n'a pu être obtenu quelque soit le type d'extraction testé.

Concernant la méthode ASE, différentes matrices ont été essayées ainsi que différents paramétrages. Les premiers essais ont été réalisés avec du sulfate de sodium anhydre. Cependant, ce sel se dissout à l'intérieur de la cellule, passe dans l'extrait et recristallise ensuite ce qui ne permet pas l'injection de l'échantillon dans l'HPLC. A la suite de cette expérience, d'autres matrices solides permettant de déshydrater l'échantillon (sable) ou d'éliminer les interférents (résine XAD-2) ou tout simplement pour compléter le vide de la cellule (billes de verre, pierre ponce) ont été testées. Bien que les extraits obtenus soient nettement plus propres, aucune de ces approches n'a donné de rendement satisfaisant.

Pour la méthode par agitation, l'extrait obtenu ne peut tout simplement pas être injecté en HPLC car trop épais et visqueux (probablement dû aux polysaccharides du mucus).

Seule la méthode par ultra-sons semble être une piste prometteuse puisque sur le chromatogramme, des pics ont été observés mais il n'a pas été possible de déterminer s'ils correspondaient bien aux molécules étudiées.

III.1.2.3.2 Adaptation du protocole de Schneider (2001)

Dans un second temps, après de nombreuses recherches et divers contacts, nous avons pu nous procurer le rapport final de la « Validation d'une méthode analytique pour la détermination du glyphosate dans des produits alimentaires d'origine animale (viande, œufs, lait) » réalisé par l'Allemagne, pays rapporteur de la substance dans le cadre de son évaluation pour son inscription à l'annexe I de la directive 91/414 (Schneider 2001). Cette méthode est basée sur une extraction par agitation, suivie d'une purification par SPE et une analyse en GC-MS.

Le protocole est le suivant :

- Fine fragmentation des escargots dopés à l'aide de ciseaux fins,
- Agitation à l'eau 10 min, ajout d'une pipetée de soude 1M et de nouveau agitation 10 min,
- Centrifugation 15 min à 3000 rpm,
- Chauffage de l'extrait jusqu'à ébullition (environ 10 min à 100°C),
- Centrifugation 15 min à 3000 rpm,
- Passage de l'extrait sur la résine échangeuse d'anions en SPE,
- Elution avec 10 ml d'HCl 1M.

Après cette étape, nous avons adapté cette procédure de façon à pouvoir passer l'échantillon en HPLC-Fluo plutôt qu'en GC-MS :

- Réajustement du pH (entre 6 et 9),
- Dérivation avec FMOC-Cl et Borate,
- Extraction liquide-liquide à l'éther,
- Injection HPLC-Fluo

Cette méthode, qui obtenait des pourcentages de recouvrement de 97-101% pour le glyphosate selon Schneider (2001), ne s'est pas montrée être d'une grande efficacité, d'une part parce que le rendement de la résine SPE en lui-même est très faible et d'autre part parce que malgré la purification, il reste encore beaucoup d'impuretés.

III.1.2.3.2.1 Test du rendement de la résine SPE

Dans un premier temps, avant de débuter les essais avec les extraits d'escargots, nous avons voulu savoir quel était le rendement de la résine utilisée pour la SPE en la dopant avec des standards (mélange de glyphosate, d'AMPA et de glufosinate à une concentration connue).

La résine à SPE (résine échangeuse d'anions AG1x8-100, Supelco D-82041 Deisenhof, Chlorid form (Dower-1-chloride), # OG 16012 DA1) est d'abord nettoyée au Soxhlet pendant 3-4 heures avec du méthanol puis elle est rincée par trois agitations successives d'une ½ heure dans l'eau ultra-pure. Les essais et résultats sont présentés dans la Figure III.1.5.

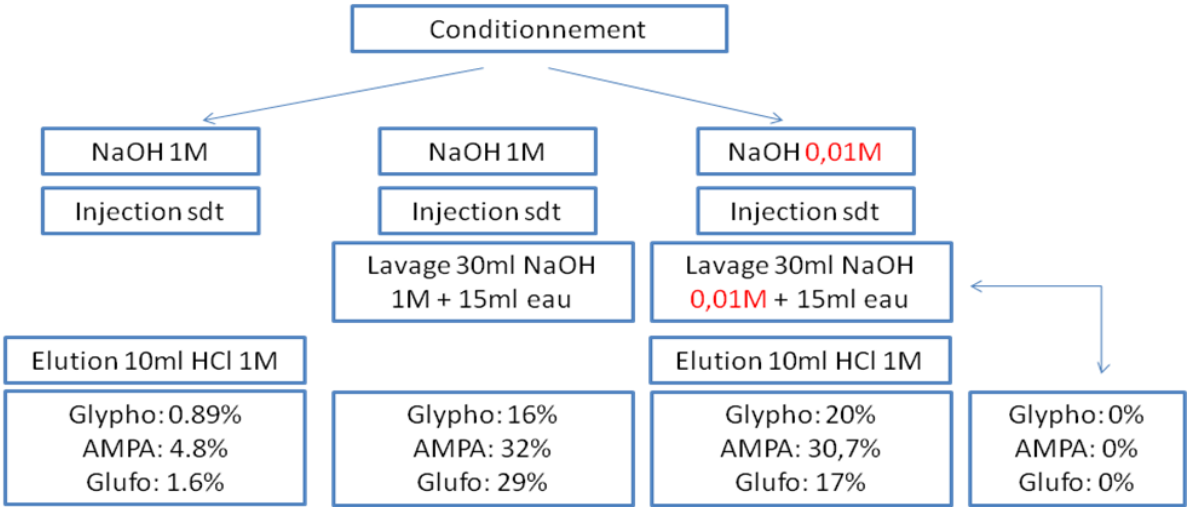


Figure III.1.5. Tests de rendements effectués sur la résine lorsqu'elle est dopée avec un standard, c'est-à-dire sans la matrice escargot.

Selon la méthode décrite ci-dessus, le conditionnement ainsi que le lavage de la résine doivent s'effectuer avec de l'hydroxyde d'ammonium, mais n'en disposant pas dans un premier temps, il a été remplacé par de la soude. Les meilleurs rendements d'élution, bien que loin d'atteindre les 100%, sont obtenus avec un conditionnement à la soude à 0,01 M et une élution à l'HCl à 1 M. Un lavage à une concentration trop forte de soude (1 M) entraine la perte des composés dans la solution de lavage mais une analyse de la solution de lavage à la soude à 0,01 M a montré qu'elle ne contenait pas de composé. Afin de comprendre pourquoi les rendements obtenus étaient si faibles et de chercher à les améliorer, d'autres essais ont été conduits sur la résine SPE, cette fois en injectant seulement du glyphosate et de l'AMPA ou du glufosinate afin de permettre un calcul de la concentration obtenue par étalonnage interne (Figure III.1.6).

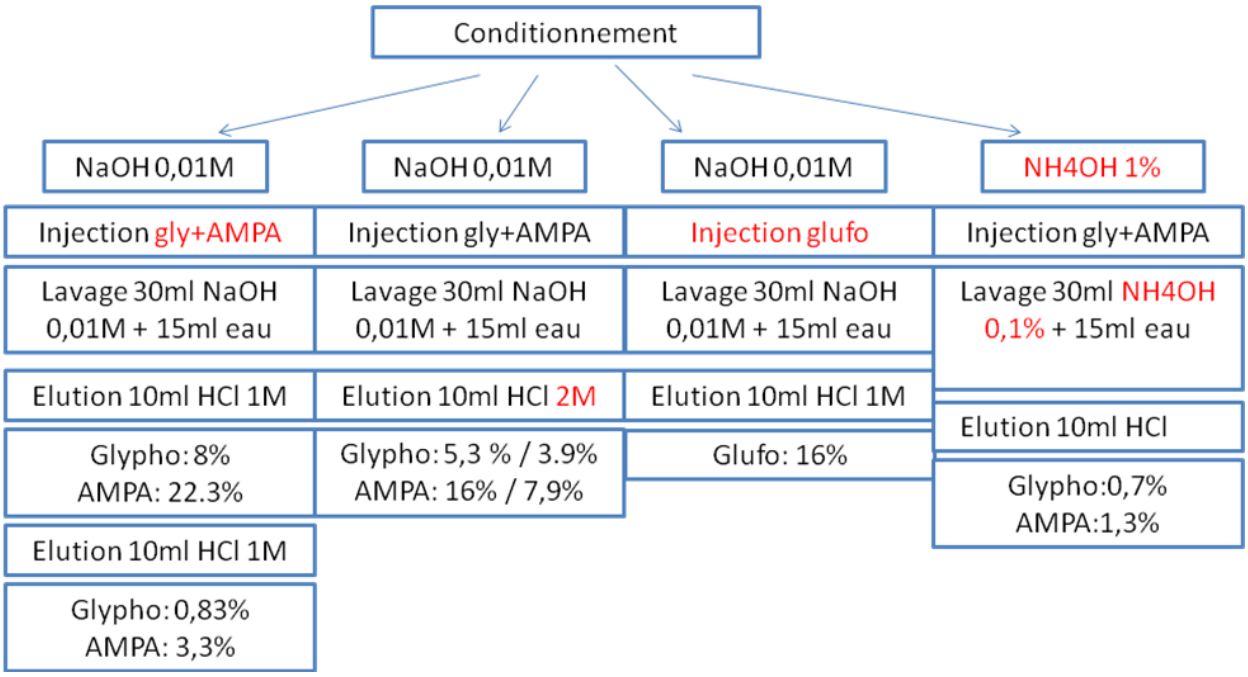


Figure III.1.6. Tests de rendement effectués sur la résine lorsqu'elle est dopée soit avec du glyphosate et de l'AMPA soit avec du glufosinate.

Une seconde élution à l'HCl s'avère inutile car très peu de composés sont retrouvés dans cette seconde fraction. De même qu'en augmentant la concentration de l'éluant (en passant de 1 M à 2 M), on n'augmente pas la récupération des composés mais cela entraine plutôt une diminution de leur concentration dans l'éluat. L'hydroxyde d'ammonium (celui utilisé dans la méthode de Schneider) élue nettement moins bien que la soude.

La procédure de SPE réalisée par la suite avec les extraits d'escargots a donc été conduite de la manière suivante : conditionnement à la soude 0,01 M, injection de l'extrait, lavage avec 30 ml de soude 0,01 M et 15 ml d'eau puis élution avec 10 ml d'acide chlorhydrique 1 M, en sachant que les rendements ne dépassent pas les 8-20% pour le glyphosate, les 22-30% pour l'AMPA et les 16-17% pour le glufosinate.

III.1.2.3.2.2 Essais avec les escargots

Sur les escargots, différents essais ont été réalisés, en appliquant la méthode de Schneider (2001) ou en modifiant certains points. Le chauffage de l'extrait et la 2nde centrifugation ont été rapidement abandonnés puisqu'il n'a été constaté aucune différence avec ou sans. Ci-dessous sont présentés divers chromatogrammes correspondant à différents essais d'extraction sur la matrice escargot.

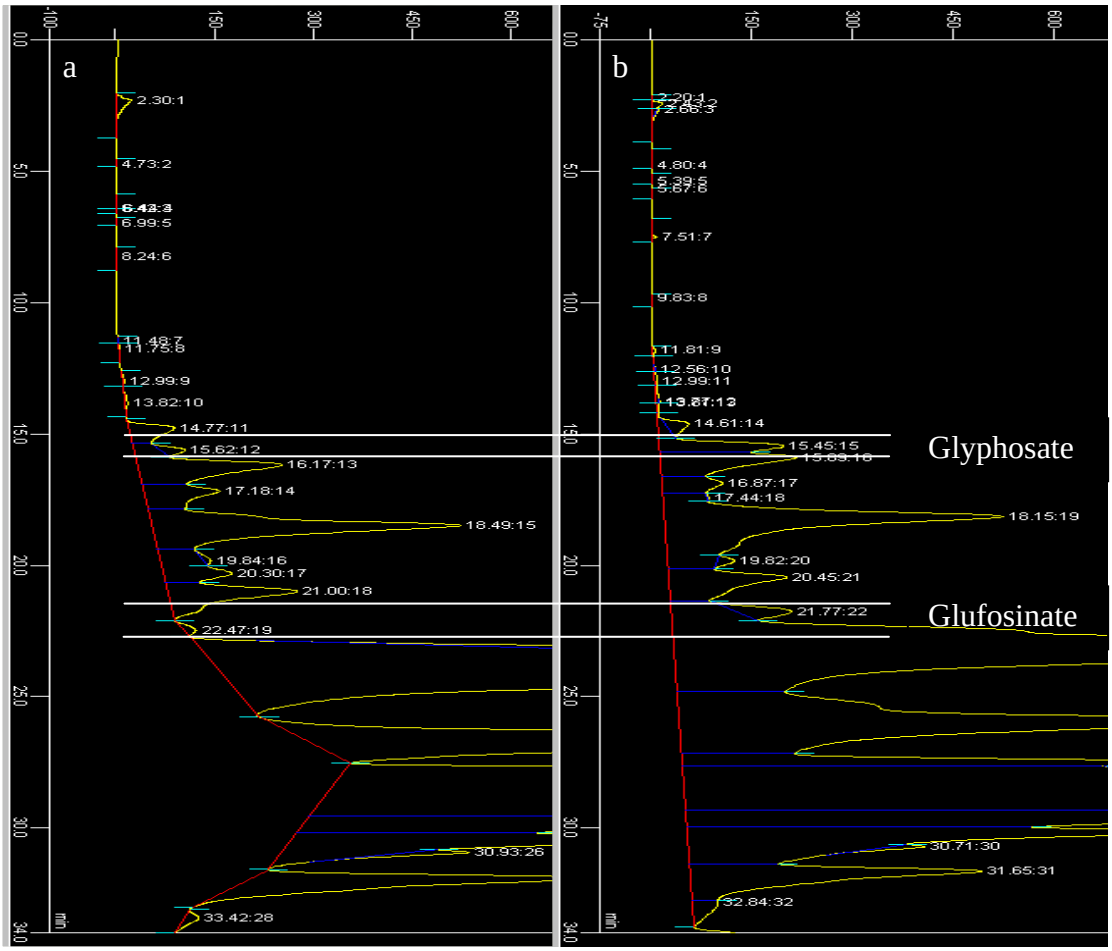


Figure III.1.7. (a) Chromatogramme d'un extrait d'escargot réalisé selon la méthode de Schneider (2001) ; (b) même extrait mais dopé avec de l'échantillon standard.

La zone concernée par les 3 pics se situe environ entre 15 et 23 minutes (cf. section II.3.1.2.1). Lorsque l'extrait est dopé afin de retrouver les pics correspondant aux composés, deux pics augmentent (entre les lignes horizontales blanches, Figure III.1.7b). On peut ainsi en déduire les pics des composés sur la Figure III.1.7a : glyphosate à 15,62 min et glufosinate à 22,47 min. Le glufosinate est l'étalon interne (ei) mais par effet de matrice, lorsqu'il est rajouté avant l'étape de dérivation, il ne sort pas correctement. Par la suite, pour corriger ce problème, l'ei a été rajouté, déjà dérivé, après que l'extrait ait été lui-même dérivé. Dans ce cas précis, il n'est donc pas possible d'utiliser l'ei pour calculer le rendement du glyphosate. Le rendement a donc été calculé sur un standard injecté dans la journée, mais le rendant moins précis avec une plus grande marge d'erreur. Il a été déterminé un rendement de 28,8%. En revanche, l'AMPA n'a pas été retrouvé. D'autres essais ont été réalisés, dont une extraction à l'eau, où par la même méthode de dopage de l'extrait, des rendements de 2,8% pour le glyphosate et 3,7% pour l'AMPA, mais 0% pour le glufosinate, ont été déterminés.

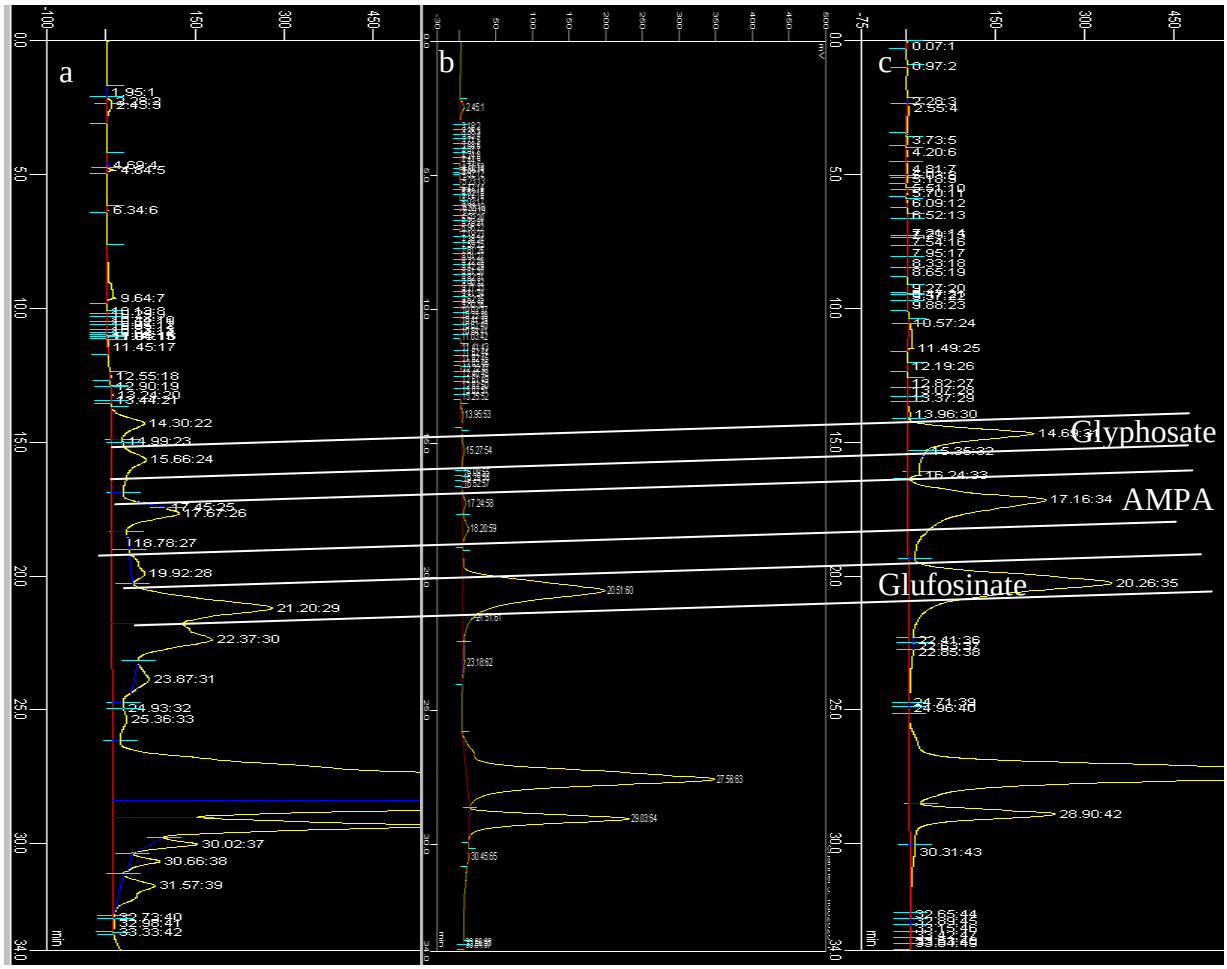


Figure III.1.8. (a) Chromatogramme d'un échantillon d'escargot réalisé selon la méthode de Schneider, (b) ce même extrait après ajout d'une extraction liquide / liquide au dichlorométhane, (c) puis dopé avec de l'échantillon standard.

Dans cet extrait (Figure III.1.8), l'escargot a été dopé uniquement avec du glyphosate et de l'AMPA afin de pouvoir utiliser l'ei, cette fois rajouté après dérivation. Dans la figure III.1.8a, le glufosinate (ei) est identifié à 21,20 min. Une étape d'extraction liquide / liquide au dichlorométhane a été ajoutée afin de déterminer si cela permettait d'éliminer des impuretés. Ainsi, l'ei n'est plus coélué avec une impureté (Figure III.1.8b), et le chromatogramme, dans l'ensemble, est beaucoup plus propre. Afin de déterminer si parmi les petits pics sortant avant le glufosinate, il est possible d'identifier le glyphosate et l'AMPA, l'extrait est dopé avec du mélange standard. On peut ainsi observer les pics de glyphosate (14,69') et d'AMPA (17,16') qui augmentent (Figure III.1.8c) et en déduire les rendements à partir des aires de la figure III.1.8b, mais ceux-ci sont encore très faibles. Cet essai nous montre cependant, qu'une extraction liquide / liquide au dichlorométhane, après passage sur la cartouche SPE, peut être une piste à suivre.

Ce même test a été réalisé avec une extraction à l'eau et en dopant l'escargot uniquement avec du glufosinate, l'ei étant cette fois le glyphosate. Les résultats indiquent que le glufosinate n'est pas extrait (il n'y a pas de pic correspondant sur le chromatogramme).

Un autre essai de purification a également été réalisé avec le même extrait (après l'étape de centrifugation) que l'escargot de la figure III.1.8. Avant le passage sur cartouche SPE, une étape a été rajoutée où l'extrait est de nouveau agité, mais avec de l'acétonitrile cette fois. L'eau et l'acétonitrile étant miscibles, l'extrait s'est parfaitement mélangé et les particules remises en solution ont été éliminées par une seconde centrifugation. Cet extrait est ensuite passé sur la cartouche de SPE puis la procédure classique de dérivation est appliquée.

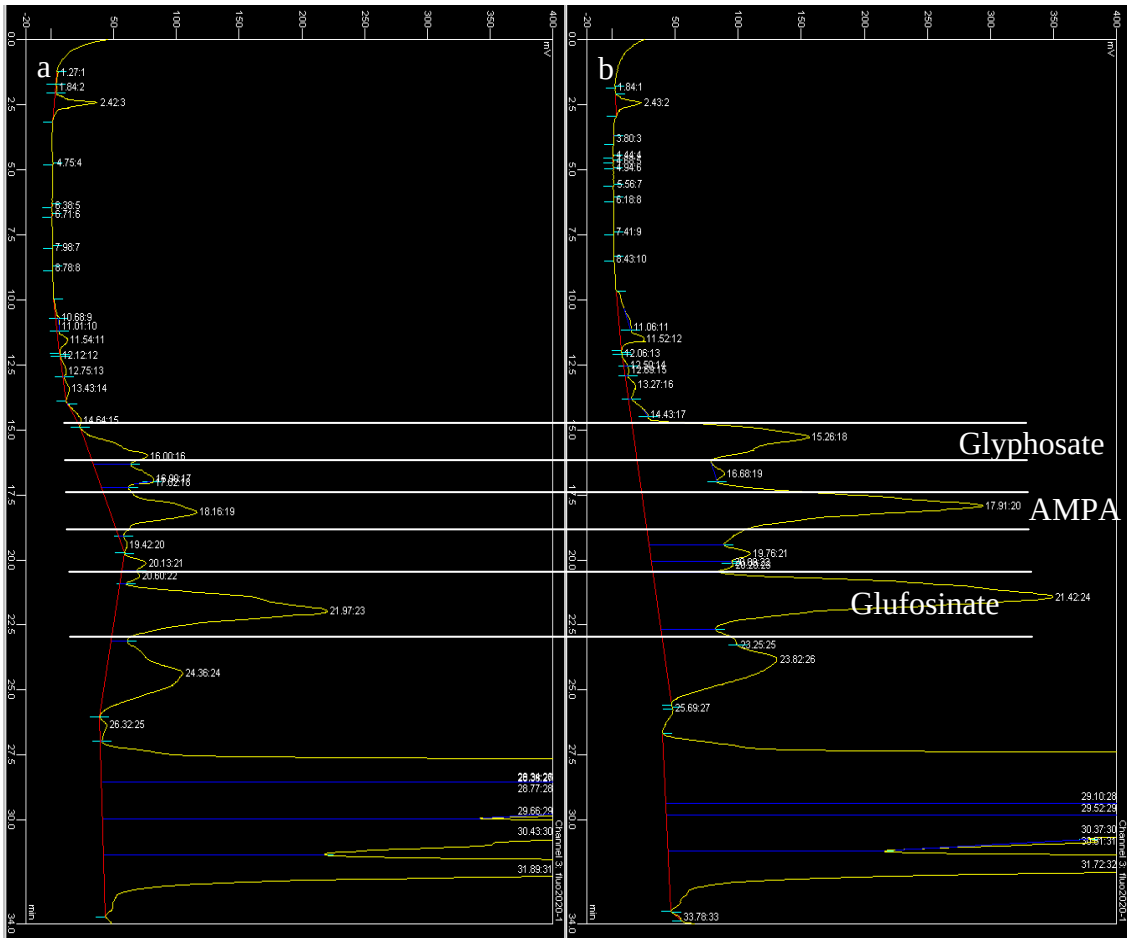


Figure III.1.9. (a) Chromatogramme d'un extrait d'escargot réalisé selon la méthode de Schneider (2001) avec ajout d'une étape d'extraction à l'acétonitrile, (b) ce même extrait mais dopé avec de l'échantillon standard.

Le chromatogramme (Figure III.1.9a) montre des pics dans la zone concernée et le glufosinate (ei) apparait à 21,97 min. Lorsqu'on dope avec du standard (Figure III.1.9b), il semblerait qu'on puisse identifier le glyphosate à 16 min et l'AMPA à 18,16 min sur la figure III.1.9a. Dans ce cas, les rendements, basés sur l'ei, seraient de 70% pour le glyphosate et

supérieurs à 100% pour l'AMPA, ce qui est curieux, puisque le seul rendement de la résine est inférieur à cela (cf. section III.1.2.3.2.1). Cette piste ayant été abordée en fin de thèse, elle n'a pas pu être approfondie mais il serait intéressant de poursuivre dans cette voie.

Remarque :

L'extraction du glyphosate et des composés analogues s'est révélée extrêmement délicate et les méthodes existantes (peu nombreuses) ne correspondent pas toujours avec la réalité des faits, dans le sens où l'on retrouve rarement les rendements annoncés. Cependant, les nombreux essais ont fait ressortir quelques pistes, comme des purifications avec des solvants organiques et l'utilisation de la SPE mais en essayant d'autres types de cartouches. La méthode décrite par Schneider indiquait également une analyse en GC-MS. Cette méthode, plus longue à développer, mais sans doute plus sélective, pourrait réduire les impuretés et faire ressortir l'intensité des pics.

III.1.2.4 Conclusion

Parmi les objectifs fixés en début de thèse, l'extraction et l'analyse des résidus de pesticides dans les tissus d'escargots constituaient l'un des enjeux majeurs. Cependant, les différents essais réalisés à Strasbourg n'ont pas permis d'atteindre cet objectif, tout d'abord parce que cela s'est révélé être d'une grande difficulté mais également par manque de temps.

Les résultats n'ayant pas pu permettre d'aboutir à des méthodes validées pour extraire et analyser les fongicides et les herbicides des échantillons d'escargots, collectés lors de la campagne *in situ* (cf. section II.2.6) et ceux susceptibles d'être contaminés aux herbicides, collectés lors des expériences sur la mesure des effets à long terme (cf. section II.1.3.2), une partie d'entre eux ont été envoyés à un laboratoire privé, l'IPL santé, environnement durables (Nord pour les fongicides ou Bordeaux pour les herbicides) :

- Les escargots exposés aux fongicides ont été broyés puis lyophilisés et les composés ont ensuite été extraits aux ultra-sons dans un mélange de solvants acétone / méthanol. Ils ont été analysés en LC-MS/MS.
- Seuls les escargots exposés au glyphosate ont été envoyés pour analyse car **aucun laboratoire n'analyse le glufosinate dans les tissus animaux**. Les escargots ont été broyés puis les composés ont été extraits et analysés par une dérivation post-colonne au FMOC-Cl suivie d'une séparation et détection en HPLC-Fluo.

III.1.3 Références

(ISO 21458:2008). Determination of glyphosate and AMPA. Method using high performance liquid chromatography (HPLC) and fluorometric detection. Water quality

(Soil Survey Staff 1993). Soil survey manual. Washington, DC, US Government printing office.

Accinelli C, Screpanti C, Vicari A et Catizone P (2004). "Influence of insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki on the degradation of glyphosate and glufosinate-ammonium in soil samples." Agriculture Ecosystems & Environment **103**(3): 497-507.

Aubin A, J et Smith A, E. (1992). "Extraction of [14C] Glyphosate from Saskatchewan Soils." Journal of Agricultural and Food Chemistry **40**(7): 1163-1165.

Babic S, Zelenika A, Macan J et Kastelan-Macan M (2005). "Ultrasonic extraction and TLC determination of glyphosate in the spiked red soils." Agriculturae Conspectus Scientificus **70**(3): 99-103.

Börjesson E et Torstensson L (2000). "New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in water and soil." Journal of Chromatography A **886**(1-2): 207-216.

Chen S, Yu X, He X, Xie D, Fan Y et Peng J (2009a). "Simplified pesticide multiresidues analysis in fish by low-temperature cleanup and solid-phase extraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry." Food Chemistry **113**(4): 1297-1300.

Chen ZL, He WX, Beer M, Megharaj M et Naidu R (2009b). "Speciation of glyphosate, phosphate and aminomethylphosphonic acid in soil extracts by ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction system." Talanta **78**(3): 852-856.

Contardo-Jara V, Klingelmann E et Wiegand C (2009). "Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes." Environmental Pollution **157**(1): 57-63.

Conte E, Milani R, Morali G et Abballe F (1997). "Comparison between accelerated solvent extraction and traditional extraction methods for the analysis of the herbicide diflufenican in soil." Journal of Chromatography A **765**(1): 121-125.

Crnogorac G et Schwack W (2009). "Residue analysis of dithiocarbamate fungicides." TrAC Trends in Analytical Chemistry **28**(1): 40-50.

Faber MJ, Stephenson GR et Thompson DG (1997). "Persistence and leachability of glufosinate-ammonium in a northern Ontario terrestrial environment." Journal of Agricultural and Food Chemistry **45**(9): 3672-3676.

Ghanem A, Bados P, Kerhoas L, Dubroca J et Einhorn J (2007). "Glyphosate and AMPA Analysis in Sewage Sludge by LC-ESI-MS/MS after FMOC Derivatization on Strong Anion-Exchange Resin as Solid Support." Analytical Chemistry **79**(10): 3794-3801.

Gomot A (1998). "Biochimical composition of *Helix* snails: influence of genetic and physiological factors." Journal of Molluscan Studies **64**: 173-181.

Hidalgo C, Rios C, Hidalgo M, Salvadó V, Sancho JV et Hernández F (2004). "Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters." Journal of Chromatography A **1035**(1): 153-157.

Ibanez M, Pozo OJ, Sancho JV, Lopez FJ et Hernandez F (2005). "Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1081**(2): 145-155.

IFEN (2007). "Les pesticides dans les eaux. Données 2005." Les dossiers de l'Ifen(09).

Jan MR, Shah J, Muhammad M et Ara B (2009). "Glyphosate herbicide residue determination in samples of environmental importance using spectrophotometric method." Journal of Hazardous Materials **169**(1-3): 742-745.

Kang S, Choi WI et Ryoo MI (2001). "Demography of *Paronychiurus kimi* (Lee) (Collembola: Onychiuridae) under the influence of glufosinate-ammonium on plaster charcoal substrate and in artificial soil." Applied Soil Ecology **18**(1): 39-45.

Kataoka H, Ryu S, Sakiyama N et Makita M (1996). "Simple and rapid determination of the herbicides glyphosate and glufosinate in river water, soil and carrot samples by gas chromatography with flame photometric detection." Journal of Chromatography A **726**(1-2): 253-258.

Konwick BJ, Garrison AW, Avants JK et Fisk AT (2006). "Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Aquatic Toxicology **80**(4): 372-381.

Le Bot B, Colliaux K, Pelle D, Briens C, Seux R et Clement M (2002). "Optimization and performance evaluation of the analysis of glyphosate and AMPA in water by HPLC with fluorescence detection." Chromatographia **56**(3-4): 161-164.

Mallat E et Barceló D (1998). "Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection." Journal of Chromatography A **823**(1-2): 129-136.

Nedelkoska TV et Low GK-C (2004). "High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate." Analytica Chimica Acta **511**(1): 145-153.

Ozmen M, Ayas Z, Gungordu A, Ekmekci GF et Yerli S (2008). "Ecotoxicological assessment of water pollution in Sariyar Dam Lake, Turkey." Ecotoxicology and Environmental Safety **70**(1): 163-173.

Qian K, Tang T, Shi T, Wang F, Li J et Cao Y (2009). "Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride." Analytica Chimica Acta **635**(2): 222-226.

Sancho JV, López FJ, Hernández F, Hogendoorn EA et van Zoonen P (1994). "Rapid determination of glufosinate in environmental water samples using 9-fluorenylmethoxycarbonyl precolumn derivatization, large-volume injection and coupled-column liquid chromatography." Journal of Chromatography A **678**(1): 59-67.

Schneider E (2001). Validation of an analytical method for the determination of glyphosate in foodstuff of animal origin (meet, eggs, milk). Feinchemie Schwebda GmbH. Köln. Final report.

Schreck E, Geret F, Gontier L et Treilhou M (2008). "Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*." Chemosphere **71**(10): 1832-1839.

Skingsley DR, White AJ et Weston A (2000). "Analysis of pulmonate mucus by infrared spectroscopy." Journal of Molluscan Studies **66**: 363-371.

Stalikas CD et Konidari CN (2001). "Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides." Journal of Chromatography A **907**(1-2): 1-19.

Walorczyk S et Gnusowski B (2009). "Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction

and gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1216**(37): 6522-6531.

Wang YS, Jaw CG et Chen YL (1994). "Accumulation of 2,4-D and glyphosate in fish and water hyacinth." Water Air and Soil Pollution **74**(3-4): 397-403.

Winter MJ, Verweij F, Garofalo E, Ceradini S, McKenzie DJ, Williams MA, Taylor EW, Butler PJ, van der Oost R et Kevin Chipman J (2005). "Tissue levels and biomarkers of organic contaminants in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) from rivers in the West Midlands, UK." Aquatic Toxicology **73**(4): 394-405.

Wolkers H, Hammill MO et van Bavel B (2006). "Tissue-specific accumulation and lactational transfer of polychlorinated biphenyls, chlorinated pesticides, and brominated flame retardants in hooded seals (*Cistophora cristata*) from the Gulf of St. Lawrence: Applications for monitoring." Environmental Pollution **142**(3): 476-486.

Yasmin S et D'Souza D (2007). "Effect of pesticides on the reproductive output of *Eisenia fetida*." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **79**(5): 529-532.

III.2 Chapitre 2 : Développement de tests d'embryotoxicité sur les œufs d'escargots pour l'évaluation des contaminants du sol

III.2.1 Towards the development of an embryotoxicity bioassay with terrestrial snails: screening approach for cadmium and pesticides

Cette partie a fait l'objet d'une publication acceptée en 2010 dans la revue *Journal of Hazardous Materials*. Les auteurs sont Coline Druart, Renaud Scheifler et Annette de Vaufleury.

Résumé

Actuellement, il n'existe pas de bioessai disponible pour évaluer l'embryotoxicité des substances chimiques sur les invertébrés du sol. C'est pourquoi nous présentons un nouveau test d'embryotoxicité avec les œufs d'escargots, qui constituent un matériel biologique adapté : ils incubent dans le sol et peuvent être exposés aux contaminants contenus dans les lixiviats ou la solution du sol. Les effets de solutions aqueuses de deux formulations d'herbicides, le Reglone® (substance active, s.a., diquat) et le Roundup® (s.a., glyphosate), de glyphosate, d'un surfactant (l'Agral® 90, s.a., nonylphénol polyéthoxylé) et de cadmium (Cd) ont été étudiés. Les paramètres de toxicité étudiés sont le succès d'éclosion et l'observation des malformations de l'embryon après exposition. Il ressort que le Roundup® est plus toxique que sa substance active, le glyphosate testé seul (EC50 = 18 mg l^{-1} et EC50 ≈ 1300 mg l^{-1}, respectivement). Le Reglone® (EC50 = 0,72 mg l^{-1}) et l'Agral® (EC50 ≈ 50 mg l^{-1}) ont également été testés en mélange, révélant que la toxicité est due à 99% au Reglone®. Une interaction antagoniste a été trouvée entre les deux produits. Il a été démontré que le Cd (EC50 = 3,9 mg l^{-1}) transfère de façon significative du milieu d'exposition aux œufs, et affecte particulièrement l'albumen. Les malformations de l'embryogénèse chez les embryons non éclos dépendent de la substance et de la concentration considérées.

Mots-clés : *Helix aspersa*, développement embryonnaire, toxicité de mélange, glyphosate, diquat.

Journal of Hazardous Materials 184 (2010) 26–33

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hazardous Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhazmat

Towards the development of an embryotoxicity bioassay with terrestrial snails: Screening approach for cadmium and pesticides

Coline Druart, Renaud Scheifler, Annette de Vaufleury*

Department of Chrono-Environment, University of Franche-Comté, UMR UFC/CNRS 6249 usc INRA, Place Leclerc, F-25030 Besançon Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 April 2010
Received in revised form 21 July 2010
Accepted 24 July 2010
Available online 1 August 2010

Keywords:
Helix aspersa
Embryonic development
Mixture toxicity
Glyphosate
Diquat

ABSTRACT

Currently no bioassays are available to assess the embryotoxicity of chemicals with terrestrial soil invertebrates. We therefore presented a new method for embryotoxicity testing with snail eggs: a relevant biological material that incubates in soil and that can be exposed to contaminants from leachates and soil solution. The effects of aqueous solutions of two herbicide formulations, Reglone® (active ingredient (a.i.), diquat) and Roundup® or its a.i., glyphosate, of a surfactant (Agral® 90, a.i., nonylphenol polyethoxylates) and of cadmium (Cd) were studied. Endpoints were the hatching success and observations of embryo abnormalities after exposure. Roundup® was found to be more toxic than its a.i. alone ($EC50_{a.i.}$ = 18 mg/l and about 1300 mg/l, respectively). Reglone® ($EC50_{a.i.}$ = 0.72 mg/l) and Agral® ($EC50_{a.i.}$ ≈ 50 mg/l) were also tested together, revealing that Reglone® accounted for more than 99% of the mixture's toxicity. An antagonistic interaction between the two substances was found. For Cd (EC50 = 3.9 mg/l), a significant transfer from exposure medium to eggs was emphasized, particularly affecting the albumen. Abnormalities of embryogenesis in non-hatched embryos depended on the substance and the concentration considered.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

III.2.1.1 Introduction

To assess the hazards involved in the action of chemicals on soil organisms, several biological methods have been developed on nematodes, earthworms, collembolans and snails. The toxicity endpoints of most of the bioassays are survival, growth and reproduction (Leung *et al.* 2008; Roh *et al.* 2010; ISO 10872:2010; ISO 15952:2006). To our knowledge, no standardized bioassay specifically concerns the effects of pollutants on embryonic development of any of the terrestrial organisms that make up the soil fauna. Yet, soil is often the first receptor of contaminants and hatching success is crucial for the stability of populations (Ricklefs et Miller 1999). Moreover, on the basis of data on aquatic organisms, the embryos are generally found to be more sensitive than adults (Gomot 1998; Geffard *et al.* 2002; Strmac *et al.* 2002; Schirling *et al.* 2006).

Thus, our aim was to lay down the bases of a method to assess the embryotoxicity of chemicals on *Helix aspersa*. This terrestrial gastropod is already the subject of a standardized test based on the effects of pollutants on survival and growth of juveniles (ISO 15952:2006) and can be adapted for reproduction (Gimbert *et al.* 2008).

Snails lay their eggs in the topsoil (2-5 cm depth) and can be exposed to contaminants deposited on the ground and then leached downwards. Thus, we chose here to expose eggs to aqueous solutions of contaminants, i.e. in a liquid phase bioassay.

The toxicity of inorganic (cadmium) and organic (pesticides) compounds on embryo development and hatching success, of *H. aspersa* was assessed. While embryotoxicity data for Roundup® and Reglone® exist for aquatic organisms (Perkins *et al.* 2000; Bringolf *et al.* 2007; Coutellec *et al.* 2008), they are not available for this life stage in terrestrial invertebrates. Although glyphosate, which is among the most widely used pesticides in the world, was found to be less toxic alone than its formulation (e.g. Roundup®) (Tsui et Chu 2003; Marc *et al.* 2005; Richard *et al.* 2005; Elandalloussi *et al.* 2008) on different organisms as well as on human cells, there is no available information on that point for land snails. Reglone®, which contains the a.i. diquat, is often used with adjuvants, for instance with nonylphenol polyethoxylates (NPEOs). It was tested alone and in mixtures with Agral® 90, a commercial formulation of a mixture of NPEOs. Cd was chosen as a reference substance known for its high embryotoxicity (Brasfield *et al.* 2004; Hallare *et al.* 2005b). To document the permeability of egg membranes to metal and internal concentration-effect relationships, Cd concentrations were measured in different parts of the exposed eggs. The embryogenesis of unexposed and exposed embryos was compared.

III.2.1.2 Materials and methods

III.2.1.2.1 Chemicals

Reglone® 2 (200 g l^{-1} diquat dibromide; Syngenta Agro S.A.S., Velizy-Villacoublay, France), Agral® 90 (945 g l^{-1} NPEOs; Syngenta Agro) and Roundup® Biovert 360 (360 g l^{-1} glyphosate; Monsanto Europe S.A.) were used. Aqueous solutions of Cd and glyphosate were prepared with solid $CdCl_2$ (99.99%, Sigma Chemical Co, St Louis, Mo; C-2544) and solid glyphosate (99%, Sigma-Aldrich Chimie SARL, Lyon, France, CAS n°1071-83-6). All dilutions were prepared with demineralised water (pH = 6.2), which also served as control. Concentrations of final tests are presented in Table III.2.1. For glyphosate and Agral®, the repeatability (test 2 with the same concentrations) and reproducibility (test 3 with other concentrations) were tested.

Table III.2.1. Range of nominal concentrations used for each contaminant and corresponding pH.

Solution	Replicate number	Test number	Range of concentrations	pH
Glyphosate (mg l^{-1})	3	test 1	225 - 450 - 900 - 1800 - 3600	2.3<pH<3.1
	3	test 2	225 - 450 - 900 - 1800 - 3600	
	4	test 3	1000 - 1400 - 1960 - 2740 - 3840	
Roundup® (mg l^{-1} of glyphosate)	5	test 1	1.8 - 9 - 45 - 225	4.9<pH<6.2
Reglone® (mg l^{-1} of diquat)	6	test 1	0.375 - 0.75 - 1.5 - 3 - 6	6.4<pH<6.6
Agral® (mg l^{-1} of NPEOs)	3	test 1	12.5 - 25 - 50 - 100 - 200	6.4<pH<6.9
	3	test 2	12.5 - 25 - 50 - 100 - 200	
	4	test 3	39 - 54.7 - 76.5 - 107.1 - 150 - 210	
Mixture (mg l^{-1} of diquat) [a]	4	test 1	0.4 - 0.6 - 0.8 - 1.1 - 1.5 - 2.1 - 3	6.1<pH<6.5
Cd (mg l^{-1})	4	test 1	2 - 4 - 6 - 8 - 10	5.8<pH<6.3

[a] Proportion of Reglone® in mixture: 0.68, according to the recommendations of Syngenta Agro S.A.S.

III.2.1.2.2 Snails and clutches

Adult *Helix aspersa aspersa* Müller (*syn. Cantareus aspersus aspersus* Müller, 1774 or *Cornu aspersum*) snails (aged between four months and one year) came from our standardized laboratory rearing (ISO 15952:2006). To isolate the clutches, 125-ml glass pots filled with damp horticultural compost (SEM NF 44-551, with fertiliser; organic matter: 82%, pH: 6.5) were placed in snail cages the evening. The next morning, the glass pots were isolated to identify the laying snail and to be sure that there was only one clutch per container (Figure III.2.1). The duration of egg-laying is between 24 and 32 h. After snails have laid their eggs, the clutches can be removed from the compost. In each clutch, eggs were counted (between 70 and 150 per clutch), washed with tap water at 20°C to remove soil particles and then deposited on damp blotting paper in Petri dishes (Sterilin, 90x14.2mm, crystal polystyrene, triple vent) until the experiments.

Figure III.2.1. Laying snails in glass pots allowing easy sampling of fresh alive eggs.

III.2.1.2.3 Exposure device

Rapidly after egg-laying, each clutch was separated into groups of 8 to 10 eggs which were placed in Petri dishes (Greiner Bio-one, 35x10mm, crystal polystyrene, triple vent). Four layers of paper (Quantitative filter paper grade 40 ashless, Whatman) dampened with 0.8 ml of control or contaminated solutions (Table III.2.1) were laid on the bottom of the Petri dishes (this volume is enough to keep with the humidity until hatching). The eggs were incubated in these dishes at 20 ± 2°C, 18h light per day and humidity of 80-90% until hatching (about 14 days for controls). For each compound, between 3 and 6 clutches were exposed (Table III.2.1). Twenty days after the beginning of exposure (to be sure not to omit late hatchlings), the mean hatching success for each concentration was calculated. Results were considered valid if the hatching success of controls was higher than or equal to 70% (average value observed in our laboratory rearing for controls).

As the range of pH values for the different solutions was high (Table III.2.1), the sensitivity of egg development to the pH of the medium was assessed using a range of seven pH values (1, 2, 4, 6, 8, 10, and 12) with 6 replicates each, in demineralised water adjusted with HCl or NaOH.

III.2.1.2.4 Sample preparation for Cd analyses

Two clutches were divided into two parts each; the first parts of each clutch (46 eggs, 261.2 mg dry mass, DM and 57 eggs; 301.9 mg of DM) were used as controls and the second

parts (50 eggs, 269.3 mg of DM and 62 eggs, 334.9 mg of DM) were exposed to 4 and 8 mg Cd l^{-1}, respectively, for 7 days. After, the eggs were washed with water and the eggshell separated from the albumen. After drying in an oven (60°C), samples of eggshell or albumen were digested in 50% HNO_3 (2.5 ml for about 100-150 mg of DM) for 40h at 60°C. Then 7 ml ultrapure water was added and Cd concentrations were determined using a furnace atomic absorption spectrophotometer (220Z, Varian, Les Ulis, France). The reliability of the analysis was assessed with standard reference material (TORT-2, lobster hepatopancreas, from NRCC-CNRL, Canada).

III.2.1.2.5 Embryo observation

The main steps of embryogenesis were described in unexposed embryos according to Fol's typology (Fol 1879-1880). As the eggs are opaque, the eggshell must be removed to see the embryo, which is enclosed in transparent albumen. Embryos were observed with an inverted microscope (Nikon Eclipse TE300) or a binocular microscope equipped with a camera (Nikon Digital Camera DXM1200). After exposure to the various chemicals studied, non-hatched eggs were examined in the same way to determine the stage at which their embryonic development was interrupted.

III.2.1.2.6 Statistical analyses

The null hypothesis of independence between exposure and hatching success was tested using the Kruskal-Wallis rank test. When the null hypothesis was rejected, multiple comparisons were performed on ranks using Tukey's Honestly Significant Difference test. All statistics were performed with R (2.9.2) (R Development Core Team, 2004).

The dose-dependent curves and the EC50 values were determined with Hill's model using the macro Excel Regtox free version EV6.1.

Mixture toxicity data were analysed with the CA (Concentration Addition) model which is commonly used to predict the toxicity of a mixture and is the most pessimistic for risk assessment (Syberg *et al.* 2008; Adam *et al.* 2009). Following Loewe's CA theory (Loewe et Muischnek 1926), the curve of the predicted mixture effect (Faust *et al.* 2001) (given by Equation 5) of Reglone® and Agral® was built and compared to the curve of the observed mixture effect.

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

where ECx_{mix} is the predicted effect for the mixture for a given concentration, P_i, the proportion of component *i* in the mixture and ECx_i, the calculated concentration effect of individual component *i* (for Agral®, results of the test 1+2+3 were used, see Table III.2.2). To calculate the relative contribution (RC) of each compound in the mixture (Adam *et al.* 2009), toxic units (TUs), defined as the quotient C_i/ECx_i, where C_i is the concentration of component *i* in the mixture, were used. For instance for the effect of a 50% mixture:

$RC_{Reglone} = (TU50_{Reglone} / (TU50_{Reglone} + TU50_{Agral})) \times 100$ (6)

$RC_{Agral} = (TU50_{Agral} / (TU50_{Reglone} + TU50_{Agral})) \times 100.$

III.2.1.3 Results

III.2.1.3.1 Hatching success

The influence of pH on hatching success was not significant except for the extreme values, 1 and 12, for which the percentage of hatching was 0% (Figure III.2.2), with the eggs becoming reddish brown. As pH values of tested solutions were in the range 2.3 to 6.9 (Table III.2.1), it is likely that the effects observed on eggs are more due to the chemicals than to low pH.

The toxicity of chemicals decreased in the following order: Reglone® (most toxic) > Cd > Roundup® > Agral® > glyphosate (Table III.2.2 and Figure III.2.3). Hatching was completely inhibited by Cd from 8 mg l^{-1} (Figure III.2.3a). Roundup®, at the same concentration as glyphosate, was almost 100-fold more toxic than glyphosate alone (Table III.2.2). Indeed, Figure III.2.3b shows that, from 225 mg glyphosate l^{-1} in Roundup®, hatching success was totally inhibited whereas, for glyphosate alone at the same concentration, hatching success was equivalent to that of the controls.

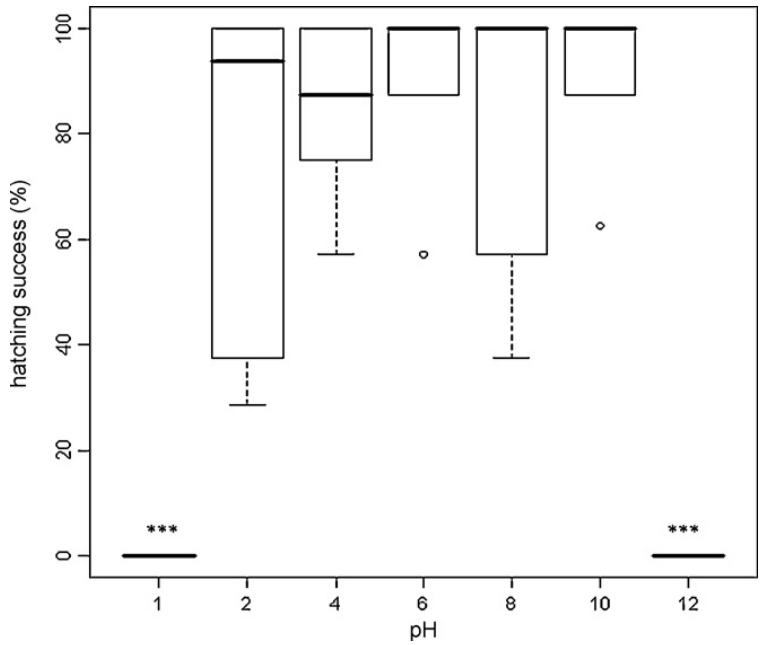


Figure III.2.2. Hatching success of snail eggs exposed to increasing pH. Significant differences ($p < 0.001$) are indicated by ***.

Table III.2.2. Toxicity (EC10 and EC50) of the different contaminants on the hatching success of snail embryos and recommended concentrations for agricultural use.

Contaminant	Test	NOEC	EC10 (CI 95%)	EC50 (CI 95%)	Agricultural recommended concentrations in sprayer
Glyphosate (mg l^{-1})	test 1	1800	1262 (830-1822)	1840 (1210-2140)	3600
	test 2	1400	732 (438-1387)	1190 (910-1530)	
	test 3	1800	1451 (912-1500)	1580 (1020-1640)	
	test 1+2+3[a]	1000	854 (685-1348)	1324 (1087-1574)	
Roundup® (mg l^{-1} of glyphosate)	test 1	45	1 (0.02-31)	18 (2.8-66)	3600
Reglone® alone (mg l^{-1} of diquat)	test 1	0.375	0.51 (0.30-0.68)	0.72 (0.60-0.79)	2000
Agral® alone (mg l^{-1} of NPEOs)	test 1	50	55.7 (31.9-84)	85.6 (68.1-97.3)	945
	test 2	54.7	22.3 (11.3-52.6)	46.45 (33.53-68.57)	
	test 3	200	23.3 (8.4-37.9)	26.34 (17.80-39.22)	
	test 1+2+3[a]	54.7	22.2 (12.4-43.5)	47.63 (36.34-59.52)	
Mixture (mg l^{-1} of diquat)	test 1	1.5	0.93 (0.62-1.38)	1.31 (1.10-1.51)	2000
Cd (mg l^{-1})	test 1	2	2.62 (1.90-3.72)	3.94 (3.43-4.38)	

[a] Tests 1+2+3 were run with increasing exposure concentrations of each test and all replicates summed.

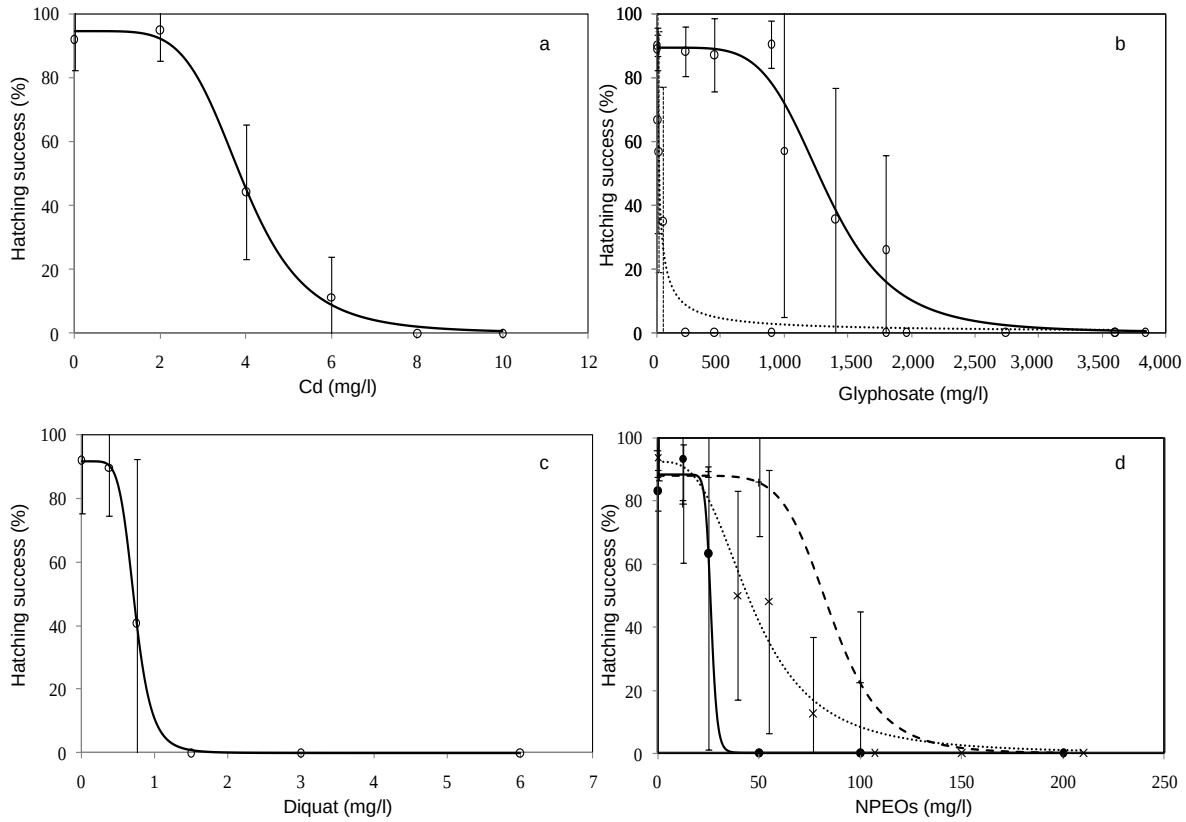


Figure III.2.3. Concentration–response curves obtained by Hill's model after 14 days of exposure of *Helix aspersa* eggs to (a) Cd, (b) glyphosate (test 1+2+3, solid line) and Roundup® (dotted line), (c) Reglone®, and (d) Agral® (test 1: dashed line; test 2: dotted line and test 3: solid line). Plots represent the mean (with 95% confidence interval).

Reglone® was about 100-fold more toxic than Agral® with a noteworthy variability between the three tests of Agral® (Table III.2.2 and Figure III.2.3d). Figure III.2.4 compares the calculated and predicted toxicity of the mixture Reglone® - Agral® determined at concentrations recommended for agricultural use. A significant difference between the two curves (no overlapping of 95% confidence interval for the respective EC50 values) indicates an antagonistic interaction between the two products with a higher contribution of Reglone® (99.45%) in the mixture.

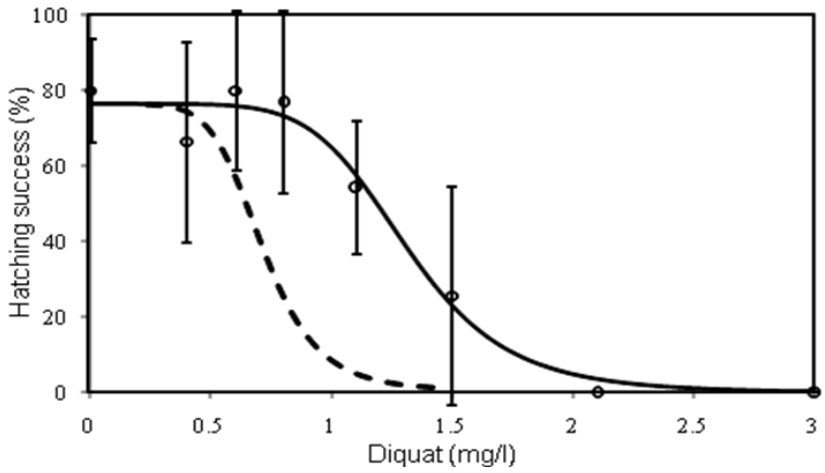


Figure III.2.4. Concentration-response curve obtained by Hill's model after 14 days of exposure of *Helix aspersa* eggs to mixture Reglone®-Agral® (solid line) compared with the predicted concentration-response of the mixture determined by the CA model (dashed line). Concentration is estimated in diquat. Plots represent the mean (with 95% confidence interval).

III.2.1.3.2 Transfer of Cd

Table III.2.3 presents the transfer of Cd from exposure medium to eggs which increased with the Cd concentrations. Albumen contained more Cd than eggshell in terms of dry mass for the two concentrations of exposure, showing Cd was able to cross the eggshell.

Table III.2.3. Transfer of Cd from exposure media to eggshell and albumen.

Nominal exposure concentrations (mg Cd l^{-1})	Measured exposure concentrations (mg Cd l^{-1})	[eggshell (µg g^{-1})]		[albumen (µg g^{-1})]	
		Fresh Mass	Dry Mass	Fresh Mass	Dry Mass
0	-	0.006	0.020	0.001	0.008
4	3.9	2.52	7.5	2.66	22.1
8	8.2	6.79	29.1	5.97	39.6

III.2.1.3.3 Normal and disrupted embryogenesis

The main stages of embryogenesis are shown in Figure III.2.5. Embryos exposed to glyphosate were blocked late in their development, in a larval stage corresponding to 12 day's development in controls (Figure III.2.5F). Embryos exposed to Reglone® at 0.75 and 1.5 mg diquat l^{-1} were blocked either at the morula stage or at a larval stage (Figure III.2.6A): the eyes were present but not the tentacles. When embryos were exposed to higher concentrations, they were blocked earlier in their development, corresponding to a one-cell

stage or morula in controls (Figures III.2.5A and III.2.5C). All non-hatched embryos exposed to Agral® stopped developing at early stages of embryogenesis corresponding to 3-4 days after fertilization for controls (Figures III.2.5C and III.2.5D). The development of embryos exposed to Cd was stopped at different stages depending on the concentration of exposure. We also observed variations for eggs exposed to the same concentration. For instance, at 4 mg Cd l^{-1}, some embryos were blocked at the gastrula stage (Figure III.2.6B) whereas others continued their development until metamorphosis (Figure III.2.6C). These embryos were still alive, but did not hatch at the end of the metamorphosis period; their eggshell remained white and thick instead of becoming thin and transparent to allow the snail to hatch. Malformations were observed, e.g. at 6 mg Cd l^{-1} (Figure III.2.6D): the cephalic region was not individualized and the eye-spots were not visible. An abnormal vesicle was visible and the pedal sinus was still present due to a late invagination whereas, for controls at 12 days, it was strongly reduced (Figure III.2.5F). At 8 and 10 mg Cd l^{-1}, stages ranged from one cell to larvae but they were small and malformed and never hatched.

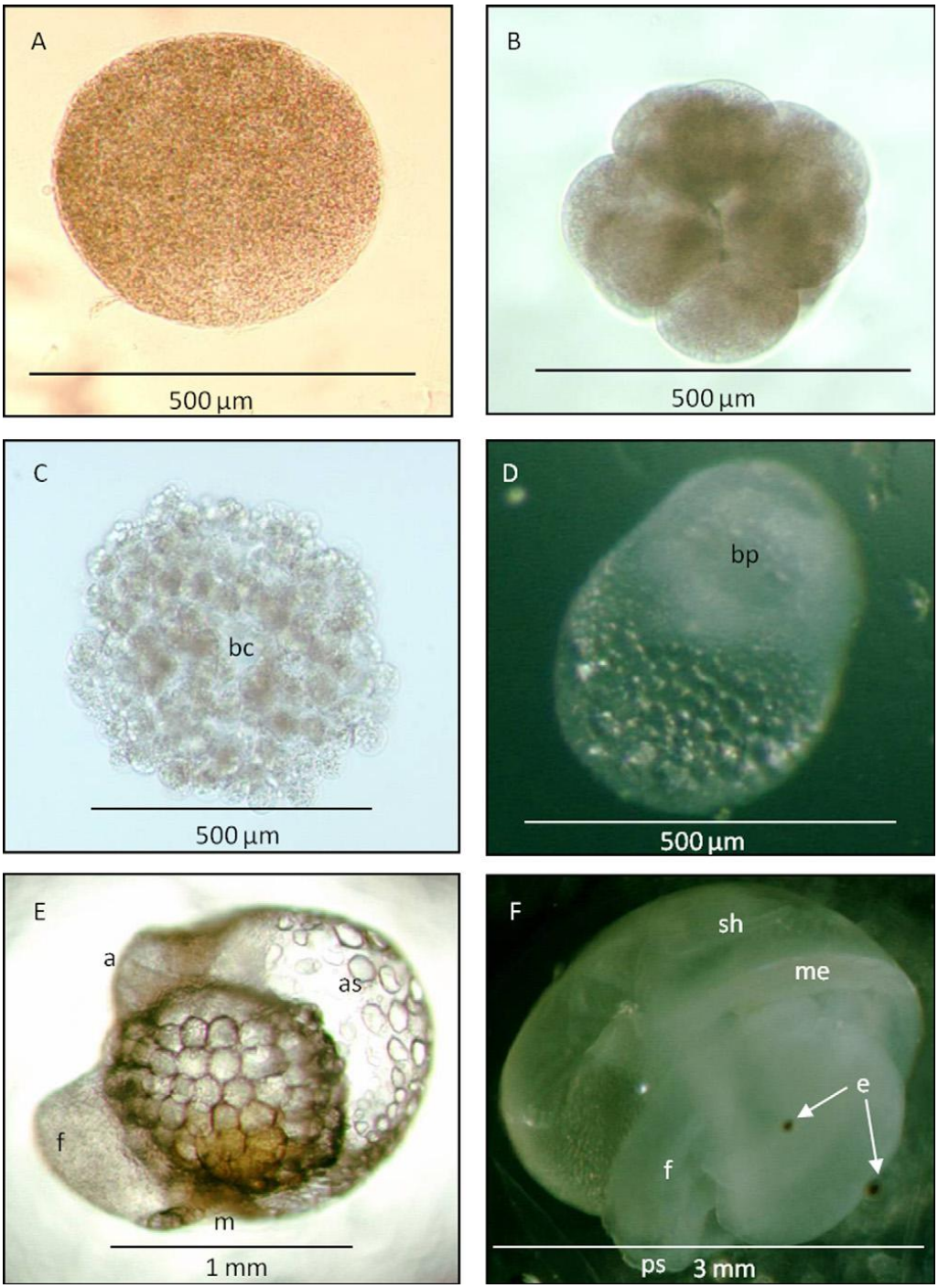


Figure III.2.5. Embryos of non-exposed *Helix aspersa* eggs at the one-cell stage (A, 0–3 h after fertilization), 8 cells (B, 8–12 h after fertilization), morula (C, 2–3 days after fertilization), gastrula (D, 4 days after fertilization) and larvae (E, 7 days and F, 12 days after fertilization).

Legend: a: anus; as: anterior sac; bc: blastocoel; bp: blastopore; e: eye-spot of the anterior tentacles; f: foot; m: mouth; me: mantle edge; ps: pedal sinus; sh: shell.

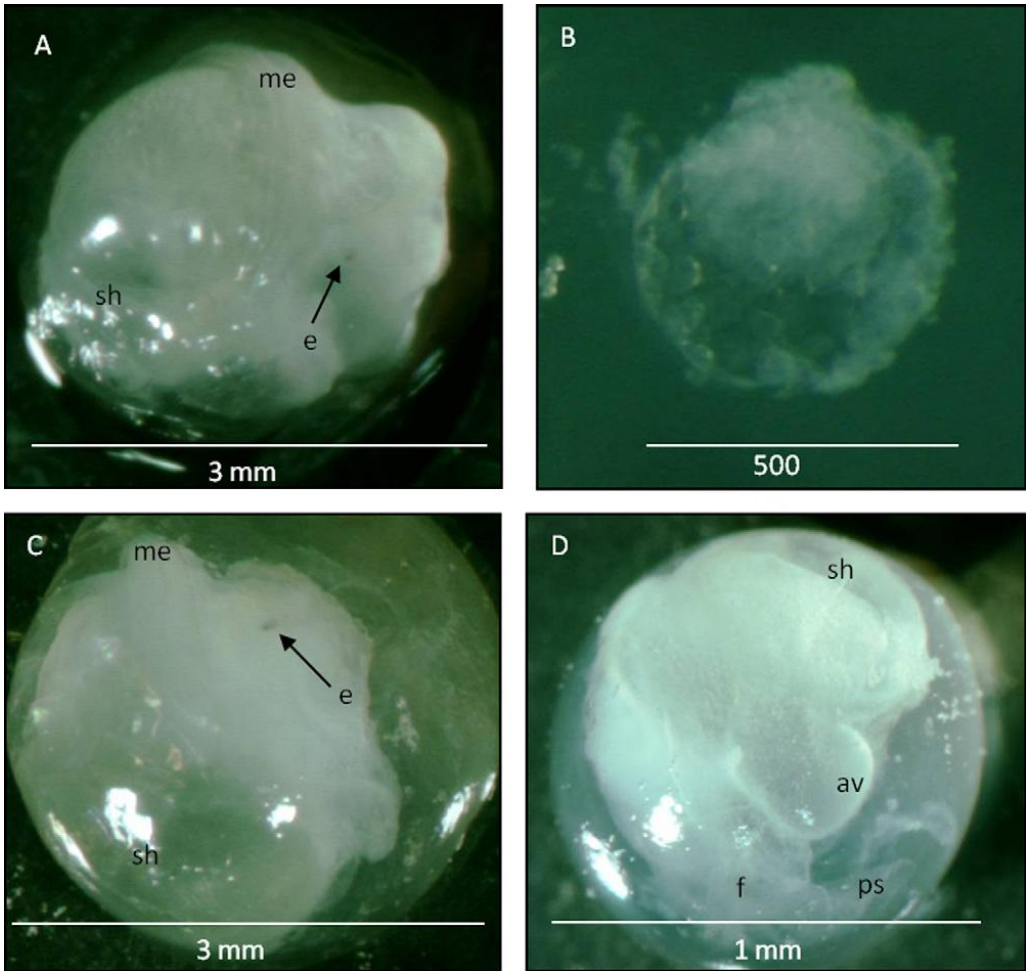


Figure III.2.6. Non-hatched embryos of eggs after 14 days exposure to Reglone® (A, 1.5 mg a.i. l^{-1}) and Cd (B and C, 4 mg l^{-1}; D, 6 mg l^{-1}).

Legend: av: abnormal vesicle; e: eye-spot; f: foot; me: mantle edge; ps: pedal sinus; sh: shell.

III.2.1.4 Discussion

III.2.1.4.1 Herbicide and mixture toxicity

Diquat and glyphosate and their formulations or their associated adjuvants were toxic to snail embryos at lower concentrations than the recommended application concentrations for agriculture.

In comparison with aquatic organisms, which are exposed by complete immersion in contaminated solutions, snail embryos are relatively sensitive. For instance, $LC50_{a.i.}$ values for frog embryos (Perkins *et al.* 2000) or juvenile silver catfish (Kreutz *et al.* 2008) were respectively 9.3 mg l^{-1} and 7.3 mg l^{-1} Roundup® whereas in this study, the $EC50_{a.i.}$ was 18 mg l^{-1}. For the Reglone®, diquat disturbed the growth of *Lymnaea stagnalis* (Coutellec *et al.* 2008) (from 0.22 mg l^{-1}) whereas we found an EC50-hatchability of *H. aspersa* of 0.72 mg l^{-1}.

Glyphosate has also been shown to be toxic to animals, e.g. by causing oxidative stress and increasing the activity of an antioxidant enzyme, superoxide dismutase, as demonstrated in the aquatic worm, *Lumbricus variegatus* (Contardo-Jara *et al.* 2009) and it has been proved that Roundup® can affect acetylcholinesterase activity in fish (Modesto et Martinez 2010; Salbego *et al.* 2010).

At equal concentrations of glyphosate, Roundup® was more toxic than glyphosate alone. Two mechanisms could be evoked: a higher toxicity of glyphosate in the Roundup® due to potentialisation of its effects by adjuvants and/or the toxicity of the adjuvants. A study on an aquatic oligochaete showed that it accumulated more glyphosate when it was exposed to Roundup® Ultra than to glyphosate alone (Contardo-Jara *et al.* 2009). The authors hypothesized that the surfactant polyoxyethylene amine (POEA, also called MON 818 (Folmar *et al.* 1979; Bringolf *et al.* 2007) contained in Roundup®, improved the transfer of glyphosate, by interacting with the plasma membrane. Another hypothesis is that the POEA is in fact the compound mainly responsible for the toxicity of Roundup® (Mann et Bidwell 1999; Sparling *et al.* 2006) and could even be more toxic than the Roundup® itself (Folmar *et al.* 1979; Perkins *et al.* 2000; Marc *et al.* 2005; Bringolf *et al.* 2007). Tsui and Chu (2003) also determined that POEA accounted for more than 86% of Roundup® toxicity for bacteria, protozoa and crustaceans. So, in contrast with a study which reported no difference of toxicity between glyphosate and Roundup® on several stages of a nematomorph worm (Achiorno *et al.* 2008), the present data confirm, on snail embryos, the higher toxicity of Roundup® compared to its a.i.

The results for the mixture Reglone® / Agral®, revealed an antagonistic effect between the two products on the embryonic development of the snail with a major contribution of Reglone® (99.45%). This is in agreement with Coutellec *et al.* (2008) who found that Reglone® had an effect on the embryogenesis of *L. stagnalis* but this effect was decreased in the mixture Reglone® - Agral®, suggesting an antagonistic interaction.

Whatever the mixture considered (Roundup® with its integrated adjuvant or Reglone® with a recommended adjuvant such as Agral®), it appears necessary to assess the risk of the final product (which will be applied to crops) and not only of the active ingredient individually. More data on the ecotoxicity are also needed for adjuvant, for which ecotoxicological information is scarce or absent from databases.

III.2.1.4.2 Effect of Cd and transfer to eggs

Our study showed that Cd was toxic to terrestrial snail eggs. Toxicity is lower than for aquatic snails: for example no hatching were observed at 0.02 mg l^{-1} for *Stagnicola elodes* (Pietrock *et al.* 2008), 0.1 mg l^{-1} for *Biomphalaria glabrata* (Ansaldo *et al.* 2009) and 0.4 mg l^{-1} for *Lymnaea stagnalis* (Gomot 1998b) versus 8 mg l^{-1} for *Helix aspersa*, but is higher than for zebrafish embryos where the 48h-LC50 is 30.1 mg l^{-1} (Hallare *et al.* 2005b) versus 3.94 mg l^{-1} for *Helix aspersa*. After 7 days of exposure at the concentration that caused 50% embryo mortality, Cd in the albumen reached 2.66 µg g^{-1} fresh mass. Brasfield *et al.* (2004) also showed strong uptake of Cd by lizard embryos. Our results indicate that uptake increased with exposure concentrations, as also observed for zebrafish eggs by Burnison *et al.* (2006). Dry mass concentrations were higher in the albumen than in the eggshell whereas, for zebrafish eggs, concentrations were higher in the chorion (Burnison *et al.* 2006), that is the external membrane of eggs. This difference of permeability and adsorption capacities of these external membranes (eggshell and chorion) may be the result of different composition and structure between snail and zebrafish and also of the exposure route to contaminants in their environment.

III.2.1.4.3 Disruption of embryogenesis

The effects of Agral may be attributed to nonylphenol (NP) which is its main component (according to its Material Security Data Sheet). NP was plainly recognized as an endocrine disrupter and particularly for estrogenic effects (Soares *et al.* 2008). Several studies found that NP has an effect on embryogenesis of aquatic organisms, like the microcrustacean *Daphnia magna*, where development of embryos stopped at a high exposure concentration (EC50 = 738 µg l^{-1}) (Zhang *et al.* 2003). Concerning studies on aquatic snails, Oliveira-Filho *et al.* (2005) found a LC50 for *Biomphalaria tenagophila* embryos between 29.25 and 640.25 mg l^{-1} following exposure duration and Lalah *et al.* (2007) showed that the branched NP isomer (4(3',6'-dimethyl-3'-heptyl)-phenol at an average concentration of 0.105 mg l^{-1}) slowed the embryonic growth and reduce hatching success of *L. Stagnalis;* Both authors suspected that this low observed effect on embryos is probably due to a reduced penetration of NP in the lengthwise encapsulating jelly strand that surrounds the eggs (Oliveira-Filho *et al.* 2005; Lalah *et al.* 2007). NP also induces concentration-dependent malformations of sea urchin

embryos (Arslan *et al.* 2007) and these authors find, as we do, that embryos are blocked at early stage.

Effects of glyphosate appeared later in the embryonic development just before hatching. Disturbance of hatching in relation with a hatching enzyme has been evidenced in urchin embryos (Marc *et al.* 2005): Roundup® inhibited the global transcription of DNA after fertilization at the 16-cell stage, including transcription of the hatching enzyme which is normally secreted at blastula stage and allows the embryo to hatch by digesting its fertilization envelope.

The time of appearance of the effects of diquat on embryos is concentration-dependent. Indeed, the higher the concentration, the earlier the development of the embryo is blocked.

Cd effect also is concentration-dependent. Several authors demonstrated a similar effect for aquatic mollusc embryos (Gomot 1998; Pietrock *et al.* 2008). But we also observed that the stage of blocking also varied for a given concentration. Other authors have shown that the effect of Cd is "stage-dependent", suggesting that the earlier the embryos are exposed, the greater the effect (Marc *et al.* 2005; Pennati *et al.* 2006). As embryos of a single clutch were not at exactly the same stage when the exposure to a chemical started (due to the duration of egg-laying which varied from 24 to 32h), this could explain the variations in the effects of exposure to a given concentration.

Cd can interact with calcium (Ca) by competition for uptake sites (Craig *et al.* 1999). Ca is forwarded from adults to eggs in the eggshell and is then used to build the shell of the juvenile snails (Beeby et Richmond 1998). Thus, due to possible competition with Cd, Ca metabolism in the embryos could be affected, making the eggshell remain thick, preventing the snail from hatching.

III.2.1.4.4 Utility and limits of an embryotoxicity bioassay with snail eggs

The bioassay we presented here to study the embryotoxicity of various chemicals on snail eggs proved to be relevant for some pesticides and a metal, and is easy to perform with simple and cost effective equipment. The biological material can easily be obtained, and, as one clutch contains from 70 to 150 eggs, the quantities available for testing do not constitute a restraint.

One limitation of this test, which also exists with most bioassays, involves the toxicity parameters themselves. NOEC and EC50 values are determined using different statistical methods, which explain that, for several of our tests, NOEC was higher than EC50. The

concept of NOEC has often been criticized because the value depends strongly on the dataset and the concentrations chosen (Crane et Newman 2000; Baas *et al.* 2009). However, as this parameter still serves as a reference for risk assessment, we chose to use both NOEC and EC50 values. This limitation also depends on the variability of the response, which could be high (e.g. for NPEO, Figure III.2.3d), due to the stage of development of the eggs at the beginning of exposure, as discussed previously for Cd (see III.2.1.4.3).

Embryotoxicity bioassays proved the advantage of this early stage of the life cycle, as shown with urchins (Bellas *et al.* 2005) or oyster embryos (Geffard *et al.* 2002). Indeed, it is generally recognised that early stages of fish, and notably zebrafish, offer practicable and highly sensitive bioassays (Strmac *et al.* 2002; Braunbeck *et al.* 2005; Hallare *et al.* 2005a). Only a study on a freshwater snail (*Biomphalaria tenagophila*) found that embryos are less sensitive than juveniles or adults (Oliveira-Filho *et al.* 2005). However, all these examples concern the aquatic environment because terrestrial bioassays with soil invertebrates are rare: we found only one experiment on a pest slug, reporting the high sensitivity of the embryos to metal salts (Iglesias *et al.* 2000). Methods on this part of the life cycle would complete existing bioassays for the assessment of chemicals on snail survival, growth and reproduction (de Vaufleury *et al.* 2006; Gimbert *et al.* 2008; ISO 15952:2006) and, more generally, terrestrial bioassays used for risk assessment, such as tests on nematodes (ISO 10872:2010), earthworms (ISO 11268-2:1998), honeybee larvae (Aupinel *et al.* 2005; Aupinel *et al.* 2007) or birds (EC 1991).

Until they become free-feeding larvae, embryos are considered like *in vitro* systems (Weisbrod *et al.* 2008).Thus, a land snail embryotoxicity bioassay could be considered as an *in vitro* test which therefore responds to current expectations, notably to alternative testing methods (EC 2006). The present results and methodology enlarge the relatively restricted panel of available tests for assessing the embryotoxicity of chemicals towards terrestrial invertebrates.

Acknowledgements

This work was financially supported by grants from the ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie) and the Conseil Régional de Franche-Comté. We thank Nadia Crini for her technical assistance and Michael Coeurdassier for critical comments on the manuscript.

III.2.2 Liquid, solid and volatile phase bioassays using land snail's eggs for soil risk assessment

Cette partie a fait l'objet d'une publication soumise à *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Les auteurs sont Coline Druart, Renaud Scheifler, Maurice Millet et Annette de Vaufleury.

Résumé

Ce travail présente un bioessai décliné en 3 modalités (phase liquide ou solide ou gazeuse, LPB, SPB et VPB, respectivement) permettant l'évaluation de l'embryotoxicité de substances chimiques ou de matrices pluri-contaminées sur les œufs d'un escargot terrestre. Les 8 pesticides (à base des substances actives suivantes : cuivre, soufre, métirame-Zn + pyraclostrobine, folpel + cymoxanil + fosétyl-Al, tébuconazole, glyphosate et glufosinate) testés en LPB affectent le succès d'éclosion des œufs à des concentrations inférieures à celles appliquées au champ. Le SPB a été testé en couvrant les œufs avec du sol ou non. Il a été démontré que couvrir les œufs avait un impact négatif sur le succès d'éclosion et en conséquence, le mode d'exposition « œufs non couverts » a été choisi pour la suite des essais. L'humidité du sol (comprise entre 40% et 60% de la capacité au champ) dans 2 sols naturels non contaminés (F et C) et dans 4 sols naturels contaminés par des métaux (D, M, H et N), n'influence pas le succès d'éclosion. Le succès d'éclosion ne variant pas dans 3 sols naturels non contaminés (F, B et C), cela suggère que les œufs sont relativement peu sensibles aux propriétés physico-chimiques du sol. Parmi les 2 pesticides testés en SPB, le Corail® (fongicide à base de tébuconazole) est plus toxique que le Bypass® (herbicide à base de glyphosate) pour les embryons dans un sol naturel (B), comme le démontre leur valeur respective de EC50 de 1 et 219 mg kg^{-1}. Ces deux pesticides sont moins toxiques lorsqu'ils sont contenus dans un substrat artificiel (EC50 de 7,8 et supérieure à 400 mg kg^{-1}, respectivement pour le Corail® et le Bypass®), soulignant ainsi l'influence du pourcentage de matière organique (plus faible dans le sol B) sur la biodisponibilité et donc la toxicité des substances pour les œufs d'escargots. Le LPB montre que les composés solubles contenus dans le sol le plus toxique testé en SPB (M), n'affectent pas l'embryon. De la même façon, le VPB ne révèle pas de substances toxiques volatiles dans ce même sol.

Mots-clés : *Helix aspersa*, embryotoxicité, environnement terrestre, pesticides, métaux.

Abstract

This work presents a bioassay with 3 modes (liquid, solid or volatile phase, LPB, SPB and VPB, respectively) allowing the assessment of the embryotoxicity of chemicals or pluri-contaminated matrices on land snail eggs. The 8 pesticides (based on 10 active ingredients: copper, sulfur, metiram-zinc + pyraclostrobin, cymoxanil + folpet + fosetyl-Aluminium, tebuconazole, glyphosate, glufosinate) tested by LPB affected egg hatching success at concentrations lower than those applied in the field. SPB was tested covering the eggs with soil or not. Covering eggs was demonstrated to have a significant negative impact on hatching success. SPB without covering eggs (i.e. with eggs deposited on soil surface) was consequently retained. The moisture (from 40 to 60% of the water holding capacity) in 2 natural non-contaminated soils (F and C) and in 4 metal-contaminated soils (D, M, H, and N) did not influence the hatching success. Hatching success did not vary in 3 non-contaminated soils (F, B and C) in SPB suggesting the relative insensitivity of eggs to some soil properties. Among the 2 pesticides tested in SPB, Corail® (tebuconazole based-fungicide) was more toxic than Bypass® (glyphosate based-herbicide) to snail embryos with EC50 values of 1 and 219 mg kg^{-1} respectively in a natural soil (B). Both pesticides were less toxic when tested in the artificial ISO substrate (EC50 of 7.8 and higher than 400 mg kg^{-1}, respectively for Corail® and Bypass®), highlighting the influence of the organic matter content (lower in soil B) on the bioavailability and thus the toxicity of the chemicals. LPB showed that soluble compounds of the most toxic soil in SPB (M) did not affect embryos. Similarly, VPB did not reveal toxic volatile compounds from this soil.

Keywords: *Helix aspersa*, embryotoxicity, terrestrial environment, pesticides, metals.

III.2.2.1 Introduction

Recent European Community guidance on chemical risk assessment requests new bioassays that should be sensitive, easy to perform and an alternative to vertebrate animal testing (EC 2006). Embryotoxicity tests with oviparous organisms are compatible with these criteria because they are sensitive (Hallare *et al.* 2005a; Sawasdee et Köhler 2009) and considered as *in vitro* systems (Weisbrod *et al.* 2008). Most of the bioassays currently available to assess the effects of chemicals on embryogenesis and hatching success use aquatic organisms (Gomot 1998; Geffard *et al.* 2002; Hallare *et al.* 2005b; Pennati *et al.* 2006; Arslan *et al.* 2007). As stated in the Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment (ECHA 2008), and despite the fact that soil is often the first receptor of numerous contaminants, embryotoxicity data on terrestrial organisms are scarce. Several authors have begun to develop embryotoxicity tests based on the incubation of eggs of vertebrate species in soil, e.g. lizard (Brasfield *et al.* 2004) or turtle (Sparling *et al.* 2006), and assessing embryo mortality, size of hatchlings or hatching success. A bioassay with bees (Aupinel *et al.* 2007) is classically used for pesticide risk assessment, but does not directly concern soil contaminants. Some other methods have also been developed to determine effects of contaminants on reproduction (egg laying and hatching success) of soil invertebrates (ISO 10872:2010; ISO 11268-2:1998). However, no standardized terrestrial bioassay exists to really assess the embryotoxicity of pollutants for soil invertebrates, and only few experiments with metals or organic compounds have been performed on slugs (Iglesias *et al.* 2000; Iglesias *et al.* 2002) or snails (Druart *et al.* 2010; Shoaib *et al.* 2010). Although snails are not considered in the guidelines for the implementation of REACH as a major group of soil organisms to be considered in risk assessment (ECHA 2008), they do belong to various terrestrial food webs (Eeva *et al.* 2010) and contribute to nutrient cycling in soil (Dallinger *et al.* 2001). Snails colonize many habitats, e.g. vineyards (Snyman *et al.* 2005) or forest borders (Kerney *et al.* 2006), where they lay eggs at 2- to 3-cm depth in soil, 1 to 3 times a year during spring and summer. Land snails are also used in ecotoxicology as bioindicators of pollution and for soil quality assessment (de Vaufleury *et al.* 2006) but few data are available on the effects of soil contamination on their embryogenesis. However, snail eggs are suitable for this type of experimentation and can be obtained all year round in the lab. Snail eggs are in contact with the contaminants fractions dissolved in leachates, sorbed to soil particles and in the gaseous phase of the soil. Thus, the aim of this study is to develop

relevant bioassays (i.e. liquid, solid and volatile phase bioassays: LPB, SPB, VPB) to assess and compare the effects of contaminants on snail embryos by these 3 routes of exposure.

In the present work, the LPB was performed with 8 commercial formulations of pesticides (5 fungicides and 3 herbicides) commonly used in vineyard and a leachate of a metal-contaminated soil. In order to document the main parameters that can influence the results obtained with the SPB bioassay, the effects of various soils (natural or artificial, contaminated by metals or not) with different characteristics (pH, organic matter, size of particles, moisture) were studied on the hatching success. Influence of exposure modes (eggs covered by soil or not) was also assessed. In order to determine the influence of the dilution matrix on the bioavaibility and thus, toxicity of contaminants, 2 experiments were performed with two matrices (a natural soil and an artificial ISO substrate): in the first one, 2 of the 8 pesticide formulations were assessed in SPB using both matrices. In the second one, the toxicity of a metal-contaminated soil was assessed using both matrices. Finally, a new configuration (VPB) was experimented to test the toxicity of volatile substances that could be emitted by the soils.

III.2.2.2 Materials and methods

III.2.2.2.1 Chemicals

The data concerning the commercial formulations of pesticides are listed in Table III.2.4. Pesticide solutions were prepared with demineralized water.

III.2.2.2.2 Soil preparation

An artificial substrate was prepared according to ISO procedure (ISO 11268-1:1993). The 7 other soils studied were natural soils. Their characteristics are listed in Table III.2.5. Three soils were collected in ploughed vineyards (B: soil from Bergbieten, France) or maize fields (C: soil from Chambornay, France and F: soil from Foulum, Danemark). Four soils (D, M, H and N) were sampled in the surroundings of the former smelter of Metaleurop Nord and are contaminated by metals (Table III.2.5). All soils were dried and sieved to 4 mm.

Table III.2.4. Characteristics of commercial formulations of pesticides.

Formulation	Nature	Company	Active ingredients	Dosage per hectare
Bordeaux Mixture RSR Disperss (powder)	Fungicide	Cerexagri	Copper (20%)	5.35 kg
Thiovit® Jet micro billes (powder)	Fungicide	Syngenta Agro	Sulfur (80%)	5.35kg
Cabrio® Top (powder)	Fungicide	BASF Agro	Metiram-Zinc (55%) Pyraclostrobin (5%)	1.78 kg
Valiant® Flash (powder)	Fungicide	Bayer Cropsciences	Cymoxanil (4%) Folpet (25%) Fosetyl-Aluminium (50%)	1.8 kg
Corail® (solution)	Fungicide	Bayer Cropsciences	Tebuconazole (250 g l^{-1})	0.24 l
Roundup® Flash (solution)	Herbicide	Monsanto	Glyphosate (450 g l^{-1})	4 l
Bypass® (solution)	Herbicide	Dow Agrosciences	Glyphosate (360 g l^{-1})	6 l
Basta® F1 (solution)	Herbicide	Avantis Cropsciences	Glufosinate Ammonium (150 g l^{-1})	5 l

Table III.2.5. Characteristics of the 8 soils used for testing with LPB, SPB and VPB.

Soil	pH	OMC[ac]	Sand[a]	Silt[a]	Clay[a]	[Cd][b]	[Pb][b]	WHC[bc]
ISO	6	10	69	0	20	ND[c]	ND	323
F	6.2	6.4	62.2	23.2	8.2	ND	ND	305
C	5.9	2	47.5	16.7	31.4	<0.4	31.2	301
B	8.4	2.9	25.4	39.5	35.1	ND	ND	434
D	7.3	11.8	36.5	51.4	12.1	23.1	1570	380
M	7.8	9	10.8	65.4	23.8	20.4	1895.8	505
H	5.5	14.5	25.9	48.4	25.7	22.4	2120	578
N	8.1	22.1	72.8	20.6	6.6	80.8	37100	288

[a]: Unit in %.

[b]: Unit in mg kg^{-1}.

[c]: OMC, organic matter content; ND, non-determined; WHC, water holding capacity.

III.2.2.2.3 Snail eggs

Eggs of *Helix aspersa aspersa* Müller (*syn. Cantareus aspersus aspersus* Müller, 1774) snails were obtained as described by Druart et al. (2010). The maximum time lapse between the end of laying and the beginning of the experiments was 6-8 h. For all tests, the conditions of the incubation room were 20 ± 2°C, 80% humidity and 18 h light per day. Each clutch was

divided by the number of concentrations to be tested: for instance, a clutch containing 100 eggs used in a test with 10 concentrations would use 10 eggs for the 10 concentrations. From X to Y clutches were used for the experiments, depending on the number of clutches available at the beginning of the experiments. Embryonic development lasts 14 days for LPB, SPB (when eggs are not covered by soil, see below) and VPB and 20 days for SPB when eggs are covered (see below), due to the time required for the hatchlings to come out from the soil. The measured endpoint is the hatching success (determined after about 20-25 days of incubation) and must reach 70% in the controls for the experiment to be considered valid.

III.2.2.2.4 Liquid phase bioassay (LPB)

The system is described in Druart et al. (2010). Briefly, 10 eggs from a single clutch were exposed in Petri dishes containing 4 layers of filter papers (Whatman grade 1; 32 mm diameter) dampened with 0.8 ml of demineralized water (for control) or tested solution (Figure III.2.7a). Eight pesticides were assessed in LPB to determine NOEC (no observed effect concentration), LOEC (lowest observed effect concentration), EC10 and EC50 (effective concentrations causing 10% or 50% effect in relation to controls). Two repetitions (test 1 and test 2) were performed for each formulation (Table III.2.6). The tests were usually performed with 5 replicates except for Corail® test 1 and Basta® test 1 (3 replicates), Bordeaux mixture, Bypass® test 1 and Valiant® Flash test 1 (4 replicates) and Roundup® test 1 (6 replicates).

In a first attempt to determine the nature of the toxic substances contained in soil M, which is one of the field-contaminated soils that was found to be toxic for embryos, water-soluble fractions were tested. In this aim, a leachate from soil M was prepared according to European standard EN14735 to dissolve the compounds present. After agitation of 100 g of soil in 1000 ml of demineralized water during 24 h, the sample was decanted for 24 h. The supernatant was centrifuged during 30 min at 2500g. The retrieved supernatant was filtered at 0.45 µm. In order to obtain more information about the composition of the leachate, the concentrations of 6 metals (Al, Cd, Cu, Zn, Ni and Cr) were determined using a furnace atomic absorption spectrophotometer (220Z, Varian, Les Ulis, France). The leachate was tested by the LPB in 5 replicates and demineralized water was used as control.

III.2.2.2.5 Solid phase bioassay (SPB)

For the uncovered mode of SPB (Figure III.2.7b), eggs were exposed in similar devices used by Kramarz et al.(2007): 15 eggs were deposited on the surface of the soil, contained in little glass pots (about 70-80 g of wet soil per 130-ml pot). For the covered mode (Figure III.2.7c), the eggs were buried under a layer of 2-3 cm of soil for incubation.

III.2.2.2.5.1 Effect of various parameters on hatching

First, 2 modes of exposure were tested: the “covered eggs” mode, which requires a longer time to see the newly hatched snails that need to get out of the soil, and the “non-covered eggs” mode. This experiment was performed with 3 replicates (with soils C, B, D, M, H and N) and 5 replicates (with soil F). The influence of moisture was studied with soils C, F, D, H, N and M. Two moisture levels (expressed as percentages of the respective WHC of the different soils, Table 2) were tested with 4 replicates for each moisture level: 40% and 50% for soils M, D and H, and 50% and 60% for the soils C, F and N. Very high or very low moistures were not tested because the test primarily concerns the study of soils with a normal moisture level (and not desiccated or saturated soils). Moreover, in desiccated or saturated soils, eggs swelled or shriveled up, leading to abnormal hatching success. For all other experiments, moisture levels corresponding to 50% of the WHC and “non-covered eggs” mode were used for each soil. Hatching success was compared between 3 ploughed uncontaminated soils with different characteristics (structure, pH or organic matter content, OMC), with 3 replicates (C and B) or 5 replicates (F) per test. The effect of 4 metal contaminated soils (D, M, H, and N) was studied with 3 replicates.

III.2.2.2.5.2 Effect of dilution matrix

Bypass® and Corail® were tested by SPB in ISO substrate (n = 5) and in soil B (n = 4 for Bypass® and 5 for Corail®), which exhibit contrasting pH and OMC values. For the tests, they were moistened to 50% of the WHC with demineralized water or pesticide solutions and kept frozen (-35°C) before being thawed and immediately used for the tests. The final nominal concentrations of the active ingredients (a.i.) were 300, 231, 178, 137, 105 and 81 mg kg^{-1} glyphosate for Bypass® and 12.0, 5.0, 2.1, 0.9 and 0.4 mg kg^{-1} tebuconazole for Corail®.

The soil M was tested by SPB, diluted (0, 2, 4 and 8 times) in ISO substrate (n = 3) or soil F (n = 2).

III.2.2.2.6 Volatile phase bioassay (VPB)

Twenty eggs were deposited on a nylon filter (180 µm NY8H; Millipore) hung above a glass pot filled with the soil or with nothing (for control). This system was then introduced into a plastic box where the humidity was kept high with damp blotting paper (Figure III.2.7d). As soil M was revealed to be toxic by the SPB, it was tested with the VPB to determine the presence of volatile toxic compounds. Two controls were added: a volatile system with soil F and a volatile system with an empty glass pot. Five replicates were done for each test.

III.2.2.2.7 Statistical analyses

Differences in hatching success between the 2 moisture levels and the 2 modes of exposure were assessed by the non-parametric Wilcoxon-rank test performed for each soil (Siegel et Castellan 1988). Differences in hatching success between soils (SPB), concentrations (LPB and SPB) and treatments (VPB) were tested using the non-parametric Kruskal-Wallis rank test. When significant differences were found, a multiple comparison was performed (Siegel et Castellan 1988). All statistical analyses were performed with the statistical free software R (2.9.2) (R Development Core Team, 2010) using the package *pgirmess* (http://perso.orange.fr/giraudoux). The significance level was chosen at p = 0.05. The EC10 and EC50 values were determined with Hill's model using the macro Excel® Regtox free version EV6.1. Toxicity parameters (EC10, EC50) were considered significantly different when their respective confidence intervals did not overlap.

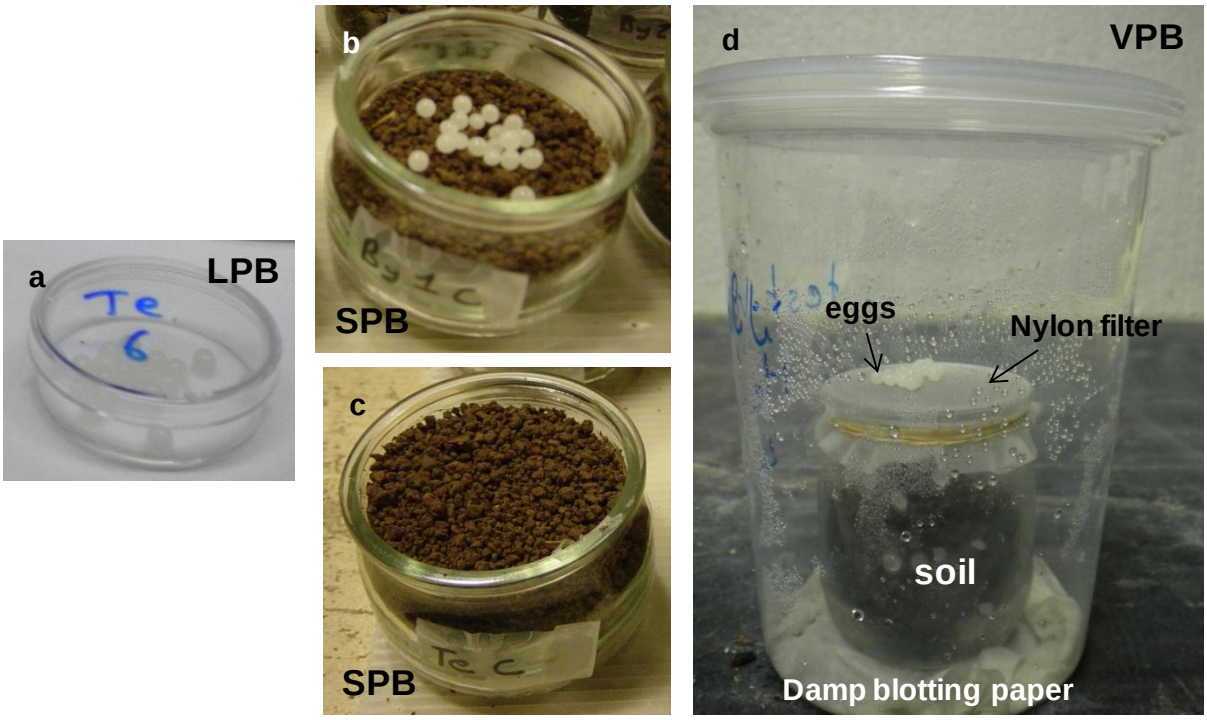


Figure III.2.7. Exposure devices used for the (a) LPB, (b) SPB in non-covered mode by soil, (c) SPB in covered mode by soil and (d) VPB.

III.2.2.3 Results

III.2.2.3.1 Liquid phase bioassay

Table III.2.6 presents the embryotoxicity results for the 8 commercial pesticide formulations. The average variation coefficient between the 2 tests was 20%. The average EC50 of the 2 tests (in g l^{-1} of a.i. for the formulation containing only one substance or in g l^{-1} of formulation) expressed as a percentage of the levels used for concentrations applied in the field was, in decreasing order, Corail® (0.01%) > Basta® (0.2%) = Valiant® Flash (0.2%) > Roundup® Flash (0.9%) > Bypass® (1.8%) > Cabrio® Top (6.6%) > Thiovit® (9.8%) > Bordeaux mixture (18.9%).

Table III.2.6. Ecotoxicity of commercial formulations of pesticides on the hatching success of *Helix aspersa* in the liquid phase bioassay.

Pesticide	Test	NOEC	LOEC	EC10 (CI 95%)[c]	EC50 (CI 95%)[c]	[Field application][d]
Bordeaux mixture (g l^{-1}) *(g l^{-1} of Cu)*[a]	1	2.5	10.0	6.97 (1.67-7.45) *1.39*	8.03 (2.76-8.59) *1.61*	38.2 *7.64*
	2	4.0	6.0	3.28 (1.72-5.38) *0.66*	6.43 (5.42-7.96) *1.29*	
Thiovit® (g l^{-1}) *(g l^{-1} of S)*[a]	1	0.63	2.50	2.07 (0.48-5.65) *1.66*	2.62 (1.26-6.08) *2.10*	38.2 *30.56*
	2	2.50	5.00	4.66 (2.56-4.73) *3.73*	4.83 (2.66-4.91) *3.86*	
Cabrio® Top (g l^{-1}) (*g l^{-1} of Metiram-Zn and Pyraclostrobine)*[a]	1	0.31	0.63	0.52 (0.46-0.59) *0.29 and 0.03*	0.73 (0.66-0.81) *0.40 and 0.04*	12.7 *6.99 and 0.64*
	2	0.40	0.80	0.76 (0.70-0.89) *0.42 and 0.04*	0.94 (0.86-1.01) *0.52 and 0.05*	
Valiant® Flash (mg l^{-1}) *(mg l^{-1} of Cymoxanil, Folpet and Fosetyl-Al)*[a]	1	20.0	40.0	38.2 (33.8-41.3) *1.5, 9.6 and 19.1*	43.8 (41.8-47.4) *1.8, 11.1 and 21.9*	21170 *846, 5292 and 10585*
	2	20.0	40.0	33.2 (21.6-44.8) *1.3, 8.3 and 16.6*	51.4 (40.9-62.5) *2.1, 12.9 and 25.7*	
Corail® (mg l^{-1})[b]	1	0.13	0.25	0.09 (0.08-0.11)	0.12 (0.10-0.13)	700
	2	0.03	0.06	0.04 (0.02-0.07)	0.07 (0.05-0.11)	
Roundup® Flash (mg l^{-1})[b]	1	20.0	40.0	31.2 (23.4-37.3)	43.1 (38.6-47.2)	5140
	2	44.4	66.7	47.3 (42.3-60.2)	55.3 (47.5-63.6)	
Bypass® (mg l^{-1})[b]	1	45.0	90.0	50.0 (20.0-84.2)	90.3 (61.2-117.9)	6170
	2	90.0	130.0	64.7 (18.6-122.7)	130.5 (85.8-183.3)	
Basta® (mg l^{-1})[b]	1	4.70	9.00	3.60 (3.34-4.34)	4.43 (4.01-4.78)	2140
	2	2.96	4.44	3.31 (2.62-4.17)	4.53 (4.14-4.86)	

[a] Values are given in concentration of complete formulation and of active ingredients in italic for EC10, EC50 and field application.

[b] Values are given in concentration of active ingredients of the product.

[c] CI, confidence intervals.

[d] Concentration in sprayer according to recommended use by e-phy (http://e-phy.agriculture.gouv.fr) on vineyard.

The leachate of soil M containing 964 µg l^{-1} of Al, 2 µg l^{-1} of Cd, 51 µg l^{-1} of Cu, 24 µg l^{-1} of Zn, 53 µg l^{-1} of Ni and 44 µg l^{-1} of Cr was not toxic: the hatching success was 77% (± 14%) for the control and 85% (± 13%) for the leachate (n = 5).

III.2.2.3.2 Solid phase bioassay

III.2.2.3.2.1 Influence of exposure mode and soil moisture on hatching success

Results showed a significant difference in hatching success between the 2 exposure modes (covered *versus* non-covered) for soil F (n = 5) (Figure III.2.8). Although no significant difference was found between the 2 exposure modes for N soil, probably due to the low number of replicates (n = 3) and the subsequent lack of statistical power, hatching success of covered eggs tended to be lower than that for non-covered eggs (Figure III.2.8). Consequently, the non-covered mode was chosen for the following tests. There was no difference between the 2 moisture levels tested for each soil (Table III.2.7).

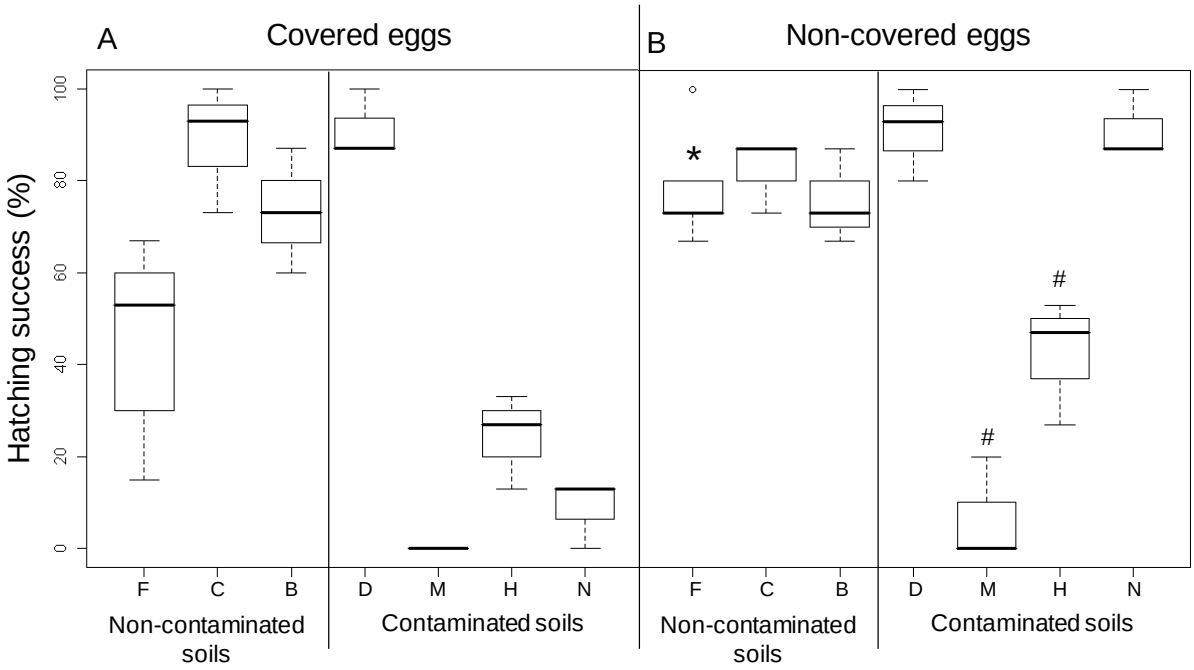


Figure III.2.8. Hatching success (%) of *Helix aspersa* for the (A) "covered eggs" or (B) "non-covered eggs" for 3 uncontaminated ploughed soils (F, C and B) and 4 natural metal-contaminated soils (D, M, H and N). The asterisk indicates differences of hatching success between covered and non-covered modes for each soil. Sharps indicate significant differences of hatching success between each contaminated soil and pooled non-contaminated soils that do not differ significantly among them.

Table III.2.7. Hatching success (%) of snail's eggs in soils moistened from 40 to 60% of the WHC.

WHC[a]	Soils					
	F	C	D	M	H	N
40%	ND[a]	ND	82	2	83	ND
50%	38	82	70	5	78	58
60%	55	60	ND	ND	ND	77

[a] WHC, Water holding capacity; ND, Non determined.

III.2.2.3.2.2 Effects of various natural soils on hatching success in "non-covered" eggs mode

Among the 3 non-contaminated soils (F, C and B), no significant differences were found in the hatching success (Figure III.2.8B). Consequently, these 3 soils were considered as controls and the 4 metal-contaminated soils (M, H, N and D) were compared in relation to this control. The soils M and H were found to be toxic (Figure III.2.8B).

III.2.2.3.2.3 Influence on embryotoxicity of the matrix used to dilute the compounds under test

M was more toxic when mixed in soil F than in ISO substrate (Figure III.2.9): the EC50 and NOEC were 10.8% (CI: 10.5-11.4) and 12.5% of soil M in soil F, respectively, and 30.3% (CI: 28.1-39.1) and 25% of soil M in ISO substrate.

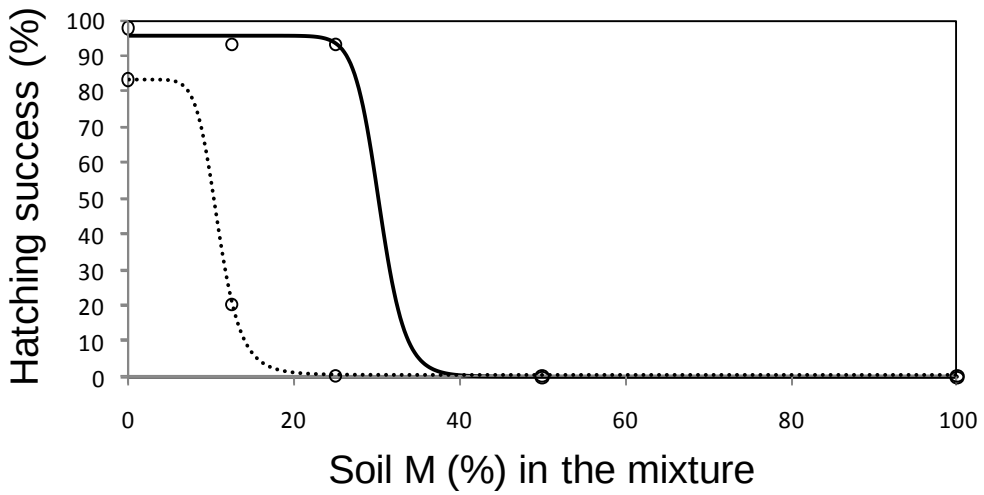


Figure III.2.9. Hatching success (%) of *Helix aspersa* eggs according to the percentage of soil M in ISO substrate (solid line) or in soil F (dotted line). Curves were obtained by Hill's model.

The EC50 of Bypass® was 219 mg a.i. kg^{-1} (CI: 207-229) in soil B (Figure III.2.10a). The tested concentrations in ISO substrate did not allow the EC50 to be determined but the NOEC

was higher than 300 mg a.i. kg^{-1} whereas in soil B, it was 178 mg a.i. kg^{-1} (Figure III.2.10a). The EC50 of Corail® were 0.8 mg a.i. kg^{-1} (CI: 0.4-0.8) and 7.8 mg a.i. kg^{-1} (CI: 5.8-10.8) in soil B and ISO substrate, respectively (Figure III.2.10b). The NOEC were 0.9 mg a.i. kg^{-1} for soil B and 5 mg a.i. kg^{-1} for ISO substrate (Figure III.2.10b). The fungicide Corail® was more toxic than the herbicide Bypass®. Both Bypass® and Corail® were always more toxic for snail embryos when diluted in soil B than in ISO substrate (Figure III.2.10).

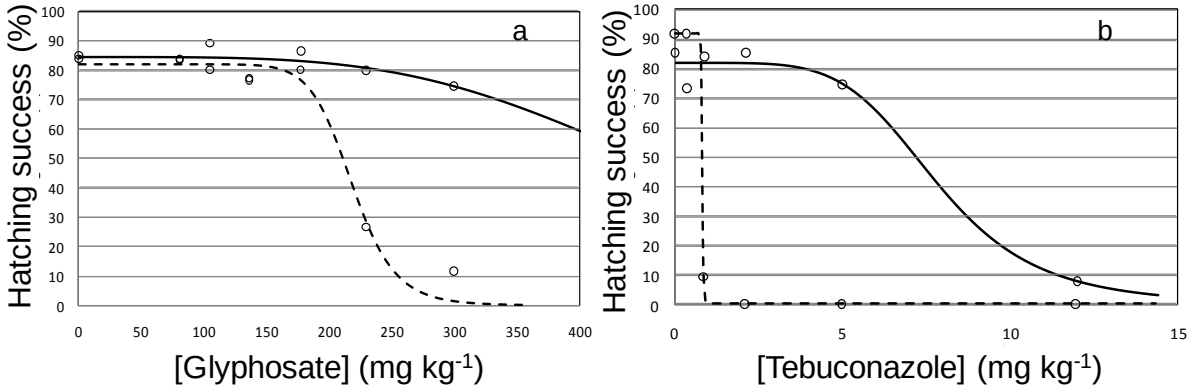


Figure III.2.10. Hatching success (%) of *Helix aspersa* eggs as a function of the concentration (in active ingredient) of (a) Bypass® and (b) Corail® in ISO substrate (solid line) or soil B (dashed line). Curves were obtained by Hill's model.

III.2.2.3.3 Volatile phase bioassay

There was no difference between soil M and the 2 controls (soil F and nothing) in the VPB system: hatching success ranged from 57% to 67%. Thus, if soil M contained volatile substances, they were not toxic to *H. aspersa* embryos.

III.2.2.4 Discussion

III.2.2.4.1 The Liquid Phase Bioassay

All pesticides evaluated in LPB were toxic to *H. aspersa* embryos at concentrations much lower than those recommended for field application in vineyards, suggesting a potential risk to snail eggs. Although herbicides are specifically developed to affect plant functions (e.g. enzymatic inhibitions preventing the synthesis of amino acids acting in plant development), they have been shown to have deleterious effects on vertebrates and invertebrates. The embryotoxicity of glyphosate, the a.i. of Roundup® and Bypass®, has been principally described in aquatic organisms of various phyla: echinoderms (Marc *et al.* 2005), nematodes

(Achiorno *et al.* 2008), mollusks (Bringolf *et al.* 2007), amphibians (Perkins *et al.* 2000; Howe *et al.* 2004) and turtles (Sparling *et al.* 2006). Concerning soil invertebrates, glyphosate has been found to be toxic to arthropods (Schneider *et al.* 2009) and annelids (Casabe *et al.* 2007; Yasmin et D'Souza 2007). Very often, the formulations are more toxic than the active substance (Folmar *et al.* 1979; Tsui et Chu 2003; Howe *et al.* 2004; Bringolf *et al.* 2007; Elandalloussi *et al.* 2008). This is also the case for terrestrial snail embryos (Druart *et al.* 2010). Here, the comparison of the 2 formulations revealed that Roundup® was about 2-fold more toxic than Bypass®. It may be in relation with the surfactant used in the Roundup® formulation (content of 7.5%), which is a polyoxyethylene tallowamine (CAS n°68478-96-6, as indicated by its material safety data sheets, MSDS). No indication of the presence of surfactant appears in the MSDS of Bypass®.

Glufosinate, the a.i. of Basta®, was the most toxic of the 3 herbicides tested. While the human toxicity of this substance is well documented (Ebert *et al.* 1990), its ecotoxicity is not. We found only one study showing that the substance was not very toxic to collembolan eggs except at an extremely high concentration, which would correspond to 50 g l^{-1} (Kang *et al.* 2001).

Corail® was acutely toxic to hatching success of snail eggs. On its MSDS, this formulation is classified as toxic and dangerous to the environment with negative long-term effects on aquatic organisms. The LD50 of tebuconazole, the a.i. of Corail®, is 1.6 mg l^{-1} for a freshwater amphipod (Adam *et al.* 2009), 5.3 mg l^{-1} for the silver catfish (Kreutz *et al.* 2008) and 20 mg l^{-1} for the zebrafish (Sancho *et al.* 2010). Its EC10 for development inhibition in chironomid larvae is 2.45 mg l^{-1}. The present data (EC10 of 0.09 mg l^{-1}) demonstrate that hatching success of snail eggs is a sensitive endpoint that reveals the toxicity of tebuconazole in water solution.

Other organic compounds such as cymoxanil, folpet, fosetyl-Al, metiram-Zn and pyraclostrobin are present as mixtures in Cabrio® Top and Valiant® Flash, which were moderately toxic to snail embryos. As for numerous organic substances, very few ecotoxicological data have been reported for these 4 chemicals. Guida et al. (2008) found an EC50-immobility for *Artemia franciscana* of 0.09 mg l^{-1} for cymoxanil alone whereas it reached 0.025 ng l^{-1} when cymoxanil was in a fungicide mixture of unknown composition.

While sulfur and Cu-based fungicides exhibited toxicity to snail eggs at higher concentrations (several g per liter) compared to other pesticides tested in this work (whose toxicity occurred for several mg per liter), their respective EC50 were well below recommended field applications. Moreover, these fungicides are intensively employed on

vineyards (Komárek *et al.* 2010) and can be accumulated in soils to reach high concentrations (e.g. 3200 mg Cu kg^{-1} in soil (Mirlean *et al.* 2007), which could lead to high concentrations in soil solution. Iglesias et al. (2002) investigated the impact of metals on slug eggs, using a mode of exposure similar to our LPB set-up. They found that the LD50 of Cu was 1.53 µg Cu cm^{-2} of exposure paper after 18 days and concluded that eggs were highly susceptible to contact with Cu. In comparison, the average EC50 of the Bordeaux mixture in our work was 0.15 µg Cu cm^{-2}, showing a higher sensitivity of snail eggs to the Cu present in the Bordeaux mixture.

Repeatability between the 2 tests was correct, the variation (20%) being lower than the acceptable level of variation of 50% proposed by Römbke and Moser (2002) for an international ring test or of 30% generally found in standard ISO bioassays (ISO 11268-2:1998). The variations observed in the hatching success for each product between the 2 repetitions of the bioassay could be explained by the stage of development of the eggs when the exposure started. Indeed, the maximal difference between the first laid-eggs and the last laid-eggs of a given batch can be up to 32 h (about the duration of egg-laying), corresponding to differences in the stage of development (Druart *et al.* 2010), which may not have the same sensitivity to contaminants. Hamm and Hinton (2000) showed that the earlier medaka fish embryos were exposed to diazinon, the less was the hatching success because of the higher sensitivity of early stages.

III.2.2.4.2 The Solid Phase Bioassay

In this technique, results suggest that covering eggs with soil leads to lower hatching success than exposing eggs on the soil surface. Thus, covering the eggs with soil or not was found to be an important variable. Our initial hypothesis was that, when covered, the surface of contact between eggs and soil would be higher, leading to a higher transfer of pollutants from soil to the eggs and a decreasing hatching success. Present data generally support this hypothesis since hatching success was, in most cases (for soils M, H and N), lower when eggs were covered with soil, excepted for soil D, which was never toxic in either case. But a second hypothesis could be evoked, which seems to be confirmed by results obtained with the soil F. Indeed, reduced hatching success was found for eggs covered with this soil, which is not contaminated by metals. This may be in relation with a possible “mechanical” problem: this soil might tend to form a crust over the covered eggs during exposure, preventing snails from getting out easily from the soil. In this case, comparison of data between soils with and

without contaminants is difficult as a reduced hatching rate could result either from a mechanical or a chemical stress. Our results therefore suggest that the “non-covered” mode is faster and simpler to use and interpret. Thus, the “non-covered” mode will be chosen for future tests.

The egg hatching success was similar and higher than 75% on the 3 natural non-contaminated soils in non-covered mode. On this basis, hatching success as a toxicity endpoint does not seem to be very sensitive to the type of soil. The low influence of pH on the development of snail eggs has also been shown in LPB (Druart *et al.* 2010) and this relative stability of the hatchability on various soils constitutes a positive point for the development of the SPB, even though more soils should be tested to confirm the present results. Over a range of moisture levels of 40% to 60% of the WHC, no influence of soil humidity was found on the hatching success. In order to simplify the bioassay, the value of 50% was chosen as a reference for future tests, also because, at this level of humidity, soils are neither too dry nor too moist.

SPB showed that Bypass® was about 230-fold less toxic than Corail® (in LPB tests, it was 1000-fold less toxic). In addition to the difference in the way in which the 2 substances act, the lower toxicity of Bypass® on snail eggs can also be explained by the faster degradation of glyphosate in soil. Indeed, embryonic development in soil can last 20 days and the DT50 (disappearance time 50 %) of glyphosate is 10.6 days in soil B (Druart et al., submitted). In contrast, tebuconazole is recognized as being more persistent, with about 78% of the initial concentration remaining after 3 months (Bending *et al.* 2007), while another study reported a DT50 between 40 and 170 days in a vineyard soil (Komárek *et al.* 2010).
Differences of toxicity between chemicals can also be explained by their bioavaibility, which depends on the physico-chemical properties of the contaminant and those of the soil, on the time and the mode of exposure and on the organism tested. Indeed, Corail® and Bypass® were more toxic when they were in soil B than in ISO substrate. The pH and the OMC are 2 primordial factors influencing the bioavaibility of contaminants (Crommentuijn *et al.* 1997). The pH of ISO substrate is lower than the pH of soil B and its OMC higher. So, the major factor affecting the pesticide bioavaibility is probably the OMC, as already demonstrated for other organic substances (Stokes *et al.* 2005) and also for pesticides by testing soil elutriates (Antunes *et al.* 2010). The bioavaibility also modulates the toxicity of metal-contaminated soils. Comparing 4 soils with different physico-chemical properties and metal concentrations, we did not find any effect of soils D and N on hatching success while soils H and M were moderately and very toxic, respectively, on snail egg development. These results suggest that,

although N was the most contaminated soil, it was not toxic due the lower bioavaibility of the contaminants. The pH values of M and N are close but the OMC is higher in N than in M so, in this case too, OMC appears to be the key factor controlling bioavaibility and thus controlling the toxicity of metals for snail eggs. This hypothesis is supported by the present results showing the strong impact of the dilution matrix: soil M is much more toxic when diluted with soil F than with ISO substrate, probably due to the lower OMC in soil F. ISO substrate is often used to assess the ecotoxicity of contaminants in various standardized bioassays for soil quality evaluation on soil fauna like earthworms, enchytraeids or snails (ISO 11268-1:1993; ISO 15952:2006; ISO 16387:2004). The use of this substrate is criticized because it often underestimates the toxicity of contaminants (Amorim *et al.* 2005). The composition of this reference soil should be changed, especially the percentage of organic matter, as proposed by the Soil Advisory Group (Amorim *et al.* 2009), or, if possible, the use of a natural soil to test substances should be preferred.

III.2.2.4.3 Pros and cons of LPB, SPB and VPB

The toxicity of soil M revealed by SPB was unexpected because this soil has already been tested on growth and reproduction on *H. aspersa* and did not lead to significant effects on these endpoints (Gimbert *et al.* 2008). This suggests that various endpoints should be assessed at different life stages for an accurate hazard and risk assessment of contaminants. Cd is probably not the cause of the toxicity to the eggs, the EC50-hatching of Cd in ISO substrate in SPB being 180 mg kg^{-1} (de Vaufleury *et al.* 2007), whereas in soil M, the concentration was 20 mg kg^{-1}. When a natural contaminated soil is found toxic by SPB, it can be tested by LPB and VPB to bring more information about the nature of toxic substances that it contains. In the case of soil M, no toxicity of the leachate was demonstrated, suggesting that the toxic substances were not soluble in water or only at low, non-toxic concentrations. This was the case for Cd, because its concentration in the leachate was 1970 times lower than the EC50-hatching success of 3.94 mg l^{-1} determined by LPB (Druart *et al.* 2010). The toxicity of soil M could therefore be due to Pb but other unknown substances such as organic compounds may be involved and interactions between metals (Al, Cd, Pb, Zn) and/or organic compounds such as pesticides (Martin *et al.* 2009) may also occur. No toxicity was revealed by VPB testing, suggesting that the toxic substances in soil M were not volatile.

The 3 bioassays developed in this work are fast, simple to carry out and cost effective and can be considered as subchronic toxicity bioassays.

The LPB allows hazard assessment of a large number of substances or products, adapting exposure to make availability of chemicals to snail eggs maximal. As recommended by van Gestel and Weeks (2004) for the ecotoxicity test with earthworms, “filter paper is useful to narrow the range for organics prior to soil testing and it may be a useful research tool for comparing different methods of exposure”. Subsequently, data acquired from LPB should be completed by data obtained from SPB in order to achieve an accurate evaluation of chemicals. SPB evaluates not only pure chemicals in a substance-based approach but also natural contaminated soils (matrix-based approach).

These bioassays contribute to enlarge the number and the diversity of non-target species that can be considered in risk assessment of chemicals. Among the standardized ecotoxicity bioassays available to assess the risk of contaminants for the terrestrial environment, the invertebrate models considered in the European directive 91/414/EC (EC 1991) are bees, collembolans, other non-target arthropods (hymenopterans and dust mites), and earthworms. For *Eisenia foetida* the $LC50_{14\ days}$ of glyphosate and tebuconazole are higher than 480 mg kg^{-1} and 1381 mg kg^{-1}, respectively, whereas the NOEC-reproduction-8 weeks are 28.79 mg kg^{-1} for glyphosate and 10 mg kg^{-1} for tebuconazole (AGRITOX database), respectively. The present SPB data show higher sensitivity of snail eggs. The NOEC of Corail® was found to be 0.9 mg kg^{-1} in a field soil. Applying a safety factor of 100 (only one species and long time exposure), as mentioned by the Technical Guidance Document (TGD) to do risk assessment (EC 2003), the predicted no effect concentration (PNEC) value would be of 9 µg kg^{-1}. The initial predicted environmental concentration (PEC_i), just after an application, can be determined if we do not consider volatilization and interception by vegetation. Knowing the dosage per hectare, the density of soil and considering the dispersion of the product in the 5 first cm of soil, risk would be considered high for Corail® (PEC / PNEC = 10) and low for Bypass® (PEC / PNEC = 1.7). These results suggest the high sensitivity of the SPB and show how this bioassay could be used in risk assessment of chemicals.

III.2.2.5 Conclusion

The embryotoxicity bioassays developed here showcase the impact of some pesticides on snail eggs, at concentrations closed to those predicted in the environment. The results with the different soils tested, naturally contaminated or spiked with contaminants, demonstrate that bioavaibility plays a notable role in the toxicity of the contaminants to *H. aspersa* embryos. The LPB, SPB and VPB use eggs that incubate outside of the mother; thus the 3 bioassays can

be considered as *in vitro* tests (Weisbrod et al., 2008). They are also in accordance with the demand of several organizations such as FRAME (Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments), ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) and ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), which claim for the strategy of the "three Rs" (replacement, reduction and refinement) and to minimize testing that causes suffering to vertebrate animals. Soil contaminants can exert their toxic effects on soil invertebrates *via* exposure to the different phases in the soil: liquid, solid and gaseous. The 3 bioassays (LPB, SPB and VPB) presented in this work constitute complementary tools for a full-scale approach of soil risk assessment, by sensitive and appropriate methods.

Acknowledgments

This work was financially supported by grants from the "Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME)" and the "Conseil Régional de Franche-Comté", France. We thank Ludovic Millet and Nadia Crini for their technical help and Peter Winterton for the review of the English language.

III.2.3 Références

Sites internet

e-phy : http://e-phy.agriculture.gouv.fr.

Publications

(ISO 10872:2010). Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). Water quality

(ISO 11268-1:1993). Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) - Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. Soil quality

(ISO 11268-2:1998). Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) - Part 2: Determination of effects on reproduction. Soil quality

(ISO 15952:2006). Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae). Determination of the effects on growth by soil contamination. Soil quality.

(ISO 16387:2004). Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus sp*.) Determination of effects on reproduction and survival. Soil quality

Achiorno CL, de Villalobos C et Ferrari L (2008). "Toxicity of the herbicide glyphosate to *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha)." Chemosphere **71**(10): 1816-1822.

Adam O, Badot PM, Degiorgi F et Crini G (2009). "Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.)." Ecotoxicology and Environmental Safety **72**(2): 441-449.

Amorim M, Van Gestel K, Römbke J et Heimbach F (2009). Soil Advisory Group meeting. 19th annual SETAC meeting, Goteborg, Sweden.

Amorim MJB, Römbke J, Scheffczyk A et Soares A (2005). "Effect of different soil types on the enchytraeids *Enchytraeus albidus* and *Enchytraeus luxuriosus* using the herbicide Phenmedipham." Chemosphere **61**(8): 1102-1114.

Ansaldo M, Nahabedian DE, Di Fonzo C et Wider EA (2009). "Effect of cadmium, lead and arsenic on the oviposition, hatching and embryonic survival of *Biomphalaria glabrata*." Science of the Total Environment **407**(6): 1923-1928.

Antunes SC, Pereira JL, Cachada A, Duarte AC, Gonçalves F, Sousa JP et Pereira R (2010). "Structural effects of the bioavailable fraction of pesticides in soil: suitability of elutriate testing." Journal of Hazardous Materials **184**: 215-225.

Arslan OC, Parlak H, Oral R et Katalay S (2007). "The effects of nonylphenol and octylphenol on embryonic development of sea urchin (*Paracentrotus lividus*)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **53**(2): 214-9.

Aupinel P, Fortini D, Dufour H, Tasei J-N, Michaud B, Odoux J-F et Pham-Delègue M-H (2005). "Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae." Bulletin of Insectology **58**(2): 107-111.

Aupinel P, Medrzycki P, Fortini D, Michaud B, Tasei J-N et Odoux J-F (2007). "A new larval in vitro rearing method to test effects of pesticides on honey bee brood." Redia **XC**: 91-94.

Baas J, Jager T et Kooijman SALM (2009). "A model to analyze effects of complex mixtures on survival." Ecotoxicology and Environmental Safety **72**(3): 669-676.

Beeby A et Richmond L (1998). "Variation in the mineral composition of eggs of the snail, *Helix aspersa* between populations exposed to different levels of metal contamination." Environmental Pollution **101**(1): 25-31.

Bellas J, Granmo A et Beiras R (2005). "Embryotoxicity of the antifouling biocide zinc pyrithione to sea urchin (*Paracentrotus lividus*) and mussel (*Mytilus edulis*)." Marine Pollution Bulletin **50**(11): 1382-1385.

Bending G, Rodriguez-Cruz S et Lincoln S (2007). "Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories." Chemosphere **69**(1): 82-88.

Brasfield SM, Bradham K, Wells JB, Talent LG, Lanno RP et Janz DM (2004). "Development of a terrestrial vertebrate model for assessing bioavailability of cadmium in the fence lizard (*Sceloporus undulatus*) and in ovo effects on hatchling size and thyroid function." Chemosphere **54**(11): 1643-1651.

Braunbeck T, Böttcher M, Hollert H, Kosmehl T, Lammer E, Leist E, Rudolf M et Seitz N (2005). "Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species - An update." Altex **22**(2): 87-102.

Bringolf RB, Cope WG, Mosher S, Barnhart MC et Shea D (2007). "Acute and chronic toxicity of glyphosate compounds to glochidia and juveniles of *Lampsilis siliquoidea* (Unionidae)." Environmental Toxicology and Chemistry **26**(10): 2094-2100.

Burnison BK, Meinelt T, Playle R, Pietrock M, Wienke A et Steinberg CE (2006). "Cadmium accumulation in zebrafish (*Danio rerio*) eggs is modulated by dissolved organic matter (DOM)." Aquatic Toxicology **79**(2): 185-91.

Casabe N, Piola L, Fuchs J, Oneto ML, Pamparato L, Basack S, Gimenez R, Massaro R, Papa JC et Kesten E (2007). "Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field." Journal of Soils and Sediments **7**(4): 232-239.

Contardo-Jara V, Klingelmann E et Wiegand C (2009). "Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes." Environmental Pollution **157**(1): 57-63.

Coutellec MA, Delous G, Cravedi JP et Lagadic L (2008). "Effects of the mixture of diquat and a nonylphenol polyethoxylate adjuvant on fecundity and progeny early performances of the pond snail *Lymnaea stagnalis* in laboratory bioassays and microcosms." Chemosphere **73**(3): 326-336.

Craig A, Hare L et Tessier A (1999). "Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in the aquatic insect *Chironomus staegeri*." Aquatic Toxicology **44**(4): 255-262.

Crane M et Newman MC (2000). "What level of effect is a no observed effect?" Environmental Toxicology and Chemistry **19**(2): 516-519.

Crommentuijn T, Doornekamp A et van Gestel CAM (1997). "Bioavailability and ecological effects of cadmium on *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate as influenced by pH and organic matter." Applied Soil Ecology **5**(3): 261-271.

Dallinger R, Berger B, Triebskorn-Köhler R et Köhler H (2001). Soil biology and ecotoxicology. The biology of terrestrial molluscs. Barker GM. Oxon, CABI**:** 489-525.

de Vaufleury A, Coeurdassier M, Pandard P, Scheifler R, Lovy C, Crini N et Badot PM (2006). "How terrestrial snails can be used in risk assessment of soils." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(3): 797-806.

de Vaufleury A, Druart C, Coeurdassier M et Scheifler R (2007). Effect of soil contamination on embryonic development and hatchability of land snail eggs. SETAC Europe 17th Annual Meeting, Porto, Portugal, poster.

Druart C, Scheifler R et de Vaufleury A (2010). "Towards the development of an embryotoxicity bioassay with terrestrial snails: Screening approach for cadmium and pesticides." Journal of Hazardous Materials **184**(1-3): 26-33.

Ebert E, Leist K-H et Mayer D (1990). "Summary of safety evaluation toxicity studies of glufosinate ammonium." Food and Chemical Toxicology **28**(5): 339-349.

EC (1991). "Council directive of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. 91/414/EC." Official Journal of the European Union **L230**: 1-154.

EC (2003). Technical Guidance Document on risk assessment. Part II. Institute for health and consumer protection.

EC (2006). "Regulation No 1907/2006 of The European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC." Official Journal of the European Union **49**(L396): 1-849.

ECHA (2008). Guidance for the implementation of REACH: Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.7c: Endpoint specific guidance. European Chemicals Agency.

Eeva T, Rainio K et Suominen O (2010). "Effects of pollution on land snail abundance, size and diversity as resources for pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca*." Science of the Total Environment **408**(19): 4165-4169.

Elandalloussi LM, Leite RB, Rodrigues PM, Afonso R et Cancela ML (2008). "Effect of the herbicide Roundup® on *Perkinsus olseni* in vitro proliferation and in vivo survival when infecting a permissive host, the clam *Ruditapes decussatus*." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **80**(6): 512-515.

Faust M, Altenburger R, Backhaus T, Blanck H, Boedeker W, Gramatica P, Hamer V, Scholze M, Vighi M et Grimme LH (2001). "Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants." Aquatic Toxicology **56**(1): 13-32.

Fol H (1879-1880). "Studies on the molluscan development. Third memoir: On the development of pulmonate gastropods." Archives de zoologie expérimentale et générale **8**: 102-232.

Folmar LC, Sanders HO et Julin AM (1979). "Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **8**(3): 269-278.

Geffard O, Budzinski H et His E (2002). "The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin." Ecotoxicology **11**(6): 403-416.

Gimbert F, de Vaufleury A, Douay F, Coeurdassier M, Scheifler R et Badot PM (2008). "Long-term responses of snails exposed to cadmium-contaminated soils in a partial life-cycle experiment." Ecotoxicology and Environmental Safety **70**(1): 138-146.

Gomot A (1998). "Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring." Ecotoxicology and Environmental Safety **41**(3): 288-297.

Guida M, Inglese M et Meriç S (2008). "A multi-battery toxicity investigation on fungicides." Desalination **226**(1-3): 262-270.

Hallare AV, Kosmehl T, Schulze T, Hollert H, Köhler H-R et Triebskorn R (2005a). "Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos." Science of the Total Environment **347**(1-3): 254-271.

Hallare AV, Schirling M, Luckenbach T, Köhler H-R et Triebskorn R (2005b). "Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos." Journal of Thermal Biology **30**(1): 7-17.

Hamm JT et Hinton DE (2000). "The role of development and duration of exposure to the embryotoxicity of diazinon." Aquatic Toxicology **48**(4): 403-418.

Howe CM, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Werry K et Veldhoen N (2004). "Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species." Environmental Toxicology and Chemistry **23**(8): 1928-1938.

Iglesias J, Castillejo J, Ester A, Castro R et Lombardia MJ (2002). "Susceptibility of the eggs of the field slug *Deroceras reticulatum* to contact with pesticides and substances of biological origin on artificial soil." Annals of Applied Biology **140**(1): 53-59.

Iglesias J, Castillejo J, Parama R, Mascato R et Lombardia MJ (2000). "Susceptibility of the eggs of the pest slug *Deroceras reticulatum* to contact with metal salts." Journal of Molluscan Studies **66**: 171-176.

Kang S, Choi WI et Ryoo MI (2001). "Demography of *Paronychiurus kimi* (Lee) (Collembola: Onychiuridae) under the influence of glufosinate-ammonium on plaster charcoal substrate and in artificial soil." Applied Soil Ecology **18**(1): 39-45.

Kerney M, Cameron R et Bertrand A (2006). A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe, French ed. Paris, Delachaux et Niestlé SA.

Komárek M, Cadková E, Chrastný V, Bordas F et Bollinger J-C (2010). "Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects." Environment International **36**(1): 138-151.

Kramarz PE, De Vaufleury A et Carey M (2007). "Studying the effect of exposure of the snail *Helix aspersa* to the purified Bt toxin, Cry1Ab." Applied Soil Ecology **37**: 169-172.

Kreutz LC, Barcellos LJG, Silva TO, Anziliero D, Martins D, Lorenson M, Marteninghe A et Da Silva LB (2008). "Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings." Ciencia Rural **38**(4): 1050-1055.

Lalah JO, Severin GF, Schramm KW, Lenoir D, Behechti A, Guenther K et Kettrup A (2007). "Effects of a branched p-nonylphenol isomer (4(3 ',6 '-dimethyl-3 '-heptyl)-phenol) on embryogenesis in *Lymnae stagnalis* L." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **52**(1): 104-112.

Leung MCK, Williams PL, Benedetto A, Au C, Helmcke KJ, Aschner M et Meyer JN (2008). "*Caenorhabditis elegans*: An emerging model in biomedical and environmental toxicology." Toxicological Sciences **106**(1): 5-28.

Loewe S et Muischnek H (1926). "Effect of combinations: mathematical basis of the problem." Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. **114**: 313–326.

Mann RM et Bidwell JR (1999). "The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern australian frogs." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **36**(2): 193-199.

Marc J, Le Breton M, Cormier P, Morales J, Belle R et Mulner-Lorillon O (2005). "A glyphosate-based pesticide impinges on transcription." Toxicology and Applied Pharmacology **203**(1): 1-8.

Martin HL, Svendsen C, Lister LJ, Gomez-Eyles JL et Spurgeon DJ (2009). "Measurement and modeling of the toxicity of binary mixtures in the nematode *Caenorhabditis elegans* - A test of independent action." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(1): 97-104.

Mirlean N, Roisenberg A et Chies JO (2007). "Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil)." Environmental Pollution **149**(1): 10-17.

Modesto KA et Martinez CBR (2010). "Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*." Chemosphere **78**(3): 294-299.

Oliveira-Filho EC, Geraldino BR, Grisolia CK et Paumgartten FJ (2005). "Acute toxicity of endosulfan, nonylphenol ethoxylate, and ethanol to different life stages of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835)." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **75**(6): 1185-90.

Pennati R, Groppelli S, Zega G, Biggiogero M, De Bernardi F et Sotgia C (2006). "Toxic effects of two pesticides, Imazalil and Triadimefon, on the early development of the ascidian *Phallusia mammillata* (Chordata, Ascidiacea)." Aquatic Toxicology **79**(3): 205-212.

Perkins PJ, Boermans HJ et Stephenson GR (2000). "Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay - *Xenopus*." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(4 I): 940-945.

Pietrock M, Meinelt T et Marcogliese DJ (2008). "Effects of cadmium exposure on embryogenesis of *Stagnicola elodes* (Mollusca, Gastropoda): Potential consequences for parasite transmission." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **55**(1): 43-48.

Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N et Seralini GE (2005). "Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase." Environmental Health Perspectives **113**(6): 716-720.

Ricklefs RE et Miller GL (1999). Ecology, Fourth Edition, W. H. Freeman 896pp.

Roh J-Y, Park Y-K, Park K et Choi J (2010). "Ecotoxicological investigation of CeO2 and TiO2 nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints." Environmental Toxicology and Pharmacology **29**(2): 167-172.

Römbke J et Moser T (2002). "Validating the enchytraeid reproduction test: organisation and results of an international ringtest." Chemosphere **46**(7): 1117-1140.

Salbego J, Pretto A, Gioda CR, de Menezes CC, Lazzari R, Radünz Neto J, Baldisserotto B et Loro VL (2010). "Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology: 1-6.

Sancho E, Villarroel MJ, Fernandez C, Andreu E et Ferrando MD (2010). "Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*)." Ecotoxicology and Environmental Safety **73**(3): 370-376.

Sawasdee B et Köhler H-R (2009). "Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia)." Chemosphere **75**(11): 1539-1547.

Schirling M, Bohlen A, Triebskorn R et Köhler HR (2006). "An invertebrate embryo test with the apple snail *Marisa cornuarietis* to assess effects of potential developmental and endocrine disruptors." Chemosphere **64**(10): 1730-1738.

Schneider MI, Sanchez N, Pineda S, Chi H et Ronco A (2009). "Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach." Chemosphere **76**(10): 1451-1455.

Shoaib MA, Mahmoud MF, Loutfy N, Tawfic MA et Barta M (2010). "Effect of botanical insecticide Nimbecidine® on food consumption and egg hatchability of the terrestrial snail *Monacha obstructa*." Journal of Pest Science **83**(1): 27-32.

Siegel S et Castellan JN (1988). Nonparametric statistics for the behavioral sciences, Second Edition. Singapore, McGraw-Hill Book Company.

Snyman RG, Reinecke AJ et Reinecke SA (2005). "Quantitative changes in the digestive gland cells of the snail *Helix aspersa* after exposure to the fungicide copper oxychloride." Ecotoxicology and Environmental Safety **60**(1): 47-52.

Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E et Lester JN (2008). "Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters." Environment International **34**(7): 1033-1049.

Sparling DW, Matson C, Bickham J et Doelling-Brown P (2006). "Toxicity of glyphosate as Glypro® and LI700 to red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) embryos and early hatchlings." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(10): 2768-2774.

Stokes JD, Paton GI et Semple KT (2005). "Behaviour and assessment of bioavailability of organic contaminants in soil: relevance for risk assessment and remediation." Soil Use and Management **21**: 475-486.

Strmac M, Oberemm A et Braunbeck T (2002). "Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae." Journal of Fish Biology **60**(1): 24-38.

Syberg K, Elleby A, Pedersen H, Cedergreen N et Forbes VE (2008). "Mixture toxicity of three toxicants with similar and dissimilar modes of action to *Daphnia magna*." Ecotoxicology and Environmental Safety **69**(3): 428-436.

Tsui MTK et Chu LM (2003). "Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: Comparison between different organisms and the effects of environmental factors." Chemosphere **52**(7): 1189-1197.

van Gestel CAM et Weeks JM (2004). "Recommendations of the 3rd international workshop on earthworm ecotoxicology, Aarhus, Denmark, August 2001." Ecotoxicology and Environmental Safety **57**(1): 100-105.

Weisbrod AV, Sahi J, Segner H, James MO, Nichols J, Schultz I, Erhardt S, Cowan-Ellsberry C, Bonnell M et Hoeger B (2008). "The state of in vitro science for use in bioaccumulation assessments for fish." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(1): 86-96.

Yasmin S et D'Souza D (2007). "Effect of pesticides on the reproductive output of *Eisenia fetida*." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **79**(5): 529-532.

Zhang L, Gibble R et Baer KN (2003). "The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development, and reproduction in *Daphnia magna*." Ecotoxicology and Environmental Safety **55**(3): 330-337.

III.3 Chapitre 3 : Effets et transferts d'herbicides de la vigne chez l'escargot suite à l'exposition chronique en laboratoire *via* le sol et/ou la nourriture

III.3.1 Glyphosate and glufosinate-based herbicides: fate in soil, transfer to and effects on land snails

Cette partie a fait l'objet d'une publication actuellement en révisions dans la revue *Journal of Soils and Sediments*. Les auteurs sont Coline Druart, Maurice Millet, Renaud Scheifler, Olivier Delhomme et Annette de Vaufleury.

Résumé

Le but de ce travail est d'évaluer le transfert et les effets de deux herbicides très utilisés dans le monde sur l'escargot terrestre *Helix aspersa* durant une exposition de long terme en laboratoire. De jeunes éclos ont été exposés pendant 168 jours à du sol et/ou de la nourriture contaminés avec des formulations de glyphosate (Bypass®) ou de glufosinate (Basta®) aux concentrations résultant de l'application des doses recommandées au champ ou à 10 fois ces concentrations. L'étude des cinétiques de dégradation des herbicides dans le sol montre que les escargots sont principalement exposés durant les 28 premiers jours. Les DT50 du glyphosate et du glufosinate sont de 10,6 et 3,7 jours, respectivement. Aucun effet sur la survie ou la croissance n'a été démontré. Concernant la maturation du tractus génital des escargots, l'exposition aux herbicides tend à diminuer le développement de la glande à albumen (inhibition de 43,5 ± 32.8%). La présence de glyphosate (6 mg kg^{-1} de masse sèche) a été mise en évidence dans les escargots exposés en continu à la plus forte concentration dans la nourriture. Les résultats indiquent un effet mineur des herbicides à des concentrations représentatives de l'environnement, cependant, la détection de résidus dans les tissus peut présenter un risque potentiel de transfert dans la chaîne alimentaire. Ce bioessai de toxicité chronique complète le panel des tests déjà disponibles pour évaluer la toxicité des contaminants dans le sol, et plus particulièrement des pesticides.

Mots-clés : accumulation, dégradation, mollusques, pesticides, sol.

Abstract

Purpose: the aim of this work was to assess the transfer and effects of two widely used herbicides on the land snail *Helix aspersa* during long-term exposure under laboratory conditions.

Materials and methods: newly hatched-snails were exposed for 168 days to soil and/or food contaminated with a formulation of glyphosate (Bypass®) or glufosinate (Basta®) at the recommended field doses and also at 10-fold this dose.

Results and discussion: herbicide degradation patterns showed that snails were mainly exposed during the first 28 days. The DT50 of glyphosate and glufosinate was established at 10.6 and 3.7 days, respectively. No significant effects on survival and growth were determined. Concerning genital tract maturation of the snails, exposure to herbicides tended to decrease the development of the albumen gland (inhibition of 43.5 ± 32.8%). The presence of glyphosate (6 mg kg^{-1} dry weight) was demonstrated in snails exposed continuously to this active ingredient at the highest concentration in their food.

Conclusions: These results showed a low effect of herbicides at relevant concentrations in soil but the detection of residues in tissues indicated a potential risk of transfer to the food chain. This chronic toxicity bioassay could complete the available tests to assess toxicity of contaminants, and more particularly pesticides, in soil.

Keywords: accumulation, degradation, mollusc, pesticides, soil.

III.3.1.1 Introduction

In a context where world consumption of pesticide is already high, France remains the largest consumer of all in the European Union (UIPP 2009). To be authorized for agricultural use, pesticides must be assessed as described in Directive 91/414/EC (EC 1991). Assessment of chemical ecotoxicity is often limited to tests run on a few species, especially for the terrestrial environment (Frampton *et al.* 2006). For instance, in the case of glyphosate, which is the most widely used herbicide in the world, its terrestrial ecotoxicity assessment in European databases consists of acute toxicity bioassays on bees, other arthropods, earthworms and birds and only one chronic bioassay to assess effects on reproduction which uses earthworms (EC 2002b). Approved bioassays allowing assessment of chronic effects of pesticides are scarce and seldom carried out, as shown by the rarity of information on the long-term ecotoxicity of most of the active ingredients or of their commercial formulations. There is therefore a need for complementary ecotoxicity data on pesticides using new methods for hazard and risk assessment with a larger choice of non-target organisms.

Terrestrial snails constitute suitable models for the risk assessment of metals (Beeby et Richmond 2002; Scheifler *et al.* 2003) but also of pesticides (Coeurdassier *et al.* 2001; Snyman *et al.* 2005; Laguerre *et al.* 2009) in soils. Unlike earthworms, which are mainly exposed to soil and decomposing organic matter, land snails may be exposed to 3 sources of contamination: air, soil and plants. Their use in ecotoxicity led to the development of a 28-day subchronic bioassay measuring the growth of the snail *Helix aspersa* (ISO 15952:2006). Apart from Gimbert *et al.* (2008) who studied the effects of Cd in soil on a partial life-cycle exposure, no studies have reported the effects of contaminants on growth to the sexual maturity in land snails.

Among the various users of pesticides in France, vineyards consume the most (Aubertot *et al.* 2005). Among them, glyphosate and glufosinate ammonium-based herbicides, recognized for their efficiency are widely employed. Both inhibit the enzymes responsible for amino acid synthesis. They are known to degrade quickly in soils but degradation times (DT50) are highly variable, depending on the experimental conditions and soil type (e.g. between 4 and 180 days for glyphosate in laboratory conditions, EC 2002b). Their major metabolites are aminomethyl-phosphonic acid (AMPA) for glyphosate and 3-methylphosphonyl propionic acid (MPP), 2-methylphosphonyl acetic acid (MPA) and disodium L-2-acetamido-4-methylphosphinato-butyrate (NAG) for glufosinate. According to European legislation, glufosinate is classified as toxic to humans but not dangerous for the environment unlike

glyphosate, which is considered as toxic to aquatic organisms and may cause long-term adverse effects in the aquatic environment (IHCP ESIS database of the Institute for Health and Consumer Protection). To our knowledge, assessment of the fate and effects of these herbicides on a non-target terrestrial gastropod mollusc has never been described. Studies of the toxicity of other pesticides on *Helix aspersa* have concerned carbamates and organophosphorous insecticides which had low lethal toxicity on snails and slugs fed contaminated food for 10 days (Schuytema *et al.* 1994) or pentachlorophenol insecticide, which did not lead to mortality in *H. aspersa* snails at up to 1000 mg kg^{-1} in their food (Gomot de Vaufleury 2000). Furthermore, very few studies have looked at the presence of glyphosate or glufosinate in animal tissues, probably because analyzing these polar, ionic and amphoteric substances is particularly difficult.

The aim of this work was thus to study the fate in soils of glyphosate and glufosinate and their possible subsequent transfer to *H.aspersa*. Two commercial formulations of these active ingredients have been used: Bypass® and Basta® respectively. The long term-effects of these formulations on mortality, growth and sexual maturation were investigated over 168 days exposure to herbicides in soil and/or in food.

III.3.1.2 Materials and Methods

III.3.1.2.1 Snails

Helix aspersa aspersa Müller 1774 (syn. *Cantareus aspersus*) snails came from our standardized rearing (ISO 15952:2006). They had just hatched and weighed 33.7 ± 5.6 mg.

III.3.1.2.2 Chemicals

Bypass® (Dow AgroSciences S.A.S.) and Basta® F1 (Bayer CropScience) are 2 herbicide formulations under the form of soluble concentrate: glyphosate-based (360 g l^{-1}) and glufosinate ammonium-based (150 g l^{-1}), respectively. From recommended field doses in the vineyard (6 l ha^{-1} for Bypass® and 5 l ha^{-1} for Basta®, respectively), field concentrations in the soil were estimated at 3 mg kg^{-1} for glyphosate and 1.07 mg kg^{-1} for glufosinate, considering an even distribution of the products in the upper 5 cm of soil (EC 2002a; EPPO 2003).

III.3.1.2.3 Soil

The field soil used for the experiments was sampled down to 5 cm in a vineyard located in Bergbieten (Alsace, France). It was then air-dried and sieved at 4 mm. It is characterized by a pH_{water} of 8.38, 2.9% organic matter, 25.4% sand, 39.5% silt and 35.1% clay, a water holding capacity (WHC) of 434 ml kg^{-1} and a density of 1.4. It was sprayed with water for controls or spiked with contaminant solutions up to 45% of its WHC and stored in a freezer at -30°C until use for snail exposure experiments.

III.3.1.2.4 Food

Three types of plant-based food were given to the snails: first age Helixal® (Chays Co. Ltd., Valdahon, 25800, France) for juveniles during the first 28 days, second age Helixal® for the next 84 days and Helixal® Finition for the last 56 days. At the beginning of the experiment, all the feed required by the snails for the 168-day experiment were prepared: dry food was sprayed with water for controls or herbicide solutions to reach a final humidity of 20%. Control and contaminated foods were kept at -30°C and a portion was thawed and given to the snails 3 times a week.

III.3.1.2.5 Experimental system

The snails were exposed for 168 days (from hatchling to adult) to soil (S) and/or food (F) contaminated with Bypass® (By) or Basta® (Ba) at 2 concentrations (field concentration = treatment 1 and 10-fold the field concentration = treatment 2). This duration of exposure allowed assessing effects on survival and growth until maturation of the genital tract. Hereafter, snails exposed to Bypass®, in soil only and with treatment 1, for instance, will be named By1S. For control (C) and Bypass® exposure (By1F, By1S, By1SF, By2F, By2S and By2SF), 15 transparent polystyrene boxes were used for each mode. For Basta®, only the modes where snails were exposed to both soil and food (Ba1SF and Ba2SF) were experimented and 3 boxes per mode were used. Each box contained 3 cm of control or contaminated soil (i.e., 800 g dry soil) and 5 snails. Growth was assessed every 28 days by measurement of snail fresh mass and shell diameter. The snails were considered as adults when shell diameter became constant and the shells were lipped (Beeby et Richmond 2003). After 28 and 56 days, 5 boxes from each Bypass® mode were sampled for soil analysis. After

168 days (end of experiment), all boxes were sampled for soil analysis, one snail per box was kept for dissection and the remaining snails of modes C, By1SF, By2F, By2S and By2SF were sampled: after starvation for 2 days to empty their gut, they were kept at -30°C before analysis of glyphosate and AMPA residues.

The variation of glyphosate, glufosinate and AMPA concentrations in soils (without snails) over time was assessed in boxes containing soils spiked with Bypass® or Basta®, at concentrations of treatments 1 and 2. Three replicate boxes with 6 compartments each (about 130 g dry soil per compartment) were set up for each concentration. Soils were sampled at 0, 1, 2, 4, 7, 14, 28, 56, 84, 112, 140 and 168 days after spiking for treatment 1 and at 0, 7, 28 and 168 days for treatment 2. At the sampling date a whole compartment was taken in each box and kept at -30°C until analysis.

III.3.1.2.6 Observation of the genital apparatus and histology

Snails were decapitated and removed from their shells. The genital tract was dissected and weighed as described by Gomot de Vaufleury and Kerhoas (2000). Gonad, albumen gland and the rest of the genital tract (i.e. ovispermiduct, penis, dart sac and multifid glands) were weighed separately. Gonads were fixed in Bouin's solution and dehydrated in ethanol and butanol before being embedded in paraffin. Thin sections (5 µm) were then stained by Masson's trichrome. Observations and photography were performed on a Zeiss AXIO Imager M2 microscope equipped with a Zeiss AxioCam MRc5 camera.

III.3.1.2.7 Herbicide residue determination in soil, food and snails

Extraction and analysis of soil samples were performed according to Druart *et al.* (2011): briefly, samples of 5 g of soil were defrosted, dried and extracted (in duplicates for soil without snails) by suspension in water. Soil extracts were analyzed by pre-column derivatization by 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) coupled with high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FD). Total concentrations of glyphosate, glufosinate and AMPA are given in mg kg^{-1} dry weight (dw). Quantification limits, detection limits and recoveries were 0.17, 0.10 mg kg^{-1} and 97 ± 17% for glyphosate, 0.03, 0.02 mg kg^{-1} and 96 ± 8% for glufosinate and 0.03, 0.02 mg kg^{-1} and 90 ± 12% for AMPA (Druart *et al*. 2011).

Glyphosate and glufosinate concentrations were analyzed in food samples maintained at -30°C, 30 months after spiking. The analyses were performed by Eurofins Scientific Analytics Nantes (Nantes, France). Analysis of glyphosate and AMPA in food samples was performed by extraction with hydrochloric acid, followed by a dilution step to minimize matrix effects. Then derivatization with FMOC-Cl and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis in ESI-mode were performed, using 2 MRM transitions per substance. Quantification limits were 5 mg kg^{-1} for glyphosate and 10 mg kg^{-1} for AMPA. For glufosinate analysis, extraction was performed with water and derivatized with trimethyl orthoacetate. The extract was purified on a silica gel mini-column and then analyzed by gas chromatography coupled with flame photometric detection (GC-FPD). The quantification limit of glufosinate was 0.05 mg kg^{-1}. Total concentrations of glyphosate, glufosinate and AMPA are expressed in mg kg^{-1} fresh weight (fw).

Glyphosate in snails was analyzed by IPL Santé, Environnement Durables of Bordeaux (France). After thawing, snails were pooled to obtain a sufficient mass for analyses (80-100 g). Following grinding and extraction, analyses were performed by FMOC-Cl post-column derivatization and HPLC-FD. Quantification limits were 0.2 mg kg^{-1} for glyphosate and 0.5 mg kg^{-1} for AMPA. Total concentrations of glyphosate and AMPA are expressed in mg kg^{-1} fw. Glufosinate analysis failed because no method is available to determine this compound in animal tissues.

Bioaccumulation factors (BAFs) were determined as the ratio of glyphosate concentration in snails and nominal concentration in food or soil (mg kg^{-1} dw). Concentrations in snails given in mg kg^{-1} fw were converted into dw by considering 80% of water content in snails (Gomot 1998). Calculation of BAF (dw/dw) of a pesticide by snail is usually expressed by considering the tissue concentrations in dry weight (Coeurdassier et al. 2001). It allows minimizing the influence of variability of water content in snails following the humidity of the medium and facilitating comparisons of data of experiments performed in various environmental conditions.

III.3.1.2.8 Statistics

At each sampling date, differences in mass or shell diameter were assessed using a linear mixed-effects model (LME), with a random effect on the boxes to take into account the fact that the 5 snails included in a box are pseudo-replicates and not true replicates. When significant differences ($p < 0.05$) were found between modes of exposure, Tukey's test was

applied. Differences in genital apparatus maturation were assessed by a linear model (LM) using the masses of the different organs measured as factors. Mortality and number of adults were assessed by a Poisson generalized linear model (GLM). A Kruskal-Wallis rank test was used to assess differences in soil concentrations. When significant differences ($p < 0.05$) were found between the samples, multiple comparisons were performed on ranks, using Tukey's Honestly Significant Difference test. These statistics were performed with R (2.9.2) (R Development Core Team, 2010).

To fit the degradation data of glyphosate and glufosinate in soil for 168 days, a non-linear regression model was used. This kind of model is adapted to describe fate of chemicals for long term experiments, e.g. like Faber et al. (1997) who studied the degradation of glufosinate for 295 days. Some authors used linear model to describe glyphosate or glufosinate degradation but for shorter exposure duration (Forlani et al. 1999) due to the initially rapid degradation which slowed over time (Accinelli et al. 2004). The non-linear model used to calculate the DT50 values of glyphosate and glufosinate in soil is:

$$y = ae^{bx} + c \qquad (7)$$

where a is the intercept of the exponential, b, the slope of the exponential, c, the second intercept, y, the concentration of the compound and x, the number of days after spiking. This model was built with XLSTAT-pro 2010 (© 1995-2010 Addinsoft).

III.3.1.3 Results

III.3.1.3.1 Fate of herbicides in food and soils with or without snails

The concentrations of herbicides measured in food were 0.96 mg kg^{-1} and 9.3 mg kg^{-1} fw (corresponding to 1.2 mg kg^{-1} and 11.63 mg kg^{-1} dw) for nominal and initial glufosinate concentrations of 1.07 mg kg^{-1} and 10.7 mg kg^{-1} dw, respectively. It was not possible to determine glyphosate concentrations in food due to analytical problems, notably a lack of repeatability. The good agreement between nominal glufosinate concentrations and concentrations measured after 30 months at -30°C suggests that no degradation occurred.

The concentrations of glyphosate (Bypass®) and glufosinate (Basta®) measured in soils without snails at t_0 are reported in Table III.3.1. Degradation kinetics for glyphosate (solid black line) are presented in Figure III.3.1. AMPA concentrations are represented by the dotted black line (Figure III.3.1). Glufosinate degradation kinetics are presented in Figure III.3.2. The degradation of glyphosate and glufosinate in soil was correctly described by the non-

linear model, as indicated by the coefficients of determination (Table III.3.1). DT50 values determined from the equations of these curves were 10.6 ± 0.9 days for glyphosate and 3.7 ± 3.4 days for glufosinate (average values for the 2 concentrations, Table III.3.1). Maximal concentrations of AMPA were reached after 28 days for both treatments (Table III.3.1), corresponding to 16.2% and 10.4% (in molar ratio) of the measured initial concentrations of glyphosate, afterwards it decreased until 168 days (Figure III.3.1). From 56 days for glyphosate and 7 days for glufosinate until the end of the experiment, concentrations were below the respective quantification limits for treatment 1 but not for treatment 2. Consequently, degradation was not totally complete after 168 days for the herbicides, even though the residues were very low.

Table III.3.1. Degradation kinetics data of glyphosate and glufosinate in Bergbieten soil.

Compound	Nominal concentration (t_0) mg kg^{-1} dw	Measured concentration (t_0) mg kg^{-1} dw	DT50 (days)	R^2 of non-linear model	Maximal concentration of AMPA (mg kg^{-1} dw)
Glyphosate	3	2.62 ± *0.13*	10.0 ± 0.7	0.971	0.29 ± *0.10*
	30	42.56 ± *2.62*	11.2 ± 1.0	0.989	2.88 ± *0.36*
Glufosinate	1.07	0.55 ± *0.02*	1.3 ± 0.1	0.993	-
	10.70	11.12 ± *0.36*	6.0 ± 0.3	0.993	-

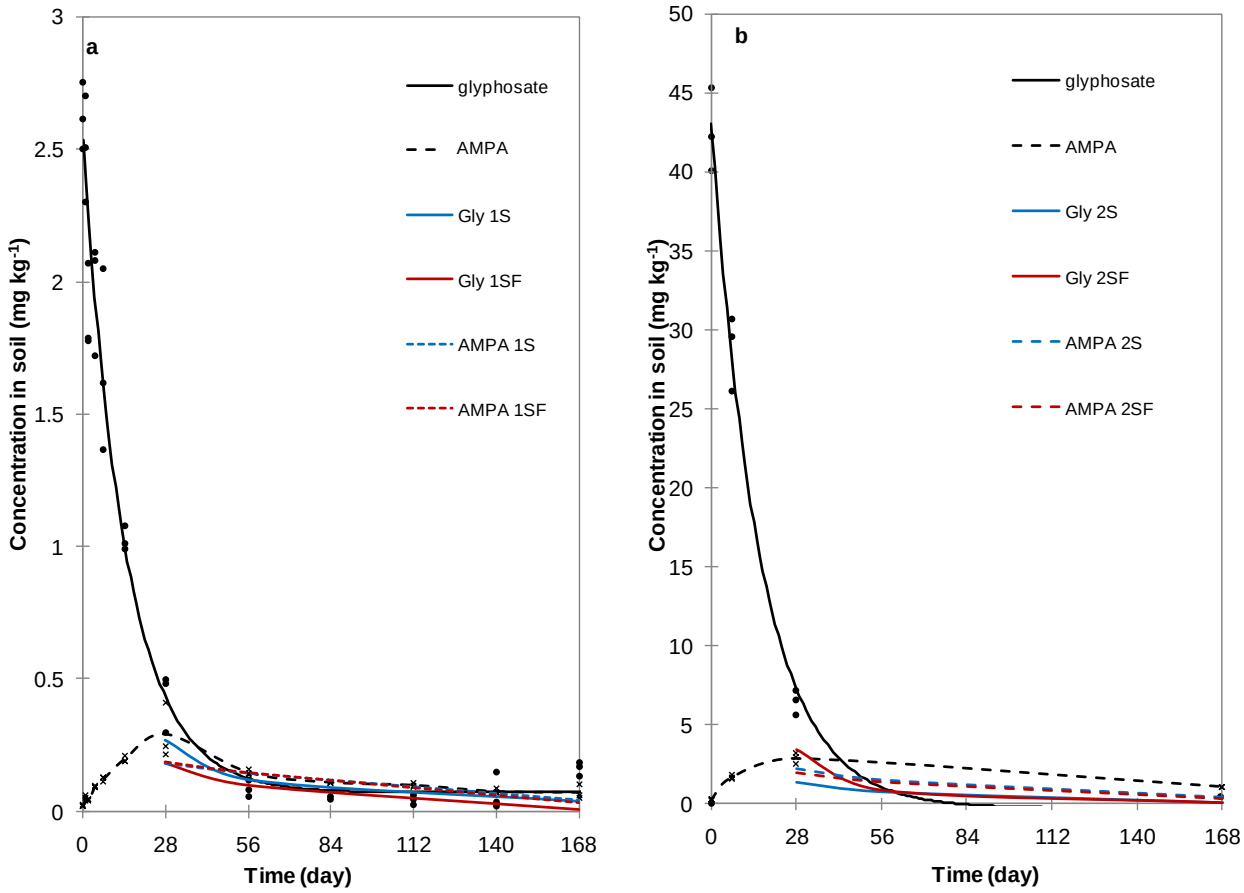


Figure III.3.1. Kinetics of glyphosate (Gly) degradation and AMPA formation in soils without snails (black curves) for an initial measured concentration of (a) 2.62 mg kg^{-1} and (b) 42.56 mg kg^{-1} and in soils with snails (coloured curves) when they were exposed to Bypass® in soil (S), in food (F) or in both (SF) at treatment levels 1 or 2.

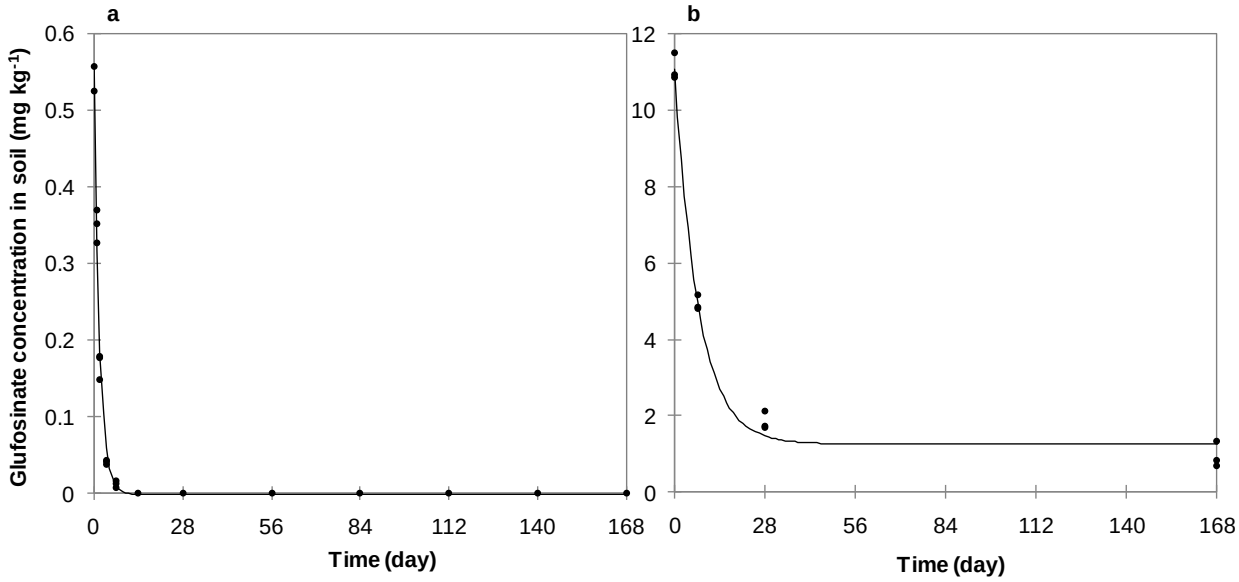


Figure III.3.2. Glufosinate degradation kinetics in soils without snails for an initial measured concentration of (a) 0.57 mg kg^{-1} and (b) 11.12 mg kg^{-1}.

Coloured solid curves in Figure III.3.1 represent the degradation kinetics of glyphosate in soils with snails. Dotted curves show the AMPA concentrations. For the initially non-contaminated soils, (control soils and soils where snails were only exposed to contaminated food), concentrations of both compounds (glyphosate and AMPA) were below quantification limits (Figure III.3.3). For readability purposes, these concentrations are not reported in Figure III.3.1. No significant difference was found between controls and Gly/AMPA F or between Gly/AMPA S and Gly/AMPA SF for either treatment (1 and 2) at any of the considered times (Figure III.3.3).

Glyphosate concentrations at 28 days were significantly higher in soils without snails (0.43 ± 0.11 mg kg^{-1}, Figure III.3.1a and 6.4 ± 0.76 mg kg^{-1}, Figure III.3.1b) than in soils with snails (0.27 ± 0.06 mg kg^{-1}, Figure III.3.1a and 1.39 ± 0.99 mg kg^{-1}, Figure III.3.1b). AMPA concentrations at 28 days were relatively high compared to the corresponding glyphosate concentrations. For AMPA 2SF, they were lower than glyphosate concentrations but for AMPA 1S, AMPA 1SF and AMPA 2S, they were equal or higher to glyphosate concentrations (Figure III.3.3). Moreover, for all modes where soil was initially contaminated, AMPA concentrations were higher than glyphosate concentrations from 56 days to day 168 (Figures III.3.1 and III.3.3). In soils without snails, the time where AMPA and glyphosate concentrations were similar, occurred later, after about 40 days. This observation reveals that glyphosate degradation occurred quicker in the presence of snails.

In soil with snails, initially contaminated with Basta®, glufosinate concentrations at 168 days were below the quantification limit for both treatments.

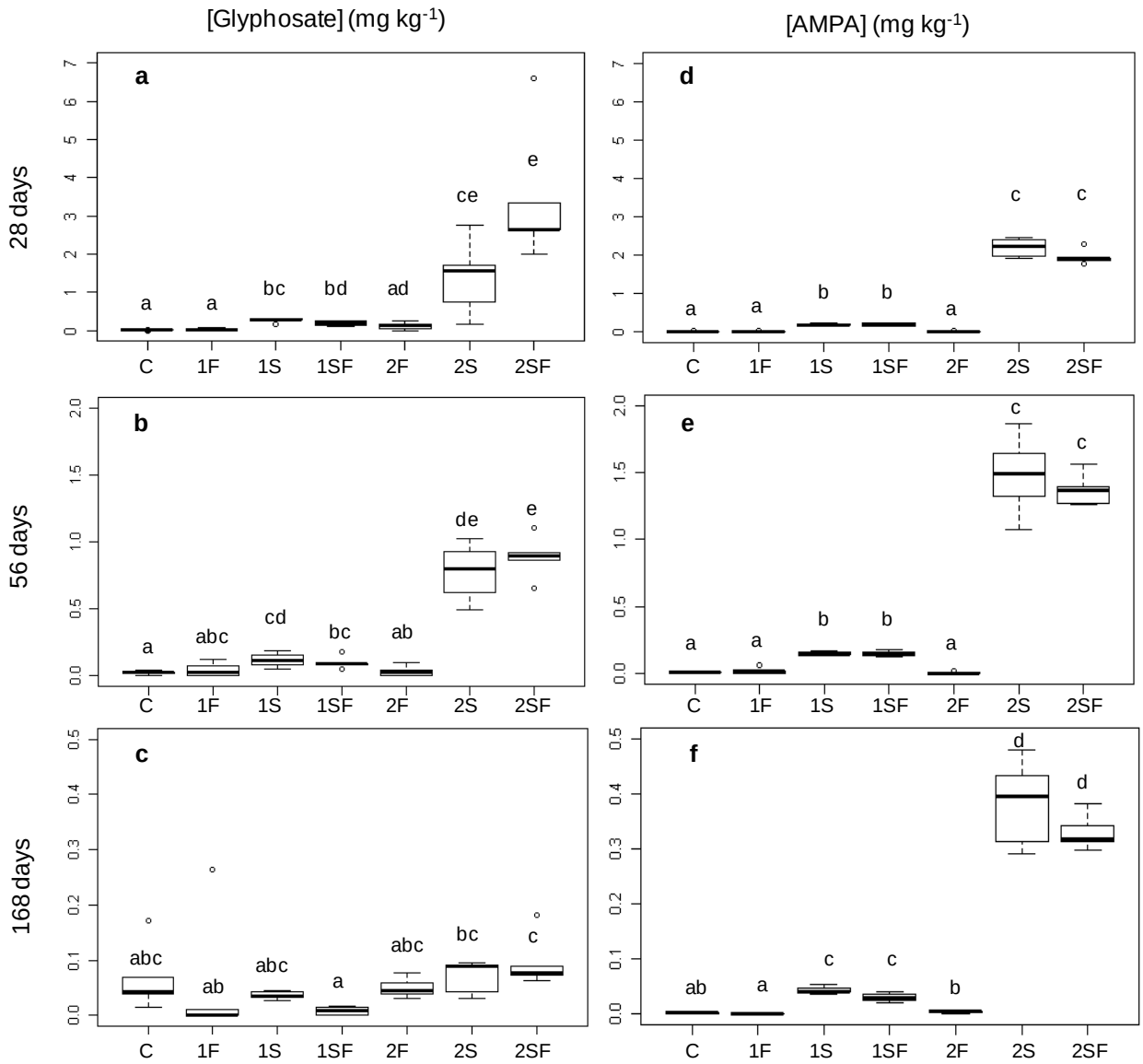


Figure III.3.3. Concentrations in (a, b, c) glyphosate and (d, e, f) AMPA in soil with snails after (a, d) 28, (b, e) 56 and (c, f) 168 days exposure when snails were not exposed (C) or when they were exposed to Bypass® in soil (S), in food (F) or in both (SF) at treatment levels 1 or 2. The same letters indicate no difference between modes.

III.3.1.3.2 Herbicide effects on snails

As seen in the degradation curves of herbicides (Figures III.3.1 and III.3.2), the exposure of snails mainly occurred during the first 2 months for glyphosate and only 1 month for glufosinate, or even only 7 days for concentration at treatment 1.

At the end of the experiment, mortality was 5% in controls. For snails exposed to herbicides, mortality ranged from 4% for By2SF to 20% for Ba1SF but without a significant difference between the various modes (Table III.3.2).

Table III.3.2. Body fresh mass, shell dry mass, mortality and percentage of adults observed after 168 days of exposure to Bypass® (n=5) or Basta® (n=3) by soil (S) and / or food (F) at treatment levels 1 or 2.

Mode	Body fresh mass (g)	Dry mass of shells (g)	Mortality (%)	Percentage of adult snails (%)
C	6.02 ± *2.52*	1.23 ± *0.31*	5.3 ± *9.2*	28.0 ± *17.9*
By1S	5.50 ± *2.09*	1.12 ± *0.20*	8.0 ± *14.7*	16.0 ± *8.9*
By1F	6.82 ± *1.74*	1.11 ± *0.23*	8.0 ± *16.6*	32.0 ± *17.9*
By1SF	5.79 ± *2.02*	1.13 ± *0.15*	6.7 ± *16.3*	24.0 ± *16.7*
By2S	6.05 ± *1.87*	1.09 ± *0.22*	12.0 ± *18.2*	20.0 ± *14.1*
By2F	5.68 ± *2.38*	1.04 ± *0.15*	8.0 ± *12.6*	40.0 ± *14.1*
By2SF	5.66 ± *2.55*	1.07 ± *0.25*	4.0 ± *11.2*	20.0 ± *24.5*
Ba1SF	5.84 ± *2.40*	1.17 ± *0.24*	20 ± *20*	26.7 ± *11.5*
Ba2SF	6.48 ± *1.83*	1.18 ± *0.16*	6.7 ± *11.5*	33.3 ± *11.5*

Figure III.3.4 shows the growth of snails for the different modes in terms of total fresh mass (Figure III.3.4a) and shell diameter (Figure III.3.4b) from the beginning of the experiment to 168 days. With respect to the controls, no significant difference of mass was noted except at isolated dates, but which they were not observed for the whole exposure time. No difference in shell diameter was observed between modes (Figure III.3.4b). At the end of the exposure period, no difference in total fresh mass and dry shell mass was observed (Table III.3.2). There was no significant difference in the percentage of adults obtained irrespective of the mode (Table III.3.2); this percentage reached 40% at maximum for By2F (Table III.3.2).

The total mass of the genital tract, as well as the mass of the various sexual organs it comprises, did not differ significantly between exposed and control snails (Figure III.3.5). However, in most cases, exposed snails (except By1S) presented less well developed reproductive organs: average percentages of inhibition between controls and all exposed modes were 43.5% (± 32.8) for the albumen gland, 24.1% (± 31.2) for the total tract, 9.1% (± 33.2) for the rest of the genital tract and 8.7% (± 11.4) for the gonad (Figure III.3.5). There were significant differences between By1S and Ba2SF for the albumen gland, the rest of the genital tract and the total genital tract mass.

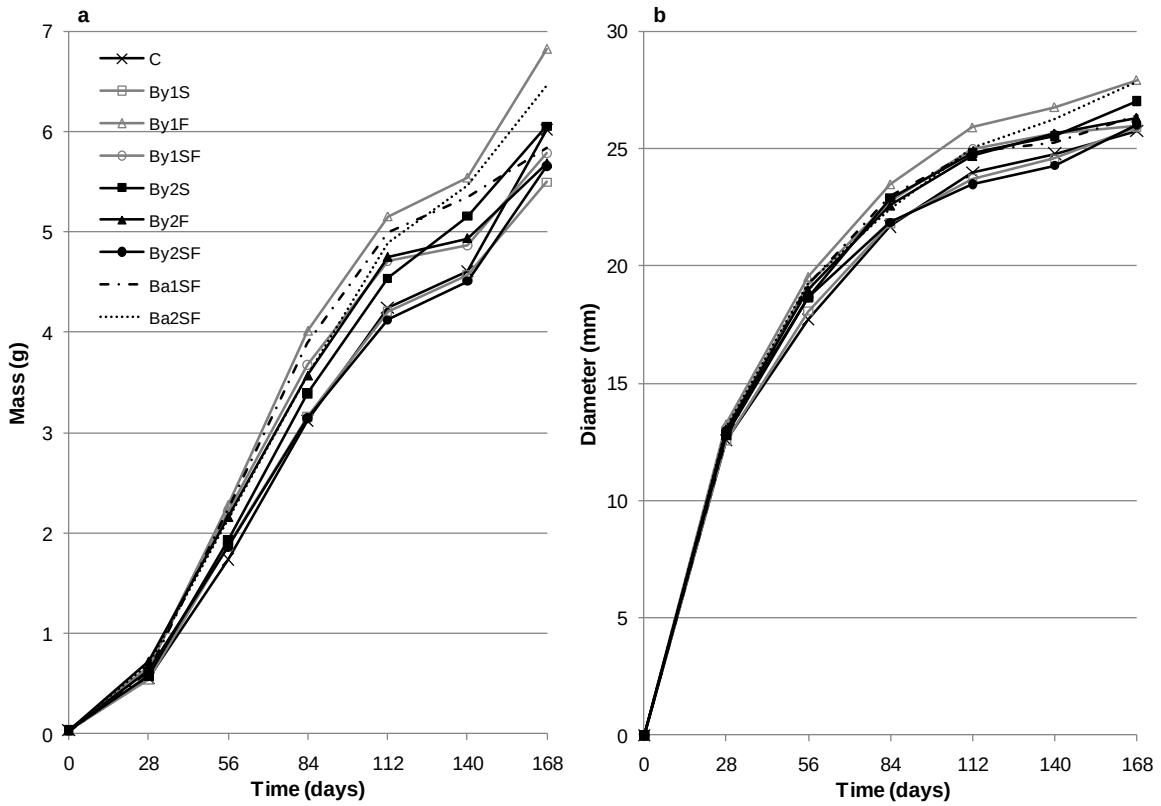


Figure III.3.4. Growth of *Helix aspersa* snails not exposed (C) or exposed to Bypass® (By) or Basta® (Ba) in soil (S) or food (F) or both (SF) at treatment 1 or treatment 2 over 168 days, in (a) fresh mass and (b) shell diameter.

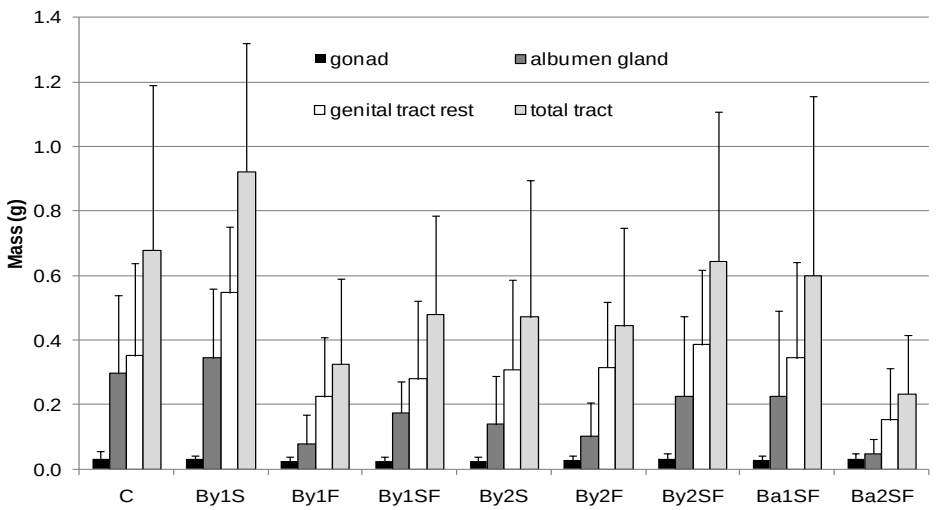


Figure III.3.5. Fresh mass of the different parts of the genital apparatus of *Helix aspersa* not exposed (C) or exposed to Bypass® (By) or Basta® (Ba) in soil (S) or food (F) or both (SF) at treatment 1 or treatment 2 at 168 days. Bars represent standard deviation.

Histological observations of the gonads did not reveal anomalies for any of the modes. For all modes, including the controls, gametogenesis was similar: ovogenesis was in an early stage with previtellogenic oocytes in acini (Figure III.3.6) and spermatogenesis provided all

developmental stages of the male cells with spermatogonies, spermatocytes, spermatids and numerous spermatozoa in acini (Figure III.3.6).

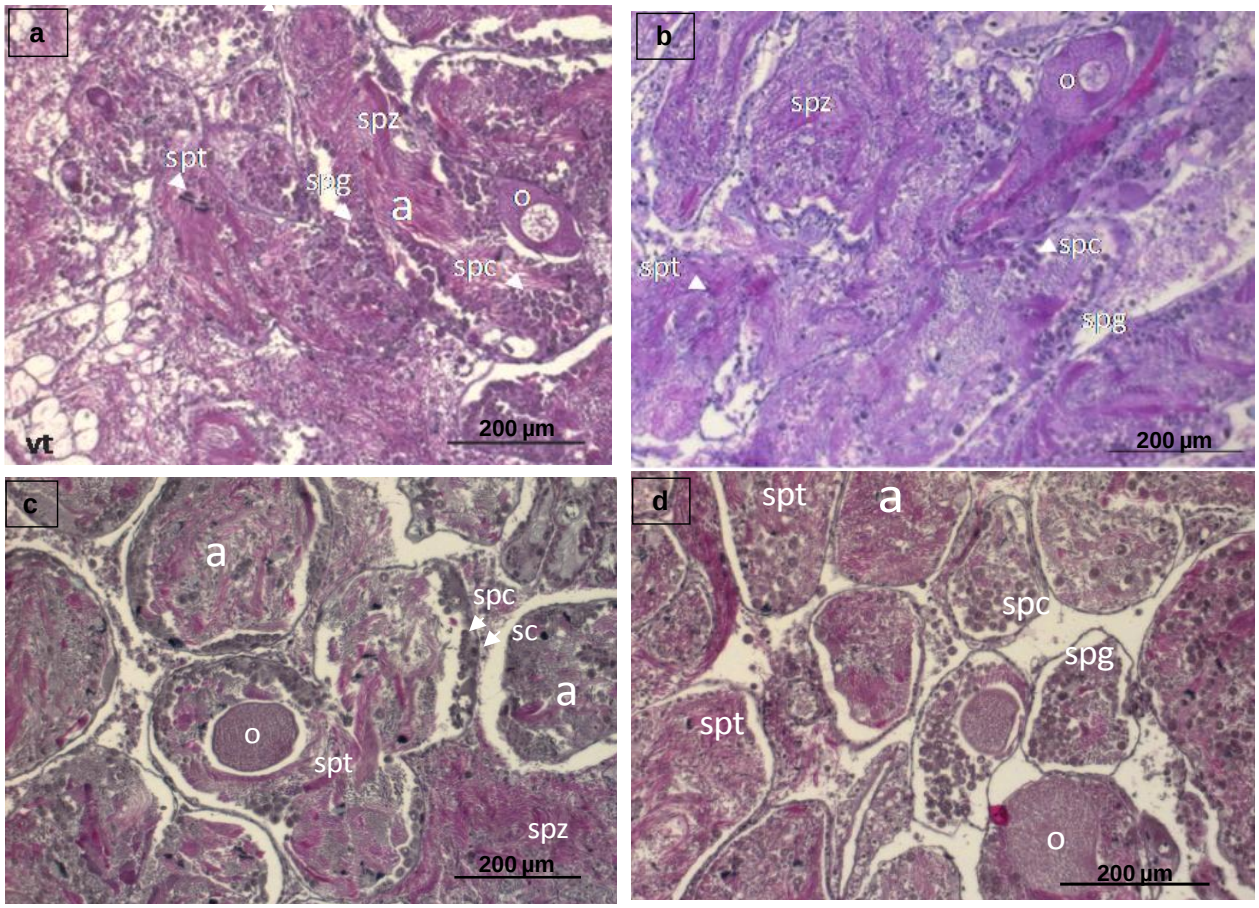


Figure III.3.6. Histology of gonads for (a) control and snails exposed to (b) Bypass® in soil and food with treatment 1 (By1SF), (c) Bypass® in soil and food with treatment 2 (By2SF) and (d) Basta® in soil and food with treatment 2 (Ba2SF). Legend. a, acini; o, oocytes; sc: Sertoli cells; spc, spermatocytes; spg, spermatogonia; spt, spermatids; spz, spermatozoa; vt, vesicular tissue.

III.3.1.3.3 Herbicide residues in snails

Glyphosate concentrations were below the quantification limit for controls, By1SF and By2S whereas they reached 1.2 mg kg^{-1} fw for By2F and 1.1 mg kg^{-1} fw for By2SF corresponding to 6 mg kg^{-1} and 5.5 mg kg^{-1} dw, respectively. Concentrations in AMPA were below the quantification limit for all samples. The BAF were 0.2 for By2F and 0.18 for By2SF.

III.3.1.4 Discussion

III.3.1.4.1 Degradation kinetics of herbicides in soil

The DT50 values determined in this work were similar to those found in the literature. Both products were quickly degraded. Accinelli *et al.* (2004) found an average DT50 of 14.4 days for glyphosate (10.6 days in this work) and 8 days for glufosinate (3.7 days in this work). However, maximal AMPA concentrations were reached after 14 days in their study corresponding to 79% of total glyphosate (Accinelli *et al.* 2004) whereas it reached only 13% after 28 days in our study. The DT50 of glufosinate was close to the values found by Faber *et al.* (1997) and Siimes *et al.* (2006), respectively 4.3 and 7 days. Soil properties and microorganisms may explain variations of the rate and efficiency of degradation between studies. For instance, Accinelli *et al.* (2004) investigating degradation of glyphosate and glufosinate in 2 soils, found that their degradation was quicker in a loamy soil than in a sandy loam soil; they also demonstrated that the degradation of glyphosate did not occur in sterilised soil, thus demonstrating the strong influence of soil microbial activity on this process. According to Tejada (2009), degradation of glyphosate was faster in a clayey soil, like the Bergbieten soil we used, due to the higher enzymatic activity than in a sandy soil. According to their results, Veiga *et al.* (2001) assumed that the time of degradation varied depending on the dose of glyphosate applied to the soil, also shown by our results. Therefore, according to soil type, but also experimental conditions (temperature, humidity), degradation rate could vary greatly, which explained the large range of DT50 values (between 4 and 180 days for glyphosate) reported in the European data (EC 2002b).

Concentrations of glyphosate in soils in the presence of snails were statistically lower than those without snails, suggesting a faster degradation with snails. While the important role of snails in nutrient cycling and organic matter degradation is well known (Dallinger *et al.* 2001), it has never been described that they could enhance herbicide degradation. The mucus secreted by snails has been shown to enhance microbial activity (Brown *et al.* 2000; Dallinger *et al.* 2001), which itself is known to increase the degradation of, for instance, glyphosate (Accinelli *et al.* 2004). Glufosinate concentration in soils with snails was below the quantification limit after 168 days, whereas they were still above for soil without snails. This also suggests that the presence of snails enhanced herbicide degradation.

III.3.1.4.2 Fate in and effects of herbicides on snails and comparison with other soil organisms

After 168 days exposure to glyphosate and glufosinate at concentration until 30 mg kg^{-1}, no effect on mortality or growth was observed either by soil exposure or by food exposure. Few data are available to compare effects of various pesticides in gastropod molluscs and we only found one study reporting effect of an organophosphorous pesticide on *Helix aspersa* (Coeurdassier et al. (2002). At high exposure to dimethoate for 28 days, these authors observed in snails, toxic effects which differed depending on the exposure source ($EC50_{soil}$ = 171.8 mg kg^{-1} and $EC50_{food}$ > 250 mg kg^{-1}).

Toxicity data concerning these herbicides (in plants glufosinate is known inhibit glutamine synthesis and glyphosate to inhibit aromatic amino-acids synthesis) on soil organisms revealed variable toxicity depending on the species, the route of administration and the dose of exposure (Table III.3.3). According to an EC report (1998), the initial (e.g. the day of application) predicted environmental concentration (PEC_i) for glyphosate ranges from 2.9 to 8.1 mg kg^{-1} according to the application rate and the number of applications. On this basis, a low environmental risk was estimated for glyphosate in regards to the data of Table III.3.3 for the soil organisms. Our results, obtained at relevant environmentally exposure concentrations, confirm this low risk for snails, at least for the first generation and without considering reproduction. Comparison of sensitivity between snails and other soil invertebrates living at the soil surface is limited because most of the data concern hard-bodied organisms, which are differently exposed to soil chemicals. However, the data presented in Table III.3.3 showed that following the species and the toxicity parameter considered, glyphosate-based formulations were fairly toxic but according to our results, snails were not very sensitive. Ecotoxicity data for glufosinate are scarce (Table III.3.3) and did not report glufosinate as a very toxic substance, like in our results.

The herbicides studied did not exert any dramatic negative effects on the development and the maturation of the genital apparatus. However, even though not statistically significant, the 43% decrease in the mass of the albumen gland in exposed snails cannot be ignored. This gland was the most strongly affected organ, as already observed by Gomot-de-Vaufleury and Kerhoas (2000) in snails exposed to Cd. Unlike these authors, we observed no effects on snail growth, total fresh mass or shell diameter. Consequently, the effect on the albumen gland is probably not due to a decrease in food consumption or to metabolic disturbance but more likely to an endocrine or neuroendocrine disruption (Gomot de Vaufleury 2001). Glyphosate

was described as an endocrine disrupter in some vertebrates (Richard *et al.* 2005; Soso *et al.* 2007). While this kind of effect did occur in snails, it did not affect gametogenesis which, in the present study, was not disturbed by glyphosate or glufosinate whatever the source of exposure. Thus, for the duration of exposure considered here, the results obtained in this study do not suggest modifications should be made to the European legislation, which does not yet classify glyphosate or glufosinate as endocrine disruptors (EC 2001). The metabolism of glyphosate and glufosinate in animals was partially described in rats in the draft assessment reports (EC 1998; EC 2004). Glyphosate and glufosinate were rapidly but poorly absorbed after oral ingestion (about 5-13% for glufosinate and < 40% for glyphosate). Both substances were rapidly and nearly totally excreted mainly by faeces, and by urine to a lower extent. Metabolisation was described as very limited due to their polar character and the majority was eliminated before being degraded. Less than 1% was found in the total body of rat after 3-7 days (EC 1998; EC 2004). If similar fast metabolisation and/or excretion occurred in snails, this could explain that no effect was observed for continuous exposure to glyphosate and glufosinate by food.

Table III.3.3. Ecotoxicity of glyphosate and glufosinate for organisms in the soil ([a]) and those living on its surface ([b]).

Substance	Organism (species)	Exposure modes (route / concentration / time)	Effects	Reference
Glyphosate	Earthworms ([a]) (*Eisenia fetida*)	8 mg kg^{-1} (corresponding to application of 600 g ha^{-1}) / 28 days	Growth inhibition / No effect on reproduction	(Yasmin et D'Souza 2007)
		Application of 1,440 g ha^{-1} / 28 days	Reproduction inhibition / Behaviour avoidance	(Casabe *et al.* 2007)
		14 days	LC50 > 480 mg kg^{-1}	(EC 2002b)
		8 weeks	NOEC reproduction = 28.79 mg kg^{-1}	(EC 2002b)
	Collembolan ([a]) (*Folsomia candida*)	28 days	EC50 reproduction = 0.33 mg kg^{-1}	(Santos *et al.* 2010)
	Spiders ([b]) (*Pardosa Agricola*)	19.2 g l^{-1} on contact surface / 2 h	No effect on predation, avoidance and speed of locomotion	(Michalková et Pekár 2009)
	Beetles ([b]) (*Poecilus cupreus*)	19.2 g l^{-1} on contact surface / 2 h	No effect on predation but effect on avoidance and decrease of locomotion speed	(Michalková et Pekár 2009)
	Isopods ([b]) (*Porcellionides pruinosus*)	Contact with soil surface / 48 h	EC50 avoidance = 39.7 mg kg^{-1}	(Santos *et al.* 2010)
	Libelula ([b]) (*Chrysoperla externa*)	Ingestion of prey dipped in a solution at 192 mg l^{-1} / 48 h	Decrease of demography parameters	(Schneider *et al.* 2009)
Glufosinate	Earthworms ([a]) (*Eisenia fetida*)	14 days	LC50 > 1000 mg kg^{-1}	(EC 2004)
	Collembolan ([b]) (*Paronychiurus kimi*)	7 weeks / 50 mg kg^{-1}	Effect on survival / EC50 reproduction = 0.039 mg kg^{-1}	(Kang *et al.* 2001)
	Epigeous arthropods ([b])	Field applications / 3-year field study	No effect on ecology	(Volkmar *et al.* 2003)

Although no toxic effects were found in snails in this work, chemical analyses showed that these organisms are able to accumulate glyphosate at high exposure concentrations. While accumulation of metals by snails is well known and described in the literature (Dallinger *et al.* 2001; Beeby et Richmond 2002; Scheifler *et al.* 2002; de Vaufleury *et al.* 2006; Hispard *et al.* 2007), few studies have reported such phenomenon for pesticides. Coeurdassier *et al.* (2001) found a low accumulation of dimethoate in *H. aspersa* tissues exposed to artificially contaminated food and Schuytema *et al.* (1994) did not find atrazine or azinphos-methyl bioaccumulation in the same species, probably in relation with the degradation of chemicals in tissues and/or to a low sensitivity of the analytical methods. Glyphosate accumulation was not expected due to the chemical characteristics of the molecule, such as for instance its high solubility in water (10 500 mg l^{-1}) and its low K_{ow} (log K_{ow} = -3.1). To our knowledge, only two papers report glyphosate accumulation (using ^{14}C labeled glyphosate) in fish tissues (Wang *et al.* 1994) and aquatic worms (Contardo-Jara *et al.* 2009). Contardo-Jara *et al.* (2009) measured internal concentration up to 8 mg kg^{-1} fw in *Lumbriculus variegatus* exposed to 5 mg l^{-1} of Roundup® and a maximal bioconcentration factor of 5.9. They hypothesized that the uptake was facilitated by polyoxyethylene amine, the adjuvant used in the commercial Roundup® formulation. We found a BAF of 0.02 which is difficult to compare with BCF of previous studies as sources and routes of exposure are different. In our work, the commercial glyphosate based-herbicide was Bypass® and, according to its material safety data sheets (MSDS), no adjuvant is contained in the solution marketed. The present work is the first that showed the occurrence of glyphosate in animal tissues in the form of the parent substance and not on the basis of a measurement of radioactivity which could take into account degradation products in the concentration of residues analyzed. The presence of glyphosate in snails fed contaminated food and not in snails just exposed to soil cannot be interpreted as evidence that glyphosate was accumulated only by ingestion of food. Indeed, when snails were exposed by food, they ingested high and constant glyphosate loads 3 times a week, whereas in soil exposure, they were exposed to pesticides mainly during the first 28 days. In rats (EC, 1998) a small amount of the glyphosate was metabolised to yield AMPA; similar observations were found in snails, where AMPA was not detected, even at the highest exposure mode (By2SF).

III.3.1.5 Conclusion

Using the recommended agricultural doses in soil, we showed that snails were exposed to very low concentrations from 56 days after application for glyphosate and 14 days for

glufosinate. In these conditions, no effect was found on survival, growth, development of the genital apparatus or gametogenesis of *H. aspersa*. At a 10-fold higher concentration, accumulation of glyphosate occurred in snail tissues exposed to constant loads of herbicide in food, although no damaging effects were found in snails. Glyphosate and glufosinate tended to reduce the growth of the albumen gland although it was not significant in relation to controls.

The chronic toxicity bioassay presented in this work could be used for hazard assessment of chemicals in an environmentally relevant long-term exposure scenario. Such assessments are often lacking in Marketing Authorizations, but would provide useful data on the fate and effects of substances.

Acknowledgements

This work was financially supported by grants from the ADEME (« Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie »), the « Conseil Régional de Franche-Comté », the ERICHE (« Evaluer et Réduire l'Impact de la Chimie sur l'Environnement ») network of the CNRS and the EC2CO (« Ecosphère Continentale et Côtière ») interdisciplinary program of the CNRS. We also thank Christiane Lovy for her technical help.

III.3.1.6 Résultats complémentaires

Dans cette étude, nous avons dosé le glyphosate et le glufosinate dans le sol et la nourriture afin de disposer des concentrations d'exposition mesurées. N'ayant pas développé nos propres méthodes de dosage de ces deux herbicides dans des farines de type végétal, les échantillons d'aliment pour escargots ont été envoyés à Eurofins. Ce laboratoire avait en effet mis au point des techniques d'extraction et d'analyse de ces deux herbicides dans des matrices végétales. Dans la section III.3.1.3.1, nous avons indiqué que les concentrations en glyphosate n'ont pas pu être déterminées du fait d'un manque de répétabilité. En effet, les premiers résultats reçus pour trois échantillons dont les concentrations nominales étaient de 3 mg kg^{-1} (ech1 et ech3) et 30 mg kg^{-1} (ech2) indiquaient des concentrations mesurées inférieures aux limites de quantification (LQ, 5 mg kg^{-1} pour le glyphosate et 10 mg kg^{-1} pour l'AMPA). Après demande de vérification (notamment pour l'échantillon 3) auprès du service technique d'Eurofins, les seconds résultats reçus indiquaient cette fois des concentrations de 14 mg kg^{-1} (ech1), 8 mg kg^{-1} (ech3) et 41 mg kg^{-1} (ech2). Ces résultats étant largement supérieurs aux concentrations nominales et n'étant pas répétables, nous avons choisi de ne pas les faire

figurer dans l'article. Par la suite, une méthode d'analyse dans ce type de matrice devra être développée afin de pouvoir déterminer l'exposition réelle des escargots nourris avec de l'aliment contaminé par du glyphosate.

III.3.2 Effets du glyphosate sur l'ensemble du cycle de vie (de l'incubation à la ponte) de l'escargot

III.3.2.1 Introduction

Cette étude s'inscrit dans la continuité de l'expérience présentée précédemment (cf. section III.3.1) et vise à déterminer les effets sur la survie, la croissance et la reproduction d'une exposition chronique au glyphosate. Dans une première étude (cf. section III.3.1.) menée sur une durée d'exposition de 6 mois, il n'a pas été mis en évidence d'effet sur la survie et la croissance des escargots exposés au Bypass® depuis leur éclosion jusqu'au début de la maturation sexuelle. Une seconde expérience, permettant de considérer les effets du glyphosate de l'incubation des œufs jusqu'à la reproduction des adultes (fertilité et fécondité) a été conduite, cette fois sur une durée d'exposition de 8 mois.

Le glyphosate est inscrit sur la liste des substances suspectées de perturbations endocriniennes (PE), non pas parce que ces perturbations ont été démontrées et sont actuellement reconnues, mais parce que les données scientifiques font défaut pour pouvoir officiellement le classer comme PE ou non (EC 2001). Pourtant certaines études ont démontré son caractère PE, que ce soit chez l'animal (poisson chat, Soso *et al.* 2007) ou sur des cellules humaines (Richard *et al.* 2005). Forget-Leray *et al.* (2005) soulignent l'importance des études sur l'ensemble du cycle de vie à des concentrations environnementales pour mettre en évidence des effets PE, notamment sur la reproduction, spécialement quand les organismes sont exposés depuis le stade embryonnaire. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a clairement mis en évidence un effet sur la reproduction chez des organismes terrestres, suite à une exposition, pendant le développement embryonnaire, au glyphosate.

La plupart des bioessais d'écotoxicité nécessitent de mesurer les effets, d'une part sur des organismes non exposés (témoins négatifs) et d'autre part sur des organismes exposés à une substance de référence (témoins positifs) dont on connaît les effets sur le paramètre mesuré. Par exemple, le Cd est une substance de référence utilisée pour vérifier la sensibilité du bioessai d'inhibition de croissance d'escargots juvéniles durant 28 jours (ISO 15952:2006). Jusqu'à présent, on ne connaît pas de substance ayant cette propriété pour des bioessais chroniques et pour l'inhibition de la reproduction. Les seules données disponibles portent sur le Cd qui inhibe la fécondité et la prise de nourriture chez des escargots ayant atteint la taille adulte, exposés à une forte concentration dans la nourriture (180 mg kg^{-1}) durant 2,5 mois (Gomot de Vaufleury et Kerhoas 2000). D'autre part Gimbert *et al.* (2008) ont montré que la

ponte d'escargots exposés pendant leur croissance durant 3 mois à 20 mg Cd kg^{-1} dans le sol n'est pas perturbée. Cependant, une exposition à 100 mg kg^{-1} dans un sol artificiellement contaminé entraîne un retard dans l'apparition du pic de pontes (Gimbert *et al.* 2008).

Les objectifs de ce travail sont tout d'abord de déterminer si la survie, la croissance et la reproduction d'escargots sont perturbées par une exposition prolongée et précoce à un herbicide dès l'embryogénèse. La recherche d'un tel effet différé a été conduite en exposant des escargots à une formulation commerciale de glyphosate, le Bypass®, pendant et/ou après le stade embryonnaire et ce, jusqu'à la reproduction. Nous avons également cherché une substance de référence, nécessaire pour la proposition d'un bioessai de toxicité. Un mélange de deux composés organiques a été expérimenté : il contient du Reglone®, herbicide à base de diquat, et de l'Agral® 90, adjuvant à base de nonylphénols polyéthoxylés (NP). Ces deux composés avaient occasionné une inhibition de la ponte et de la spermatogénèse chez un mollusque gastéropode hermaphrodite aquatique : la limnée *Lymnaea stagnalis* (de Vaufleury et Coeurdassier 2007). Les modalités d'exposition des escargots et des limnées au milieu environnant sont très différentes (la limnée est en contact permanent avec le milieu liquide) et il n'est pas possible d'extrapoler les effets d'une espèce à l'autre. Toutefois, les résultats observés chez les limnées constituent la seule expérience de référence avec ce type de substances chimiques. Les concentrations utilisées pour ce mélange dans notre expérimentation ont été déterminées à partir des résultats d'EC50 obtenues du test d'embryotoxicité en phase liquide (cf. Chapitre 2, section III.2.1), tout en étant représentatives des concentrations appliquées au champ.

III.3.2.2 Matériels et méthodes

III.3.2.2.1 Modalités d'exposition

Les différentes modalités d'exposition sont présentées dans le Tableau III.3.4. Le glyphosate a été utilisé sous sa formulation commerciale Bypass®, mélangé dans du sol de Bergbieten pour obtenir une concentration de 3 mg kg^{-1} de glyphosate, correspondant à la PEC, déterminée selon la dose utilisée au champ, la densité du sol et considérant une distribution verticale de la substance dans les 5 premiers cm du sol. Le témoin positif est constitué par le mélange Reglone® et Agral® 90 (mélange R-A), mélangé à du sol de Bergbieten pour obtenir une concentration de 1,3 mg kg^{-1} de diquat et 0,6 mg kg^{-1} de NP, correspondant à la EC50 du mélange déterminée sur les embryons en phase liquide (Tableau

III.2.2). Les escargots exposés au Bypass® et au mélange R-A après l'éclosion le sont par le sol et par la nourriture à la même concentration (Tableau III.3.4). Cependant, la nourriture (gardée au congélateur) est décongelée et renouvelée dans les boîtes tous les 2-3 jours tandis que le sol d'exposition n'est pas renouvelé au cours de l'expérience. Le système d'exposition général de la phase embryonnaire jusqu'à la reproduction est décrit dans les sections II.1.3.1 et II.1.3.2.

Tableau III.3.4. Modalités d'exposition pour l'étude des effets du glyphosate sur l'ensemble du cycle de vie de l'escargot.

Phase embryonnaire		**Phase de croissance et reproduction**		**Nomenclature**
Substrat	**Nb de pontes = réplicats**	**Substrat**	**Nb de boîtes = réplicats**	
Sol Témoin	10 (A-J)	Sol Témoin	10	Te1 à Te10
Sol Témoin		Sol Bypass[1]	10	TeByp1 à TeByp10
Sol Bypass		Sol Bypass[1]	10	Byp1 à Byp10
Sol Bypass		Sol Témoin	10	BypTe1 à BypTe10
Sol mélange R-A	5 (K-O)	Sol mélange R-A[1]	5	Te+1 à Te+5

[1] : l'exposition se fait également avec de la nourriture contaminée à la même concentration.

III.3.2.2.2 Phase de développement embryonnaire

Les modalités Te, TeByp, Byp et BypTe ont débuté le 16 juillet 2009 : 10 pontes (de A à J) ont été sélectionnées et 40 œufs de chaque ont été prélevés afin d'être répartis dans des pots par 20, contenant du sol témoin ou contaminé au Bypass® (Figure III.3.7).

La modalité Te+ a débuté le 4 août 2009 : 5 pontes (de K à 0) ont été sélectionnées et 40 œufs de chaque ont été prélevés afin d'être répartis dans des pots par 20, contenant du sol témoin ou contaminé au mélange R-A.

Figure III.3.7. Dispositif d'incubation des œufs des 10 pontes (témoins papier = boîtes de Pétri au 1er plan, témoins sol = pots en arrière plan et Bypass® sol = pots de la rangée du milieu).

Pour toutes les modalités, à la fin de l'incubation, le pourcentage d'éclosion a été relevé dans chaque pot. Chacun des 10 réplicats suivis ensuite pendant les phases de croissance et de reproduction, comportait 4 escargots provenant de pots différents (afin d'éviter de former des groupes d'escargots puis des couples provenant d'une même ponte), soit par exemple, Te1=ABCD, Te2=BCDE, Byp1=ABCD, Te+1=KLMN, Te+2=LMNO, etc.

III.3.2.2.3 Phase de croissance

Après 28 jours de croissance, les deux plus petits escargots ont été retirés de chaque boîte pour ne garder plus qu'un seul couple par boîte. Les escargots ont été pesés et le diamètre de leur coquille mesuré tous les 28 jours afin de suivre l'évolution de leur croissance. Le nombre de morts a été comptabilisé dans chaque modalité.

III.3.2.2.4 Phase de reproduction

Lorsque les premiers accouplements ont été observés, des supports de ponte ont été introduits dans les boîtes. Pour chaque ponte, le nombre d'œufs a été comptabilisé et la ponte pesée. Les œufs incubaient en boîtes de Pétri sur du papier humidifié non contaminé. Le nombre d'éclos a été déterminé ainsi que le pourcentage d'éclosion. La fécondité et la fertilité ont été déterminées comme le nombre total d'œufs pondus et le nombre total d'œufs éclos par escargot par boîte. Une moyenne a ensuite été réalisée sur le nombre total de boîtes par modalité (5 ou 10).

A la fin de l'exposition (240 jours), 10 escargots par modalité, soit 5 boîtes sur 10, ont été disséqués afin d'observer le tractus génital et réaliser des coupes histologiques sur les gonades.

III.3.2.2.5 Analyses statistiques

Le pourcentage d'éclosion des œufs (TeA-J *versus* BypA-J et TeK-O *versus* Te+K-O) a été analysé par un test de rang de Wilcoxon. Les pourcentages de mortalité et d'individus bordés dans chaque modalité ont été comparés par un modèle linéaire généralisé de Poisson. Les différences de masses, de diamètre, de teneur en eau (TE), du nombre de pontes par escargot, de fécondité et de fertilité entre les différentes modalités ont été déterminées par un modèle linéaire à effet mixte (LME). Enfin, le pourcentage d'anomalies (appareil évaginé et inactivité

des escargots) observées en phases de croissance et de reproduction lors de chaque nourrissage entre chaque modalité a été comparé par un test de Friedman. Quand des différences significatives ($p<0,05$) ont été trouvées, un test de comparaison multiple post-hoc a été réalisé pour différencier les groupes. Les analyses ont été réalisées sous R (2.9.2) avec les packages *pgirmess* (http://perso.orange.fr/giraudoux) et *nlme* (R Development Core Team, 2010).

III.3.2.3 Résultats

La concentration de glyphosate dans le sol en début d'expérience a été mesurée selon la méthode décrite dans le Chapitre 1 (cf. section III.1.1) et un échantillon de nourriture a été envoyé à un laboratoire privé (Eurofins). Les résultats indiquent des concentrations de 2,8 mg kg^{-1} dans le sol mais ceux pour la nourriture ne sont pas présentés du fait d'un manque de répétabilité (cf. Chapitre 3, section III.3.1.6).

III.3.2.3.1 Développement embryonnaire

Le Bypass® et le mélange R-A aux concentrations choisies n'ont pas d'effet sur le pourcentage d'éclosion des œufs d'escargots exposés en phase solide (Tableau III.3.5).

Tableau III.3.5. Pourcentages d'éclosion des œufs non exposés (TeA à TeO) ou exposés à du sol contaminé au Bypass® (BypA à BypJ) ou au mélange R-A (Te+K à Te+O) déterminés après 17 jours d'incubation.

Œufs sur sol témoin	% d'éclosion	Œufs sur sol contaminé	% d'éclosion
TeA	65	BypA	75
TeB	95	BypB	100
TeC	85	BypC	85
TeD	75	BypD	75
TeE	70	BypE	75
TeF	70	BypF	75
TeG	80	BypG	70
TeH	50	BypH	65
TeI	80	BypI	65
TeJ	100	BypJ	100
TeK	70	Te+K	65
TeL	50	Te+L	55
TeM	60	Te+M	30
TeN	70	Te+N	55
TeO	35	Te+O	45

III.3.2.3.2 Mortalité et croissance

L'exposition pendant 240 jours aux différents traitements ne provoque pas plus de mortalité que celle constatée dans le groupe témoin (Tableau III.3.6).

Tableau III.3.6. Pourcentage de mortalité après 240 jours d'exposition post-éclosion pour les différents traitements.

Traitement	Mortalité (%)
Te	10 ± 21,1
BypTe	15 ± 24,2
Byp	15 ± 24,2
TeByp	15 ± 24,2
Te+	20 ± 24,5

L'exposition aux différents traitements n'affecte pas la croissance (masse totale et diamètre de coquille) des escargots, sauf ponctuellement et de façon positive, après 56 jours d'exposition (t56) pour les Te+ (Figures III.3.8 et III.3.9).

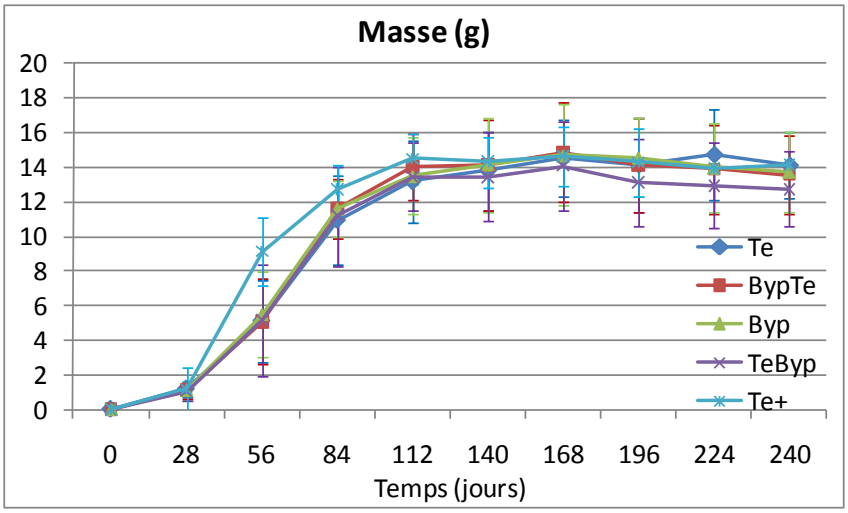


Figure III.3.8. Evolution de la masse fraîche (moyenne ± écart type) au cours des 240 jours d'exposition pour les 5 modalités.

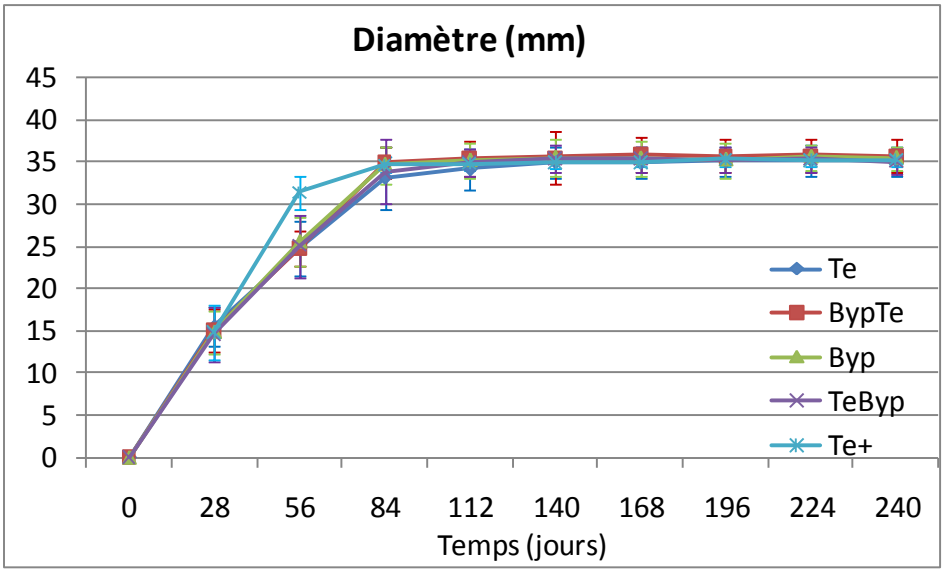


Figure III.3.9. Evolution du diamètre de coquille (moyenne ± écart type) au cours des 240 jours d'exposition pour les 5 modalités.

Après 240 jours d'exposition, le pourcentage d'adultes (individus bordés, cf. section II.1.1) n'est pas affecté par les différents traitements. Cependant, il y a des différences nettes dans la formation de la coquille, les Te+ s'étant bordés beaucoup plus rapidement que les escargots exposés aux autres traitements ou que les témoins. Toutefois ces différences s'atténuent à partir de 112 jours. La proportion maximale d'individus bordés est atteinte dès le 84ème jour pour les Te+, dès le 112ème jour pour les Byp et dès le 168ème jour pour les Te, TeByp et BypTe (Figure III.3.10). Elle est dans tous les cas supérieure ou égale à 95%.

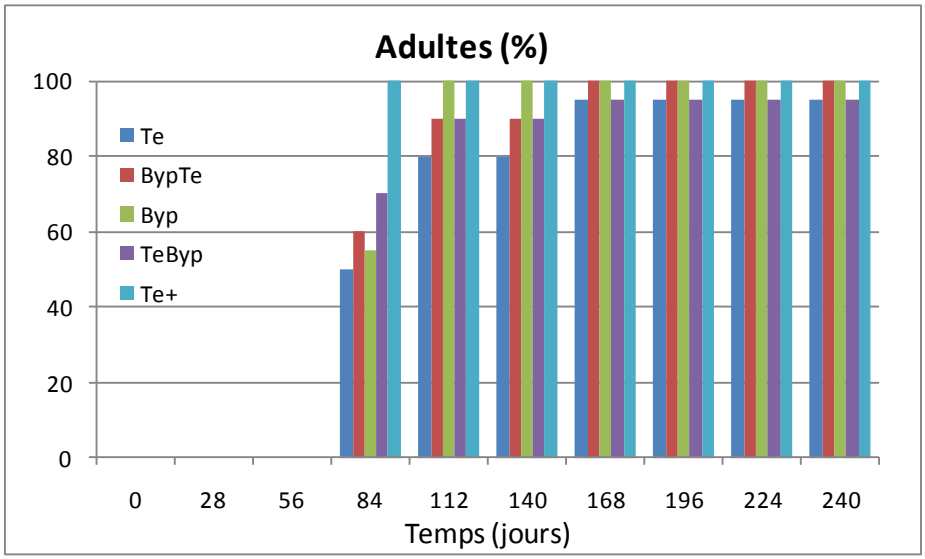


Figure III.3.10. Pourcentage d'escargots bordés pour les différents traitements après 240 jours d'exposition.

III.3.2.3.3 Reproduction

Le nombre total de pontes par escargot après 240 jours d'exposition n'est pas significativement affecté par les traitements (Figure III.3.11). Cependant, lorsque le temps est pris en compte dans l'analyse statistique (modèles linéaires à effets mixtes avec les variables explicatives « date » et « traitements »), le nombre de pontes des Te+ est significativement inférieur aux témoins ainsi qu'aux TeByp (Figure III.3.12).

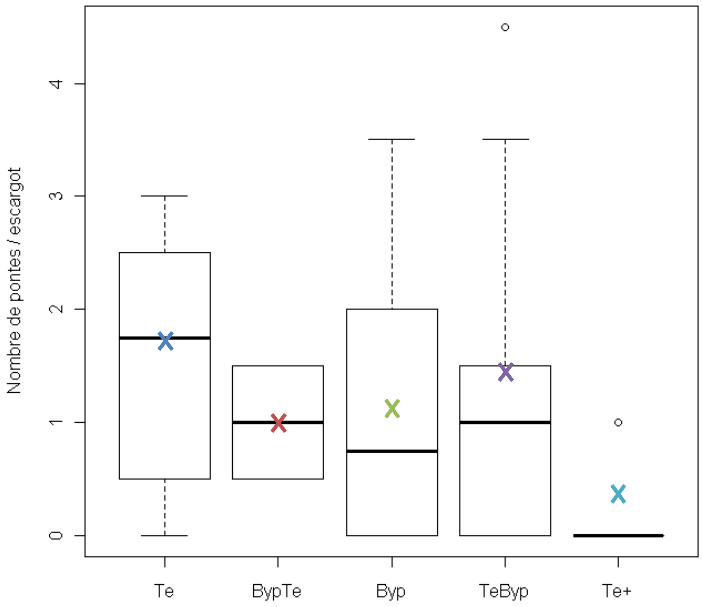


Figure III.3.11. Nombre de pontes par escargot en fin d'expérience (t240) pour chaque traitement. Les boîtes à moustache représentent la médiane et les quartiles et les croix, les moyennes.

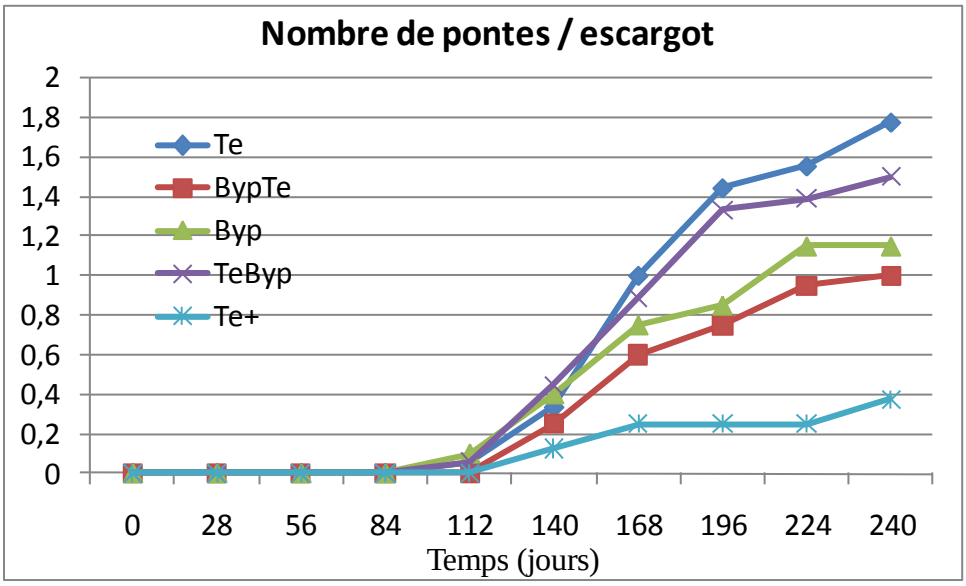


Figure III.3.12. Cinétique du nombre de pontes par escargot pour chaque traitement.

Bien que les Te+ aient été les premiers bordés (Figure III.3.10), ce sont les derniers à avoir commencé à pondre (1ère ponte à 132 jours *versus* 105 jours pour les Byp) et tandis que les escargots exposés aux autres traitements ont pondu de façon assez soutenue durant les 2-3 premiers mois du cycle de ponte, les Te+ ont très peu pondu (Figure III.3.12).

Les analyses statistiques ne détectent pas de différence de fécondité ni de fertilité entre les traitements. D'après le Tableau III.3.7, les plus fortes valeurs de fécondité et de fertilité sont obtenues pour les TeByp. Les témoins semblent également plus fertiles que les autres traitements. Les pourcentages de couples non féconds (n'ayant pas pondu) et de couples stériles (n'ayant pas fait d'éclos) sont les suivants : Te = 11% et 11% ; BypTe = 0% et 30% ; Byp = 40% et 70% ; TeByp = 22% et 22% ; Te+ = 50% et 75%.

Tableau III.3.7. Paramètres mesurant la reproduction chez les escargots après 240 jours d'exposition.

Traitement	Nb d'escargots suivis en reproduction	Nb total de pontes	Moyenne ± *écart type*				
			Nombre d'œufs par ponte	Masse œuf (mg)	Fécondité	% éclosion	Fertilité
Te*	18	32	69,1 ± *64,6*	41 ± *11*	122,8 ± *112,7*	39,2 ± *41,7*	89,6 ± *109,0*
BypTe	20	20	124,4 ± *71,3*	34 ± *8*	124,4 ± *82,8*	42,5 ± *35,7*	65,9 ± *55,6*
Byp	20	23	99,9 ± *60,4*	37 ± *10*	114,9 ± *164,9*	36 ± *37,4*	59,4 ± *104,1*
TeByp*	18	27	135,7 ± *29,3*	35 ± *5*	196 ± *177,2*	59,2 ± *31,4*	120,2 ± *115,1*
Te+*	8	3	45 ± *61,7*	41 ± *2*	16,8 ± *27,8*	32,6 ± *44,7*	12,4 ± *21,4*

* : Il y a eu un mort avant la phase de reproduction dans chacune de ces modalités donc le nombre de couples suivi en reproduction est réduit.

Des pontes « anormales », soit très petites (<20 œufs), soit contenant des œufs d'aspect inhabituel (de couleur rosée, ou en chapelets ou sans coque calcaire) ont été observées. Bien que les témoins soient les escargots qui aient le plus pondu (Tableau III.3.7), ce sont également eux qui présentent le nombre le plus important de petites pontes (15 *vs* 3 pour BypTe, 4 pour Byp, 0 pour TeByp et 2 pour Te+). Ce phénomène ne semble pas lié à la fréquence des pontes car les TeByp qui ont également beaucoup pondu n'ont pas produit ce type de pontes. Quand elles ne sont pas prises en compte dans le jeu de données, le pourcentage d'éclosion chez les témoins atteint 71,2%, pourcentage moyen habituellement observé dans notre élevage des animaux non exposés destinés à la reproduction. Que le nombre de pontes anormales soit pris en compte ou non, la fertilité la plus élevée est observée pour les Te et les TeByp, correspondant aux escargots non exposés durant la phase embryonnaire.

D'autres observations ont été faites lors de chaque nettoyage, 3 fois par semaine. Elles sont décrites ci-après et présentées dans le Tableau III.3.8 pour chaque traitement :

- Organes d'accouplement (pénis et vagin) de l'appareil génital partiellement évaginés : les Figures III.3.13 et III.3.14 illustrent cette anomalie. En temps normal, l'appareil génital n'est pas visible et n'est que partiellement externalisé lors de l'accouplement (Figure II.5). Chez certains escargots, il semble que cette anomalie soit persistante et qu'en permanence, les 5 à 10 premiers mm du tractus génital restent évaginés.
- Escargot inactif : l'escargot se fixe contre la paroi de la boîte, ne se déplace plus, forme un épiphragme de couleur rose comme s'il entrait en dormance (Figure III.3.15) et arrête donc de s'alimenter.
- Nid sans ponte : l'escargot se met en position de ponte sur le pot de ponte, creuse le nid mais ne pond aucun œuf.

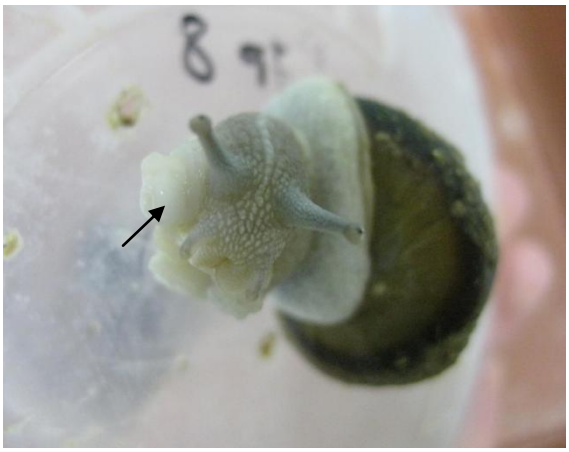


Figure III.3.13. Appareil génital partiellement évaginé chez Byp8.

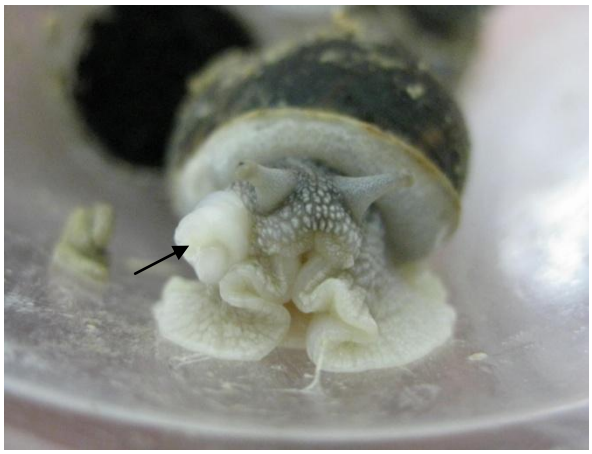


Figure III.3.14. Appareil génital partiellement évaginé chez TeByp6.

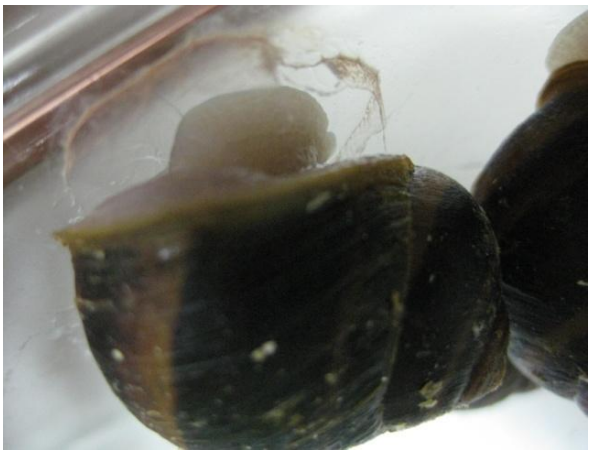


Figure III.3.15. Epiphragme rosé sécrété par l'escargot pour se fixer contre la paroi et entrer en dormance.

Tableau III.3.8. Observations d'anomalies de l'appareil génital et de comportement.

Traitement	Appareil génital évaginé (%) [a]	Escargot inactif (%) [b]	Nid sans ponte
Te	3,1 ± *4,7*	2,8 ± *4,0*	5
BypTe	10,7 ± *7,7*	2,8 ± *3,7*	4
Byp	6,7 ± *6,9*	1,5 ± *2,3*	5
TeByp	5,1 ± *7,2*	1,3 ± *3,2*	7
Te+	18,4 ± *12,6*	3,2 ± *6,9*	1

[a] En pourcentage moyen d'escargots présentant cette anomalie à chaque nettoyage (à partir du moment où la maturité sexuelle a été atteinte).

[b] En pourcentage moyen d'escargots présentant cette anomalie à chaque nettoyage (à partir du moment où la 1ère observation a été réalisée).

Les anomalies concernant l'appareil génital évaginé sont plus fréquentes chez les escargots exposés durant la phase embryonnaire (Tableau III.3.8), ce qui est confirmé par les analyses statistiques (Tableau III.3.9). Les nids sans ponte sont plus fréquents chez les escargots exposés au Bypass® post-incubation (Tableau III.3.8). Enfin, concernant l'observation des escargots inactifs, cela semble plus fréquent chez les Te+ bien qu'il n'y ait aucune différence significative entre les groupes.

Tableau III.3.9. Différences significatives de la fréquence de l'appareil évaginé (*) entre les différentes modalités.

	Te	BypTe	Byp	TeByp	Te+
Te		*			*
BypTe			*	*	
Byp					*
TeByp					*

Pour ce qui concerne l'état de l'appareil reproducteur en fin d'expérimentation, le Tableau III.3.10 présente les données obtenues sur les escargots disséqués.

Tableau III.3.10. Masses fraîches (en g) des divers organes de l'appareil reproducteur des escargots exposés (Bypass® et mélange R-A) ou non en fin d'expérience (240 jours) (moyenne ± *écart type*, n = 10 ou 8 pour les Te+).

Traite -ment	MF totale	Diamètre (mm)	MS coquille	MF pied	TE pied	MF viscères	TE viscères	MF reste du tractus	MF glande à albumen	MF gonade
Te	11,87 ± *1,73*	35,20 *± 1,52*	2,30 *± 0,36*	2,60 *± 0,47*	80,2 *±2,5*	1,65 *± 0,33*	69,9 *± 2,8*	1,30 *± 0,46*	1,25 *± 0,66*	0,022 ± *0,009*
BypTe	11,51 ± *1,41*	35,00 *± 1,85*	2,26 *± 0,28*	2,96 *± 0,44*	81,2 ± *2*	1,73 *± 0,36*	70,7 *± 2,7*	1,20 *± 0,18*	0,98 *± 0,34*	0,023 ± *0,011*
Byp	11,70 ± *1,75*	35,20 *± 1,65*	2,15 *± 0,45*	2,78 *± 0,43*	81,1 ± *1,7*	1,76 *± 0,28*	69,5 *± 2,8*	1,25 *± 0,35*	1,14 *± 0,63*	0,023 ± *0,011*
TeByp	10,91 ± *1,31*	34,43 *± 1,40*	2,24 *± 0,37*	2,61 *± 0,43*	81,2 ± *0,9*	1,74 *± 0,42*	70 *± 3,3*	0,96 *± 0,19*	0,77 *± 0,43*	0,029 ± *0,013*
Te+	12,87 ± *1,02*	35,40 *± 0,88*	2,30 *± 0,35*	3,08 *± 0,32*	81,8 ± *1,6*	2,02 *± 0,33*	71,2 *± 2,8*	1,32 *± 0,33*	1,40 ± *0,58*	0,039 ± *0,021*

MF, masse fraîche ; TE, teneur en eau (en %).

Les différents traitements n'affectent pas l'état de l'appareil reproducteur, quel que soit le paramètre testé. Comme cela peut être observé sur la Figure III.3.16, les escargots disséqués de chaque modalité présentent une certaine hétérogénéité. On remarque cependant une différence de couleur entre les glandes à albumen des Te et celles des Te+. Les Te ont des glandes à albumen jaunes, tout comme celles des autres modalités (Byp, TeByp et BypTe) tandis que celles des Te+ sont blanchâtres et semblent légèrement plus grosses (Tableau III.3.10).

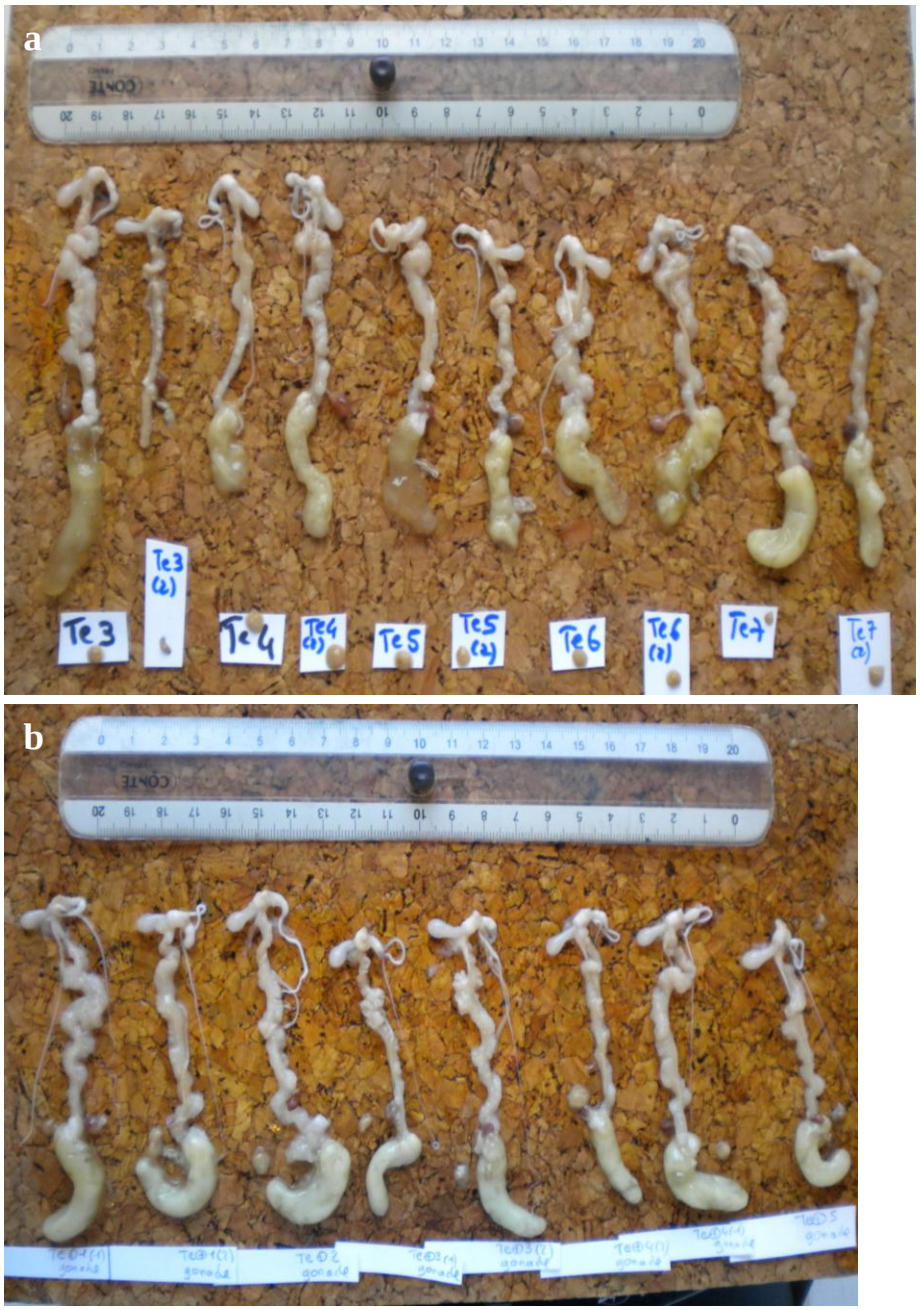


Figure III.3.16. Appareils génitaux (a) de 10 escargots Te et (b) de 8 escargots Te+.

III.3.2.3.4 Histologie des gonades

L'examen des coupes histologiques de gonades ne révèle pas de différences fondamentales dans la maturation des gamètes entre les différents traitements. Que ce soit chez les témoins ou les escargots les plus contaminés (Byp ou Te+), les acini des gonades contiennent des cellules de la lignée mâle à tous les stades (spermatogonies, spermatocytes, spermatides puis spermatozoïdes). La plupart du temps, on observe également des cellules de la lignée femelle à différents stades (voir les différentes tailles d'ovocytes chez Te 5-2, Figure III.3.17 ; Byp 7-

1, Figure III.3.18 et Te+ 3-1, Figure III.3.19). Cependant, certains acini des ovotestis d'escargots Te+ (Te+5-1 et Te+3-1, Figure III.3.19) ont un aspect désorganisé par rapport à ceux des témoins (Te7-2, Figure III.3.17).

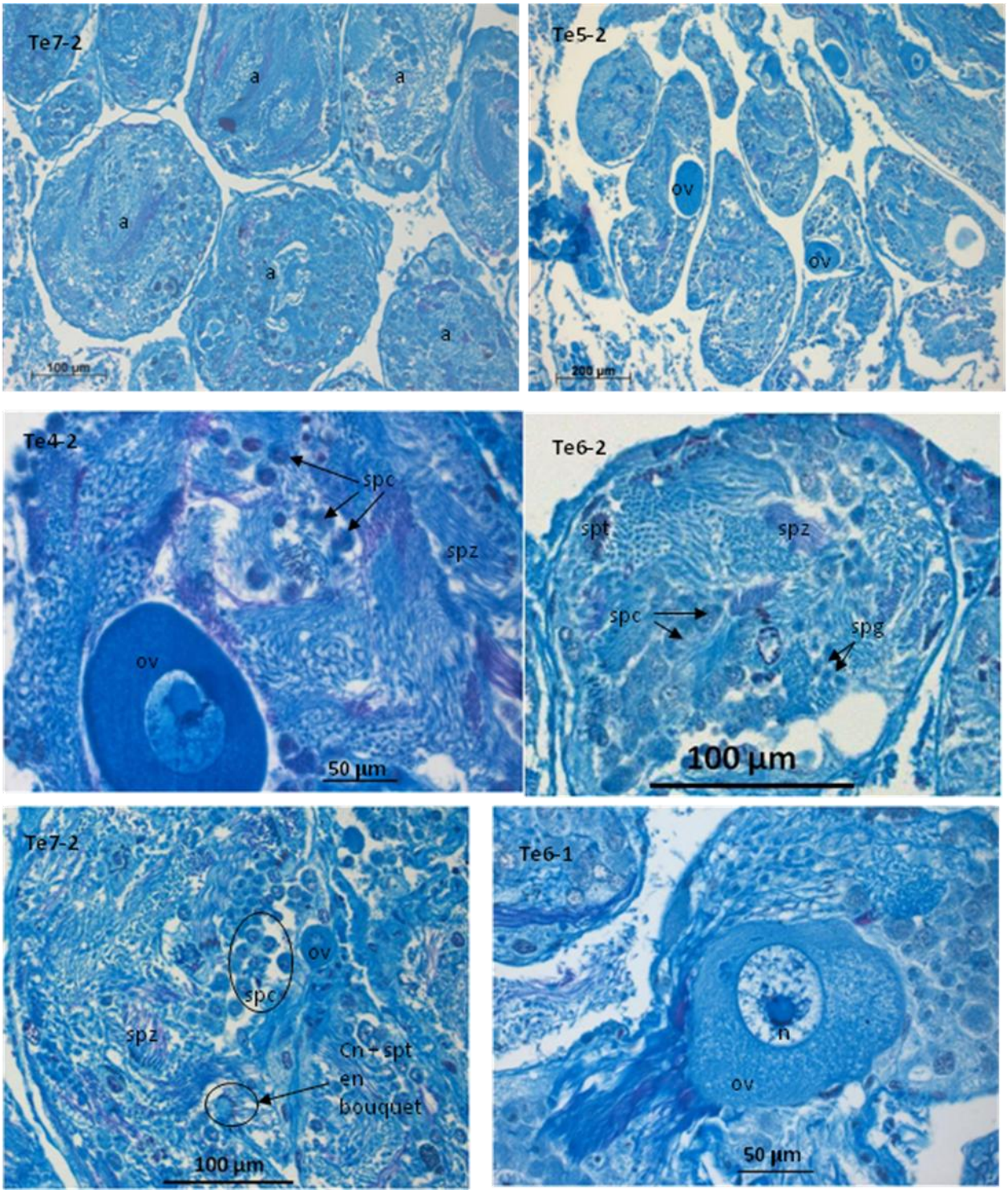


Figure III.3.17. Gonades d'escargots non exposés (Te) âgés de 240 jours. Légendes : a, acinus ; cn, cellule nourricière ; n, noyau ; ov, ovocyte ; spc, spermatocyte ; spg, spermatogonie ; spt, spermatide ; spz, spermatozoïde.

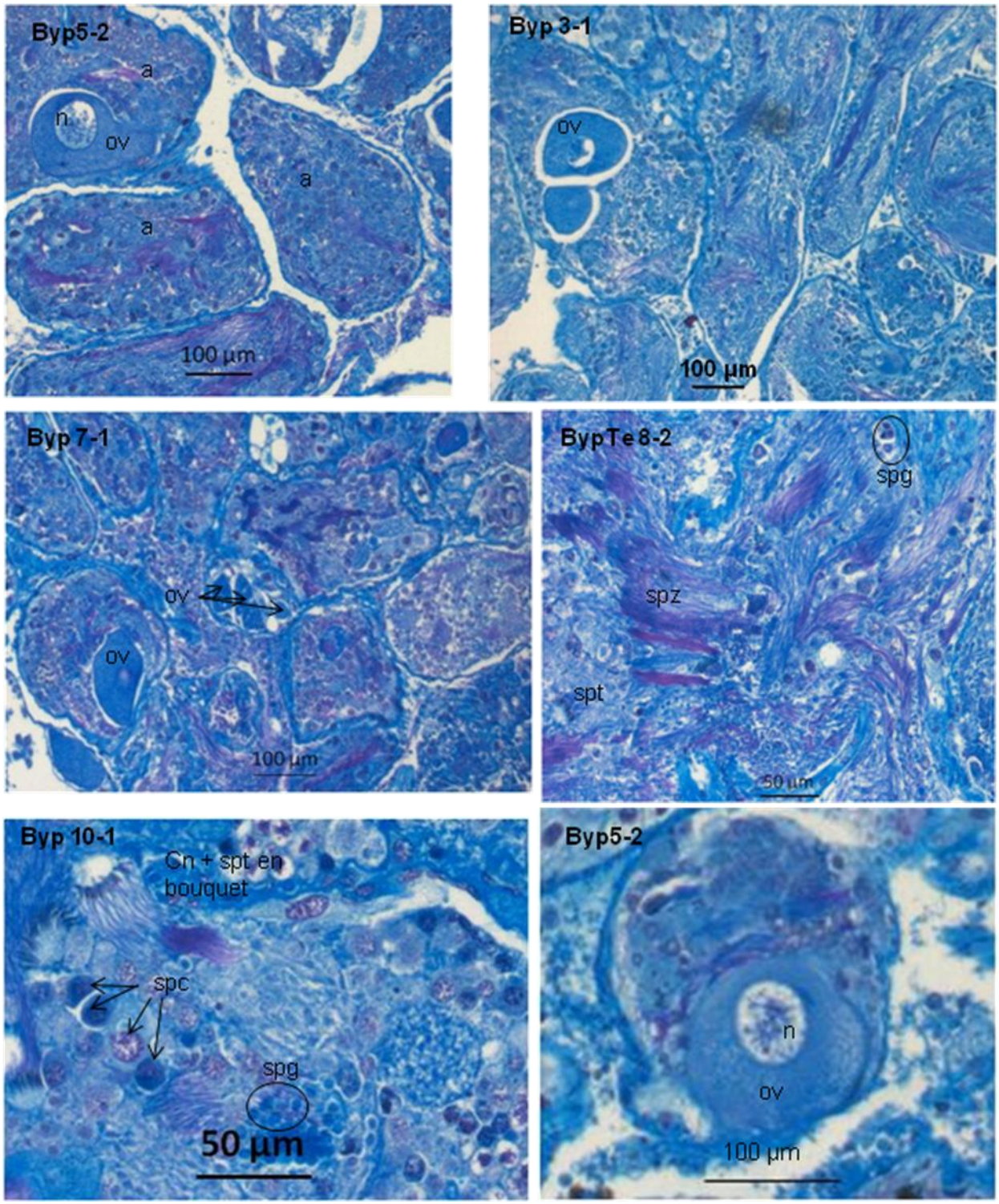


Figure III.3.18. Gonades d'escargots exposés au Bypass® (Byp et BypTe) âgés de 240 jours. Légendes : a, acinus ; cn, cellule nourricière ; n, noyau ; ov, ovocyte ; spc, spermatocyte ; spg, spermatogonie ; spt, spermatide ; spz, spermatozoïde.

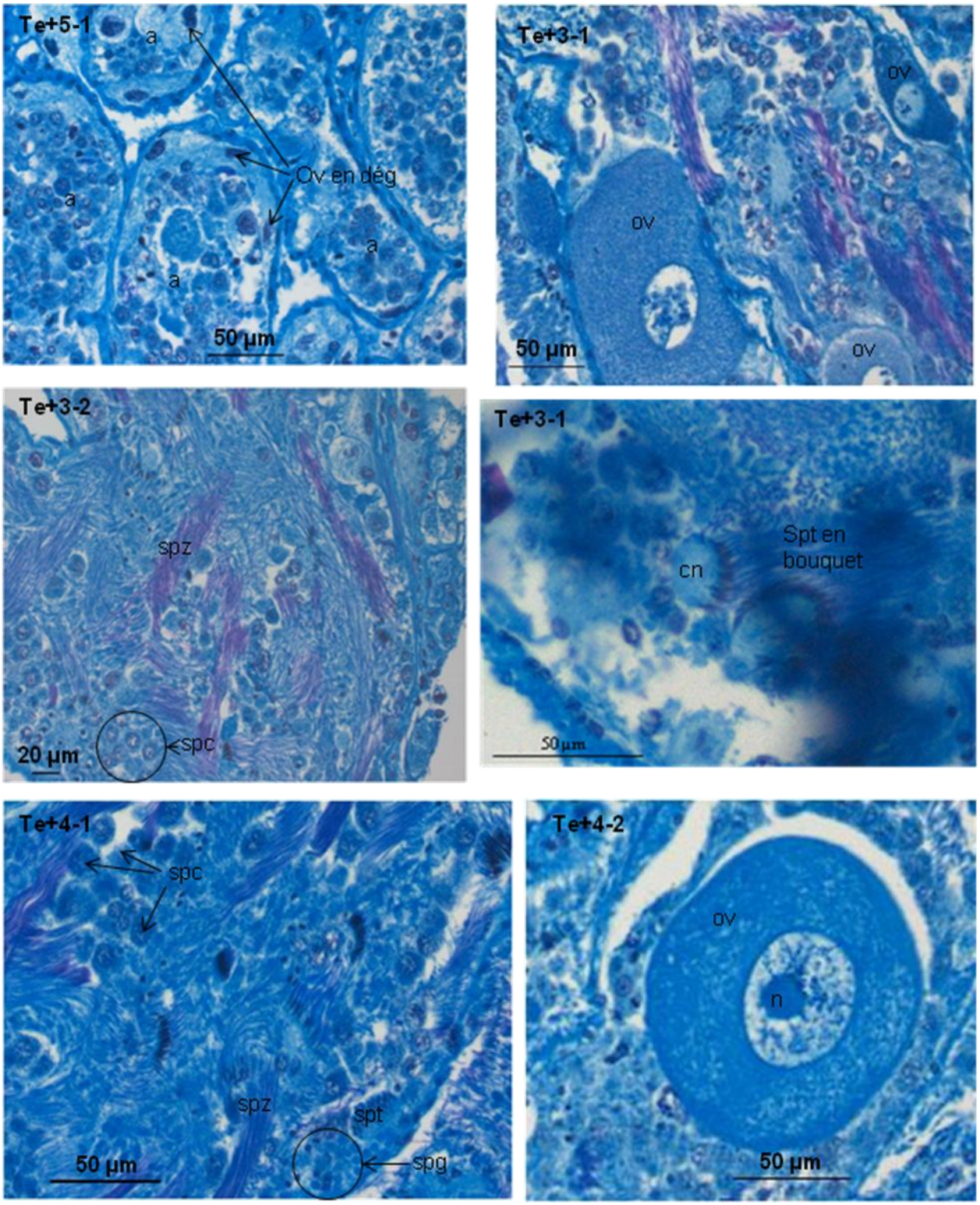


Figure III.3.19. Gonades d'escargots exposés au mélange Reglone-Agral (Te+) âgés de 240 jours.

Légendes : a, acinus ; cn, cellule nourricière ; dég, dégénérescence ; n, noyau ; ov, ovocyte ; spc, spermatocyte ; spg, spermatogonie ; spt, spermatide ; spz : spermatozoïde.

III.3.2.4 Discussion

Globalement, nos résultats montrent que la physiologie des escargots exposés sur l'ensemble de leur cycle de vie à une concentration environnementalement réaliste de Bypass® n'est pas considérablement modifiée si l'on considère le succès d'éclosion, la survie, la croissance et le développement de l'appareil reproducteur. La fertilité apparaît comme le paramètre le plus affecté, notamment chez les escargots exposés pendant le développement embryonnaire. Le même constat est effectué chez les escargots exposés au mélange Reglone-Agral (R-A), avec un effet plus marqué sur la reproduction.

III.3.2.4.1 Embryotoxicité en phase solide

Les embryons exposés au Bypass® à la concentration de 3 mg kg^{-1} de glyphosate dans le sol de Bergbieten ont éclos correctement, ce qui était attendu d'après les résultats obtenus par le bioessai en phase solide qui donnait une EC50 de 218,7 mg kg^{-1} (cf. Chapitre 2, section III.2.2). Les résultats avec le diquat et le nonylphenol (NP) du mélange Reglone-Agral (concentrations choisies selon les EC50 obtenues en phase liquide ; cf. Chapitre 2, section III.2.1), montrent que la biodisponibilité et donc la toxicité de ces substances sont très différentes suivant la matrice dans laquelle elles sont contenues. En effet les pourcentages d'éclosion obtenus montrent qu'aux concentrations expérimentées dans le sol de Bergbieten (1,3 mg kg^{-1} de diquat et 0,6 mg kg^{-1} de NP), qui par ailleurs, correspondent aux concentrations estimées dans le sol après application aux doses recommandées, ces deux substances ne sont pas toxiques pour les embryons.

III.3.2.4.2 Effets du Bypass® sur la survie et la croissance

Il n'y a pas d'effet du Bypass® sur la survie et la croissance des escargots exposés à du sol et de la nourriture contaminés à une concentration environnementale, ce qui confirme les résultats de la première expérience d'exposition chronique (cf. section III.3.1). Il a été vu dans cette première partie que le glyphosate était rapidement dégradé dans le sol et que malgré une exposition continue par la nourriture, le système de détoxification et/ou d'élimination restait important lors d'une exposition par voie digestive (cf. section III.3.1.4).

III.3.2.4.3 Effets du mélange R-A sur la survie et la croissance

Concernant le témoin positif, aucun effet n'a été mis en évidence sur la survie et la croissance si ce n'est une légère stimulation qui se traduit notamment par une maturation de la coquille plus rapide et une croissance plus rapide durant les 56 premiers jours. Des effets du NP seul ont été démontrés chez des invertébrés aquatiques, que ce soit sur le développement embryonnaire (Lalah *et al.* 2007), larvaire (Forget-Leray *et al.* 2005) ou sur la survie et la croissance (Lagadic *et al.* 2007). Quand on compare les concentrations du NP entrainant des effets létaux chez d'autres organismes terrestres, comme les collemboles ou les vers de terre, on constate que ce sont des concentrations bien supérieures à celle testée ici (0,6 mg kg^{-1}). Le NP est un composé régulièrement retrouvé dans les boues de station d'épuration à de fortes concentrations, par exemple de l'ordre de 200-500 mg kg^{-1} (Mougin et Cravedi 2003). Ainsi, Scott-Fordsmand et Krogh (2004) ont déterminé une EC10 de 55 mg kg^{-1} chez *Folsomia fimetaria* après 21 jours d'exposition tandis que Widarto *et al.* (2007) ont constaté une mortalité de l'ensemble des organismes chez *F. candida* à partir de 40 mg kg^{-1} de NP. Ces mêmes auteurs ont montré qu'il n'y avait pas d'effet sur la survie et que la croissance des vers de terre était affectée uniquement jusqu'à la moitié de la durée de l'exposition (qui dure au total 196 jours) à partir de 10 mg kg^{-1}, suggérant une sensibilité plus grande des juvéniles par rapport aux adultes (Widarto *et al.* 2004).

III.3.2.4.4 Effets du mélange R-A sur la reproduction

Un des objectifs de cette étude était de déterminer les effets du Bypass® sur la reproduction selon que l'exposition a débuté précocement, dès le développement embryonnaire, ou non. Afin de déterminer si les modalités de l'expérience pouvaient permettre de répondre à cette question, un témoin positif a été mis en place. Ce mélange à base de diquat et de NP avait provoqué des effets néfastes sur la reproduction chez la limnée : une durée du développement embryonnaire plus longue ainsi qu'un pourcentage d'éclosion réduit ont été démontrés chez des pontes issues de limnées exposées (Coutellec *et al.* 2008). Bien qu'il y ait peu de résultats statistiquement significatifs (mis à part le nombre de pontes en fonction du temps) dans notre étude, le nombre de pontes total, la fécondité et la fertilité semblent être affectés par l'exposition au mélange R-A. Le NP a clairement été reconnu comme un PE chez les mollusques pulmonés aquatiques (Lagadic *et al.* 2007). Au niveau terrestre, une EC10-reproduction a été déterminée à 63 mg kg^{-1} chez le collembole (Scott-

Fordsmand et Krogh 2004) et il a également été mis en évidence un effet stimulateur sur la fécondité à des concentrations de 8-16 mg kg^{-1} (Widarto *et al.* 2007). Ces mêmes auteurs ont démontré une tendance à une inhibition du nombre de cocons par individu chez le ver de terre *Dendrobaena octaedra* sans être significative du fait d'écart-types trop importants (Widarto *et al.* 2004), comme dans notre étude. En revanche, le pourcentage d'éclosion des œufs pondus par les vers de terre exposés semble être augmenté sous l'effet du NP, mais également de façon non significative (Widarto *et al.* 2004). Ces résultats suggèrent que, suivant l'espèce et le paramètre de toxicité observé, l'effet perturbateur du NP sur la reproduction peut se traduire par une inhibition ou une induction. Dans notre étude, l'observation de l'évagination permanente d'une partie de l'appareil reproducteur, conforte la conclusion que le NP perturbe la reproduction. Des observations réalisées au sein de notre élevage montrent que les escargots ayant l'appareil génital évaginé ont souvent un tractus génital hypertrophié et meurent assez rapidement. Les causes ne sont pas identifiées et seules des hypothèses non exclusives, comme la perturbation de la maturation du tractus génital ou du système de contrôle neuromusculaire de la partie terminale du tractus génital, peuvent être émises. Cette anomalie n'a pas entrainé de mortalité supérieure aux témoins dans nos expériences et comme on l'aperçoit sur la Figure III.3.16b, l'appareil génital des Te+ ne semble pas être malformé. La seconde hypothèse semble donc la plus pertinente pour expliquer ce phénomène. Les escargots dont le tractus génital est évaginé ne s'accoupleraient pas. Or, l'accouplement est un facteur de déclenchement de la ponte chez les escargots, d'où le très faible nombre de pontes obtenues chez les Te+. Ce faible nombre de pontes se traduit par des glandes à albumen plus grosses chez les Te+ et de couleur plus blanches. En effet, n'ayant pas pondu, leurs réserves n'ont pas été évacuées pour envelopper les œufs (Bride *et al.* 1991), au contraire des escargots exposés aux autres traitements. Il a également été observé chez un autre gastéropode pulmoné terrestre, *Archachatina marginata ovum,* que la couleur blanchâtre des glandes à albumen correspond à des escargots jeunes n'ayant pas encore pondu tandis que la couleur jaune citron est observée chez des escargots matures prêts à pondre (Egonmwan 2007). Les coupes histologiques des gonades ne révèlent pas de différence notable avec les témoins tandis que chez la limnée, gastéropode aquatique également hermaphrodite et protandre, l'étude histologique du complexe gonado-digestif avait révélé une prédominance de la lignée femelle chez les organismes exposés au mélange R-A (de Vaufleury et Coeurdassier 2007). Ce n'est pas le cas ici, puisque c'est plutôt la lignée mâle qui semble dominer dans les acini des escargots prélevés à l'âge de 8 mois. En conclusion, le mélange R-A ne peut pas totalement être validé en tant que témoin positif du fait de la non significativité des paramètres observés

pour la fertilité notamment. Pourtant, une claire tendance à l'inhibition de la reproduction, principalement sur le nombre de pontes total de l'ensemble des individus, a été soulignée. Cet effet peut probablement être attribué au NP dont l'effet PE est reconnu. Sachant que cette substance est généralement utilisée dans les études d'effets PE à de plus fortes concentrations et qu'il est également possible de la retrouver en milieu naturel à des concentrations importantes, de nouveaux essais pourront être conduits soit en mélange avec le diquat mais à de plus fortes concentrations soit uniquement avec le NP.

III.3.2.4.5 Effets du Bypass® sur la reproduction

Les effets du Bypass® sur la reproduction ne sont pas statistiquement significatifs même si une tendance à la réduction de la fertilité chez les escargots exposés précocement est observée. Quelques auteurs ont étudié les effets du glyphosate sur la reproduction d'autres invertébrés terrestres. Santos *et al.* (2010) ont déterminé une EC50 de 0,33 mg kg^{-1} chez *F. candida* exposé pendant 28 jours, donc à une concentration 10 fois inférieure à celle utilisée ici. Chez *E. foetida*, Casabe *et al.* (2007) ont montré une inhibition de la fertilité à des concentrations similaires aux nôtres. Cependant, deux autres études sur cette même espèce ne montrent pas d'effet à 8 mg kg^{-1} (Yasmin et D'Souza 2007) et déterminent une EC50 de 28,79 mg kg^{-1} après 8 semaines d'exposition (EC 2002b). Chez les vertébrés, Howe *et al.* (2004) ont pu mettre en évidence un effet du Roundup® à des concentrations de 1,8 mg l^{-1} sur les gonades d'amphibiens. Ces animaux non hermaphrodites présentaient à la fois des gamètes mâles et des gamètes femelles dans leur gonade, révélant leur ambisexualité primaire et démontrant un dysfonctionnement dans le contrôle neuro-endocrine de la différentiation sexuelle et de la gamétogénèse. Il semblerait également que le sex-ratio soit déséquilibré en faveur des femelles (Howe *et al.* 2004). La mise en évidence d'effets perturbateurs de la gamétogénèse est très difficile chez les organismes hermaphrodites. La nature et l'abondance des gamètes dans les acini évoluent au cours du temps et peuvent même être variables d'un acinus à l'autre (Gomot et Gomot 1985; Bride *et al.* 1986), comme le montrent nos observations chez les témoins. L'ensemble des observations réalisées sur les gonades ne révèle pas d'anomalie suggérant que l'herbicide n'a perturbé ni la spermatogénèse ni l'ovogénèse. La même hypothèse que pour les Te+ peut être formulée pour les escargots de ces 2 traitements, à savoir que le pourcentage d'évagination plus élevé pourrait être la cause d'un plus faible nombre de pontes et donc d'une baisse de fertilité.

Les résultats semblent donc valider l'hypothèse de départ qui formulait qu'une exposition précoce au glyphosate pouvait avoir un effet différé (notamment sur la reproduction). Des effets comparables ont été démontrés chez d'autres espèces. Schneider *et al.* (2009) ont mis en évidence que la fécondité et la fertilité de libellules adultes diminuaient lorsque les larves avaient été nourries avec de l'aliment contaminé au glyphosate. Tate *et al.* (1997) ont exposé continuellement 3 générations d'un escargot d'eau douce (*Pseudosuccinea columella)* et ont constaté des effets sur la reproduction (diminution de l'éclosion) seulement à partir de la troisième génération. Cependant, les mécanismes en jeu n'ont pas été étudiés. Chez les invertébrés, aucune étude écotoxicologique ne différencie les effets sur la reproduction d'une espèce, dus à une exposition précoce au cours du développement embryonnaire. Une étude sur le rat montre qu'une exposition à un insecticide pyréthroïde par la mère au cours de la gestation altère de façon irréversible le développement des testicules et la spermatogénèse des descendants, du fait d'une interaction avec la testostérone (Zhang *et al.* 2010). Concernant les escargots exposés seulement durant la croissance et la reproduction (TeByp), il semble que le Bypass® stimule la reproduction (fécondité, pourcentage d'éclosion et fertilité) ce qui pourrait être interprété comme un effet hormesis, bien que ce ne soit pas significatif. L'effet hormesis (stimulateur à faibles doses) du glyphosate a été observé chez les plantes (Cedergreen 2008). En revanche, cet effet n'a jusqu'alors pas été rapporté chez les animaux. Cependant, Cedergreen (2008) souligne le fait que, généralement, un effet hormesis n'améliore pas la fitness de la population car l'énergie allouée au paramètre stimulé est accordée au détriment d'un autre paramètre. Ainsi, Fujiwara *et al.* (2002) montrent que l'insecticide fenvalerate entraine une augmentation de la fécondité chez un lépidoptère mais également une diminution de la survie des jeunes.

En conclusion, les effets du Bypass®, tout comme ceux du mélange R-A, ne sont pas statistiquement significatifs du fait d'une variabilité inter-couple très importante. Cependant, chez les escargots exposés durant le développement embryonnaire (que ce soit au Bypass® ou au mélange R-A), une diminution de la fertilité est incontestable, qui se traduit par une forte proportion de couples stériles (70% chez les Byp et 75% chez les Te+). Cela témoigne d'un effet dès le stade embryonnaire sur des cibles dont l'entrée en fonction se fait seulement à l'âge adulte. En revanche, les deux contaminants n'affectent pas la croissance, ce qui démontre que les deux systèmes de régulation (croissance et reproduction), sous contrôle neuro-endocrine de cellules différentes, sont affectés différement par le Bypass® : ces cellules, localisées dans le cerveau, sont les corps dorsaux pour le contrôle de la

gamétogénèse et les neurones du mésocérébron pour le contrôle de la croissance (Gomot de Vaufleury 2001).

III.3.2.4.6 Intérêts et limites du dispositif d'exposition et perspectives

Il a aussi été constaté durant la phase de reproduction un nombre important de pontes comprenant un faible nombre d'œufs, particulièrement chez les témoins. Ces anomalies, fréquentes hors exposition, sont généralement observées lors des premières pontes des escargots et donnent des œufs infertiles la plupart du temps (observations réalisées au sein de notre élevage). Cependant, dans cette étude, elles ont eu lieu tout au long de la reproduction, souvent à une fréquence supérieure vers la fin de l'expérience. Très souvent, ce sont les mêmes escargots (tout du moins, les individus contenus dans les mêmes boîtes) qui présentaient ce symptôme. Il faut rappeler que les escargots, élevés en couple, n'ont pas eu le choix de leur partenaire pour se reproduire comme c'est habituellement le cas dans la nature ou en élevage. Or, il a été démontré que dans une population d'escargots, le développement du tractus génital est asynchrone, c'est-à-dire que certains individus se développent plus rapidement et vont donc atteindre le stade femelle tandis que d'autres seront encore au stade mâle (Bride et Gomot 1991). Généralement, l'accouplement entre deux individus ne se fait pas au hasard, puisque les partenaires « se choisissent » à des stades différents, ce qui favoriserait la fertilisation. De même, lorsqu'ils en ont la possibilité, les escargots sexuellement matures s'accouplent par intervalles avec plusieurs partenaires, favorisant le stockage de spermatozoïdes d'origines diverses (Albuquerque de Matos et Serra 1988). Il a été montré chez des escargots hermaphrodites comme *Helix aspersa* que ceux-ci se reproduisent plusieurs fois durant une saison avec plusieurs partenaires et que des spermatozoïdes provenant de plusieurs partenaires peuvent fertiliser une même ponte (Evanno *et al.* 2005). Ainsi après l'accouplement, l'escargot peut stocker le sperme dans les divers tubules de la spermathèque (Figure II.6) et s'accoupler une seconde fois. Dans le cas de notre expérience, un seul partenaire est disponible, contraignant l'escargot à fertiliser ses ovules avec des spermatozoïdes d'une seule origine génétique. Si ces spermatozoïdes sont stériles ou présentent d'autres anomalies, les répercussions sur la descendance peuvent être importantes (comme par exemple l'augmentation de pontes infertiles). Malgré cette proportion élevée de petites pontes chez les témoins, la fertilité reste toutefois largement dans la normalité si les données sont comparées avec celles de reproduction réalisées dans notre élevage pour des essais d'aliments, c'est-à-dire entre 79 et 90 éclos par escargot.

Aucun traitement (que ce soit le Bypass® ou le mélange R-A) n'a fait apparaître de disparités avec les témoins sur les différents tissus considérés. La teneur en eau des tissus n'est pas modifiée alors que c'était le cas chez *H. aspersa* exposé au diméthoate, cet insecticide favorisant la rétention d'eau, particulièrement dans le pied (plus de 6% d'eau, Coeurdassier *et al.* 2001), probablement en lien avec l'inhibition des AChE et de la narcose qui l'accompagnait.

Bien qu'une tendance à une inhibition de certains paramètres de reproduction soit marquée suite à l'exposition aux contaminants, il n'a pas été possible de la mettre en évidence de façon significative du fait d'une variabilité importante entre individus. Afin d'améliorer la faisabilité et de répondre à certaines questions évoquées ci-dessus, quelques perspectives pourront être envisagées pour :

- déterminer si le fait d'avoir la possibilité de s'accoupler avec plusieurs partenaires, a une influence sur les paramètres de reproduction (notamment nombre de pontes et production de petites pontes ou pontes infertiles). La même expérience que présentée ici pourrait être reconduite mais cette fois avec plus d'escargots (4 ou 8) dans une même boîte. Ils seraient identifiés afin de suivre individuellement les paramètres de reproduction (et non par couple).
- valider un témoin positif par des effets significatifs sur la reproduction. L'utilisation du NP et/ou du mélange diquat/NP reste d'actualité mais à de plus fortes concentrations. Par ailleurs, d'autres molécules « candidates » reconnues comme PE, bisphénol-A et vinclozine par exemple (Lemos *et al.* 2010), pourraient être expérimentées.
- comprendre l'effet précoce et différé des perturbateurs endocriniens. Dans cette optique, l'étude des premières structures (dont les cellules germinales) qui se différencient pendant le développement embryonnaire et qui plus tard constitueront l'appareil génital (Griffond et Bride 1985; Griffond et Bride 1987) pourrait être entreprise.

Une dernière perspective très intéressante serait de réaliser des coupes histologiques de cerveaux afin de déterminer si les structures impliquées dans le contrôle neuro-endocrine de la reproduction présentent des anomalies chez les escargots exposés aux différents produits (Bypass® et mélange R-A). Le « cerveau » des escargots est constitué d'un collier nerveux comportant une masse sus-œsophagienne et une masse sous-œsophagienne avec différents ganglions nerveux (Figure III.3.20).

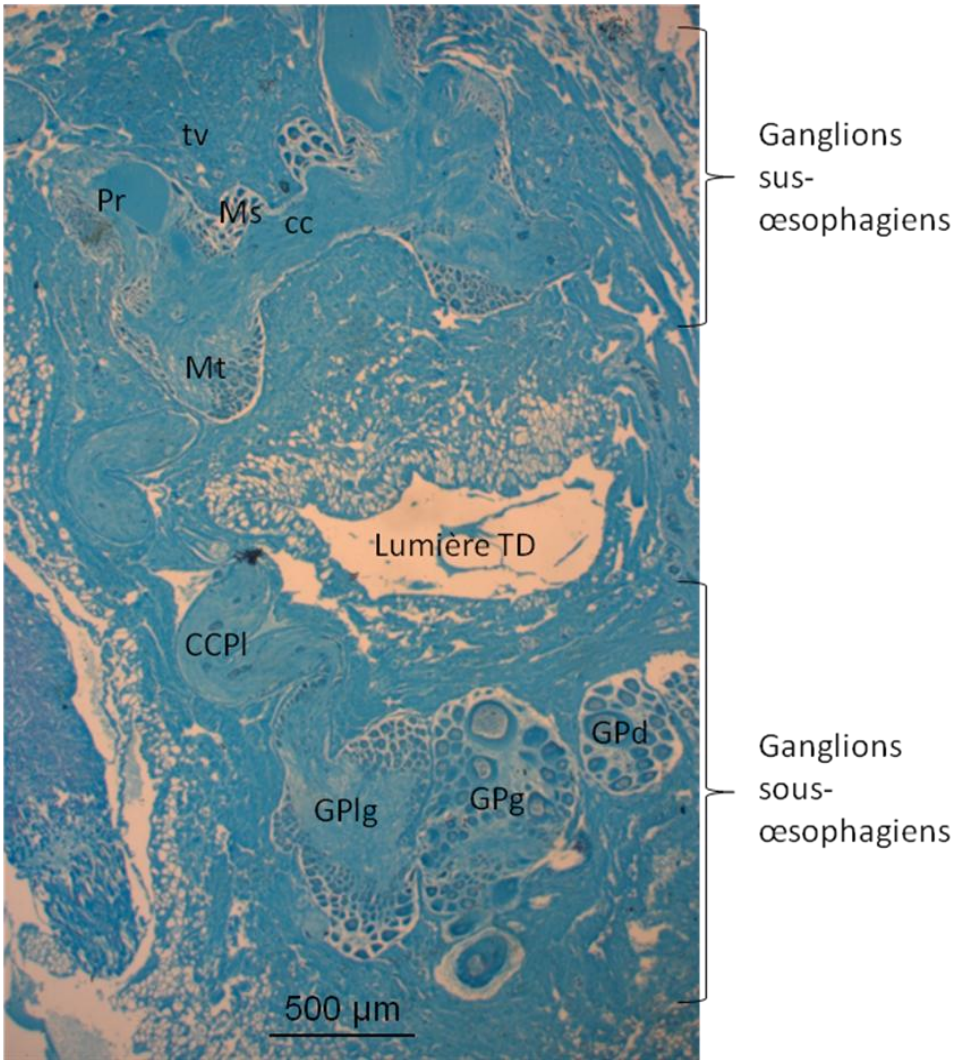


Figure III.3.20. Coupe transversale d'un cerveau d'escargot témoin : ganglions cérébraux sous et sus-œsophagiens. Légende : cc, commissure intercérébroïde ; CC, connexion cérébrale ; d, droit ; g, gauche ; G, ganglion ; Ms, mésocérébron ; Mt, métacérébron ; P, pariétal ; Pl, pleural ; Pr, procérébron ; TD, tube digestif ; tv, tissu vésiculeux.

La Figure III.3.21 représente les structures impliquées dans le contrôle neuro-endocrine de la croissance et de la gamétogenèse. Les neurones des ganglions sus-œsophagiens, qui contrôlent la croissance, exerceraient une action inhibitrice sur les corps dorsaux durant la croissance (Vincent *et al.* 1984). Lorsque l'escargot atteint sa maturité sexuelle, cette inhibition est stoppée, permettant alors aux corps dorsaux d'exercer leur action stimulatrice sur la vitellogénèse et alors à l'escargot d'entrer dans la phase femelle de sa reproduction (Vincent *et al.* 1984)(Figure III.3.21.).

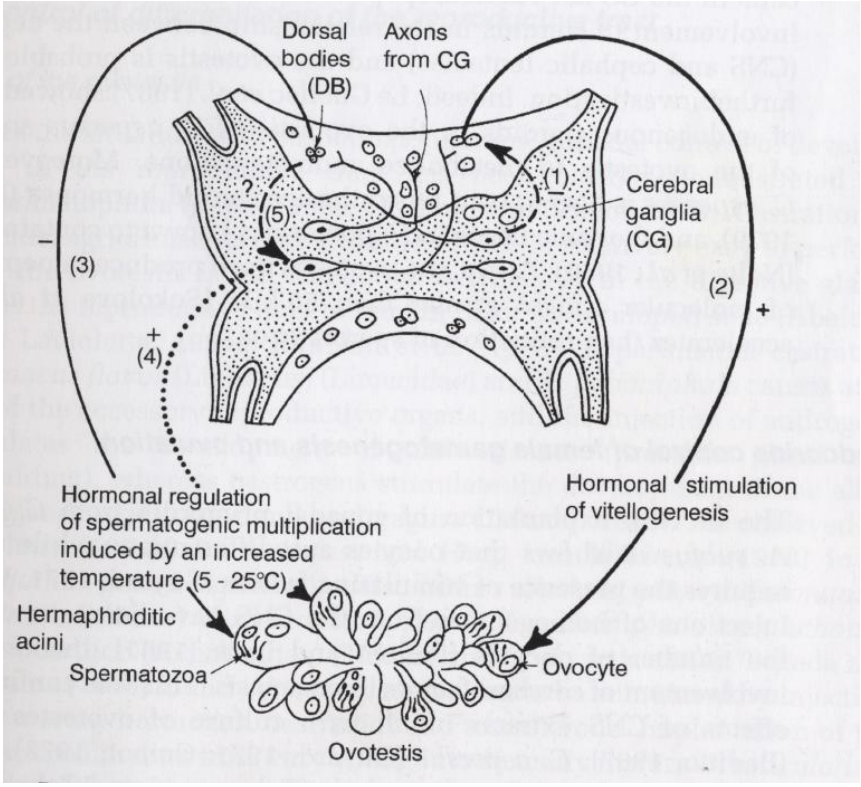


Figure III.3.21. Rôles proposés des différentes parties du système nerveux central sur la régulation de la gamétogénèse chez *Helix aspersa* (d'après Gomot de Vaufleury 2001). 1 : inhibition du contrôle nerveux des corps dorsaux par les cellules du mésocérébron ; 2 : stimulation de la vitellogénèse par les corps dorsaux qui ne sont plus inhibés ; 3 : inhibition de la spermatogénèse par les corps dorsaux ; 4 : stimulation de la spermatogénèse par les cellules des ganglions cérébraux ; 5 : inhibition de l'action stimulatrice des cellules des ganglions cérébraux par les corps dorsaux.

Chez des escargots exposés, l'observation des neurones (Figure III.3.22), des corps dorsaux, à proximité du mésocérébron et en dessous de la commissure intercérébroïde (Figure III.3.22) ou de toute autre anomalie, permettrait d'apporter des informations essentielles dans la compréhension des mécanismes d'action des produits/substances testé(e)s.

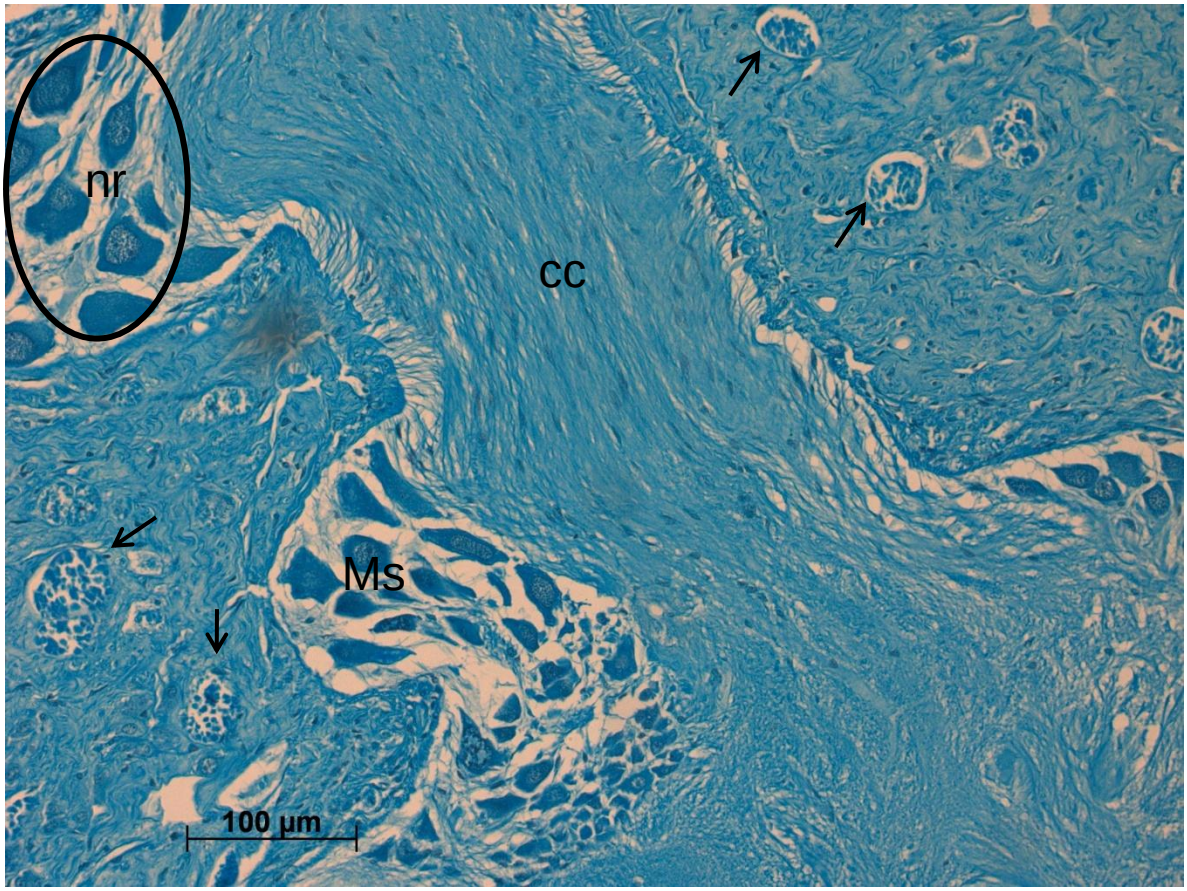


Figure III.3.22. Localisation des corps dorsaux (→) au niveau du mésocérébron et de la commissure cérébrale des ganglions sus-oesophagiens chez un escargot non exposé, mature sexuellement et s'étant déjà reproduit. Légende : cc, commissure intercérébroïde ; Ms, mésocérébron ; nr, neurones.

III.3.3 Références

Sites internet

European Commission – Joint Research Centre – Institute for Health and Consumer Protection (IHCP). http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/index.php?PGM=ein.

Site pour trouver le package *pgirmess*. http://perso.orange.fr/giraudoux.

Publications

(ISO 15952:2006). Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae). Determination of the effects on growth by soil contamination. Soil quality.

Accinelli C, Screpanti C, Vicari A et Catizone P (2004). "Influence of insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki on the degradation of glyphosate and glufosinate-ammonium in soil samples." Agriculture Ecosystems & Environment **103**(3): 497-507.

Albuquerque de Matos RM et Serra JA (1988). "Ce que la génétique a fait et peut faire pour l'héliciculture." Broteria Genetica **IX**: 25-81.

Aubertot JN, Barbier JM, Carpentier A, Gril JJ, Guichard L, Lucas P, Savary S, Savini I et Voltz M (2005). Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'expertise scientifique collective, synthèse du rapport. INRA et Cemagref (France).

Beeby A et Richmond L (2002). "Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution." Ecological Indicators **1**(4): 261-270.

Beeby A et Richmond L (2003). "Do the soft tissues of *Helix aspersa* serve as a quantitative sentinel of predicted free lead concentrations in soils?" Applied Soil Ecology **22**(2): 159-165.

Bride J et Gomot L (1991). "Asynchronous development of the genital-tract during growth and reproduction in the snail, *Helix aspersa*." Reproduction Nutrition Development **31**(1): 81-96.

Bride J, Gomot L et Saleuddin ASM (1991). "Mating and 20-hydroxyecdysone cause increased galactogen synthesis in the albumen gland explants of *Helix aspersa* (Mollusca)." Comparative Biochemistry and Physiology **98**: 369-373.

Bride M, Barre P et Griffond B (1986). "Fibroctin and ovotestis development in the snail *Helix aspersa*: comparative immunology." Developmental & Comparative Immunology **10**: 117.

Brown GG, Barois I et Lavelle P (2000). "Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activityin the drilosphere and the role of interactionswith other edaphic functional domains." European Journal of Soil Biology **36**(3): 177-198.

Casabe N, Piola L, Fuchs J, Oneto ML, Pamparato L, Basack S, Gimenez R, Massaro R, Papa JC et Kesten E (2007). "Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field." Journal of Soils and Sediments **7**(4): 232-239.

Cedergreen N (2008). "Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained over time?" Environmental Pollution **156**(3): 1099-1104.

Coeurdassier M, Gomot de Vaufleury A, Saint-Denis M, Ribera D, Narbonne JF et Badot PM (2002). "Effects of dimethoate on snail B-esterase and growth as a function of dose, time and exposure route in a laboratory bioassay." Biomarkers **7**(2): 138-150.

Coeurdassier M, Saint-Denis M, Gomot de Vaufleury A, Ribera D et Badot PM (2001). "The garden snail (*Helix aspersa*) as a bioindicator of organophosphorus exposure: Effects of dimethoate on survival, growth, and acetylcholinesterase activity." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(9): 1951-1957.

Contardo-Jara V, Klingelmann E et Wiegand C (2009). "Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes." Environmental Pollution **157**(1): 57-63.

Coutellec MA, Delous G, Cravedi JP et Lagadic L (2008). "Effects of the mixture of diquat and a nonylphenol polyethoxylate adjuvant on fecundity and progeny early performances of the pond snail *Lymnaea stagnalis* in laboratory bioassays and microcosms." Chemosphere **73**(3): 326-336.

Dallinger R, Berger B, Triebskorn-Köhler R et Köhler H (2001). Soil biology and ecotoxicology. The biology of terrestrial molluscs. Barker GM. Oxon, CABI**:** 489-525.

de Vaufleury A et Coeurdassier M (2007). Dans: Programme "Evaluation et réduction des risques liés à l'utilisation des pesticides". Rapport final CEREMEL, Changements d'échelle et évaluation du risque écotoxicologique de mélanges entres substances actives herbicides et adjuvant, Lagadic et al. INRA Rennes, INRA Toulouse, INERIS, Université Paul-Verlaine, Université de Franche-Comté.

de Vaufleury A, Coeurdassier M, Pandard P, Scheifler R, Lovy C, Crini N et Badot PM (2006). "How terrestrial snails can be used in risk assessment of soils." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(3): 797-806.

Druart C, Delhomme O, de Vaufleury A, Ntcho E et Millet M (2011). "Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil." Analytical and Bioanalytical Chemistry **399**: 1725-1732.

EC (1991). "Council directive of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. 91/414/EC." Official Journal of the European Union **L230**: 1-154.

EC (1998). Monograph of Glyphosate. Report and proposed decision. Rapporteur member state: Germany.

EC (2001). COM (2001) 262 final: Communication from the Commission to the Council and the European Parliament on the implementation of the community strategy for endocrine disrupters - a range of substances of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM (1999) 706). Commission of the European Communities. Brussels.

EC (2002a). DRAFT working document. Guidance document on terrestrial ecotoxicology under Council directive 91/414/EC. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General.

EC (2002b). Review report for the active substance glyphosate. Finalised in the Standing Committee on Plant Health at its meeting on 29 June 2001 in view of the inclusion of glyphosate in Annex I of Directive 91/414/EEC. European Comission. Health & Consumer Protection Directorate-General. Directorate E – Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions. E1 - Plant health.

EC (2004). Draft Assessment report (DAR) - public version - Initial risk assessment provided by the rapporteur Member State Sweden for the existing active ingredient Glufosinate (based on the variant glufosinate-ammonium) of the second stage of the review

programme referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC. European Commission.

Egonmwan RI (2007). "Gross morphology and ultrastructural study of albumen gland of the land snail *Archachatina marginata ovum* (Pfeiffer) (Pulmonata: Achatinidae)." Pakistan Journal of Biological Sciences **10**(2): 322-325.

EPPO (2003). "Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8: Soil organisms and functions. European and Mediterranean Plant Protection Organization." EPPO Bulletin **33**: 147-209.

Evanno G, Madec L et Arnaud JF (2005). "Multiple paternity and postcopulatory sexual selection in a hermaphrodite: what influences sperm precedence in the garden snail *Helix aspersa*?" Molecular Ecology **14**(3): 805-812.

Faber MJ, Stephenson GR et Thompson DG (1997). "Persistence and leachability of glufosinate-ammonium in a northern Ontario terrestrial environment." Journal of Agricultural and Food Chemistry **45**(9): 3672-3676.

Forget-Leray J, Landriau I, Minier C et Leboulenger F (2005). "Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe)." Ecotoxicology and Environmental Safety **60**(3): 288-294.

Forlani G, Mangiagalli A, Nielsen E et Suardi CM (1999). "Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms." Soil Biology and Biochemistry **31**(7): 991-997.

Frampton GK, Jansch S, Scott-Fordsmand JJ, Rombke J et Van Den Brink PJ (2006). "Effects of pesticides on soil invertebrates in laboratory studies: A review and analysis using species sensitivity distributions." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(9): 2480-2489.

Fujiwara Y, Takahashi T, Yoshioka T et Nakasuji F (2002). "Changes in egg size of the diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera : Yponomeutidae) treated with fenvalerate at sublethal doses and viability of the eggs." Applied Entomology and Zoology **37**(1): 103-109.

Gimbert F, de Vaufleury A, Douay F, Coeurdassier M, Scheifler R et Badot PM (2008). "Long-term responses of snails exposed to cadmium-contaminated soils in a partial life-cycle experiment." Ecotoxicology and Environmental Safety **70**(1): 138-146.

Gomot A (1998). "Biochimical composition of *Helix* snails: influence of genetic and physiological factors." Journal of Molluscan Studies **64**: 173-181.

Gomot de Vaufleury A (2000). "Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*." Ecotoxicology and Environmental Safety **46**: 41-50.

Gomot de Vaufleury A (2001). Regulation of growth and reproduction. The biology of terrestrial molluscs. Barker GM. Oxon, CABI**:** 331-355.

Gomot de Vaufleury A et Kerhoas I (2000). "Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa*." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology(64): 434-442.

Gomot P et Gomot L (1985). "Action de la photopériode sur la multiplication spermatogoniale et la reproduction de l'escargot *Helix aspersa*." Bulletin de la Société zoologique de France **110**: 445-459.

Griffond B et Bride J (1985). "Investigation of the embryonic development of the genital apparatus in *Helix aspersa* - Evidence for the involvement of 2 cell-types in gonadal development." Reproduction Nutrition Development **25**(1A): 141-152.

Griffond B et Bride J (1987). Germinal and non-germinal lines in the ovotestis of *Helix aspersa*: a survey. Development Genes and Evolution, Springer Berlin / Heidelberg. **196:** 113-118

Hispard F, de Vaufleury A, Cosson RP, Devaux S, Scheifler R, Coeurdassier M, Gimbert F, Martin H, Richert L, Berthelot A et Badot PM (2007). "Comparison of transfer and effects of Cd on rats exposed in a short experimental snail-rat food chain or to CdCl2 dosed food." Environment International **doi:10.1016/j.envint.2007.09.003**.

Howe CM, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Werry K et Veldhoen N (2004). "Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species." Environmental Toxicology and Chemistry **23**(8): 1928-1938.

Kang S, Choi WI et Ryoo MI (2001). "Demography of *Paronychiurus kimi* (Lee) (Collembola: Onychiuridae) under the influence of glufosinate-ammonium on plaster charcoal substrate and in artificial soil." Applied Soil Ecology **18**(1): 39-45.

Lagadic L, Coutellec M et Caquet T (2007). "Endocrine disruption in aquatic pulmonate molluscs: Few evidences, many challenges." Ecotoxicology **16**(1): 45-59.

Laguerre C, Sanchez-Hernandez JC, Köhler HR, Triebskorn R, Capowiez Y, Rault M et Mazzia C (2009). "B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: An enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure." Environmental Pollution **157**(1): 199-207.

Lalah JO, Severin GF, Schramm KW, Lenoir D, Behechti A, Guenther K et Kettrup A (2007). "Effects of a branched p-nonylphenol isomer (4(3 ',6 '-dimethyl-3 '-heptyl)-phenol) on embryogenesis in *Lymnae stagnalis* L." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **52**(1): 104-112.

Lemos MFL, van Gestel CAM et Soares AMVM (2010). "Reproductive toxicity of the endocrine disrupters vinclozolin and bisphenol A in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Latreille, 1804)." Chemosphere **78**(7): 907-913.

Michalková V et Pekár S (2009). "How glyphosate altered the behaviour of agrobiont spiders (Araneae: Lycosidae) and beetles (Coleoptera: Carabidae)." Biological Control **51**(3): 444-449.

Mougin C et Cravedi JP (2003). "Devenir et impacts écotoxicologiques du nonylphénol contenu dans les boues de station d'épuration valorisées en agriculture." Les dossiers de l'environnement de l'INRA **25**.

Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N et Seralini GE (2005). "Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase." Environmental Health Perspectives **113**(6): 716-720.

Santos MJG, Soares AMVM et Loureiro S (2010). "Joint effects of three plant protection products to the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus* and the collembolan *Folsomia candida*." Chemosphere **80**(9): 1021-1030.

Scheifler R, Brahim MB, Gomot de Vaufleury A, Carnus JM et Badot PM (2003). "A field method using microcosms to evaluate transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from sewage sludge amended forest soils to *Helix aspersa* snails." Environmental Pollution **122**(3): 343-350.

Scheifler R, Gomot de Vaufleury A, Toussaint ML et Badot PM (2002). "Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*." Chemosphere **48**(6): 571-579.

Schneider MI, Sanchez N, Pineda S, Chi H et Ronco A (2009). "Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach." Chemosphere **76**(10): 1451-1455.

Schuytema GS, Nebeker AV et Griffis WL (1994). "Effects of dietary exposure to forest pesticides on the brown garden snail *Helix aspersa* Muller." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **26**(1): 23-28.

Scott-Fordsmand JJ et Krogh PH (2004). "The influence of application form on the toxicity of nonylphenol to *Folsomia fimetaria* (Collembola: Isotomidae)." Ecotoxicology and Environmental Safety **58**(3): 294-299.

Siimes K, Ramo S, Welling L, Nikunen U et Laitinen P (2006). "Comparison of the behaviour of three herbicides in a field experiment under bare soil conditions." Agricultural Water Management **84**(1-2): 53-64.

Snyman RG, Reinecke AJ et Reinecke SA (2005). "Quantitative changes in the digestive gland cells of the snail *Helix aspersa* after exposure to the fungicide copper oxychloride." Ecotoxicology and Environmental Safety **60**(1): 47-52.

Soso AB, Barcellos LJG, Ranzani-Paiva MJ, Kreutz LC, Quevedo RM, Anziliero D, Lima M, Silva LBd, Ritter F, Bedin AC et Finco JA (2007). "Chronic exposure to sub-lethal concentrations of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*)." Environmental Toxicology and Pharmacology **23**(3): 308-313.

Tate TM, Spurlock JO et Christian FA (1997). "Effect of glyphosate on the development of *Pseudosuccinea columella* snails." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **33**(3): 286-289.

Tejada M (2009). "Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides." Chemosphere **76**(3): 365-373.

UIPP (2009). Rapport d'activité 2008-2009. Union des Industries et de la Protection des Plantes.

Veiga F, Zapata JM, Fernandez Marcos ML et Alvarez E (2001). "Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain." The Science of The Total Environment **271**(1-3): 135-144.

Vincent C, Griffond B, Lucien G et Bride J (1984). "Etude *in vitro* de l'influence des corps dorsaux sur l'ovogénèse d'*Helix aspersa* Müll." General and Comparative Endocrinology **54**: 230-235.

Volkmar C, Lübke-Al Hussein M, Jany D, Hunold I, Richter L, Kreuter T et Wetzel T (2003). "Ecological studies on epigeous arthropod populations of transgenic sugar beet at Friemar (Thuringia, Germany)." Agriculture Ecosystems & Environment **95**(1): 37-47.

Wang YS, Jaw CG et Chen YL (1994). "Accumulation of 2,4-D and glyphosate in fish and water hyacinth." Water Air and Soil Pollution **74**(3-4): 397-403.

Widarto TH, Holmstrup M et Forbes VE (2004). "The influence of nonylphenol on life-history of the earthworm *Dendrobaena octaedra* Savigny: linking effects from the individual- to the population-level." Ecotoxicology and Environmental Safety **58**(2): 147-159.

Widarto TH, Krogh PH et Forbes VE (2007). "Nonylphenol stimulates fecundity but not population growth rate ([lambda]) of *Folsomia candida*." Ecotoxicology and Environmental Safety **67**(3): 369-377.

Yasmin S et D'Souza D (2007). "Effect of pesticides on the reproductive output of *Eisenia fetida*." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **79**(5): 529-532.

Zhang H, Wang H, Ji YL, Zhang Y, Yu T, Ning H, Zhang C, Zhao XF, Wang Q, Liu P et Xu DX (2010). "Maternal fenvalerate exposure during pregnancy persistently impairs testicular development and spermatogenesis in male offspring." Food and Chemical Toxicology **48**(5): 1160-1169.

III.4 Chapitre 4 : Dérive, dépôts, transfert et effets des pesticides sur l'escargot en conditions réelles d'application dans une parcelle de vigne

III.4.1 Snails as indicators of pesticide drift, deposit, transfer and effects in the vineyard

Cette partie a fait l'objet d'une publication soumise dans le journal *Science of the Total Environment* le 02 mars 2011. Les auteurs sont Coline Druart, Maurice Millet, Renaud Scheifler, Olivier Delhomme, caroline Raeppel et Annette de Vaufleury.

Résumé

Ce papier présente une étude au champ en conditions réelles d'application de pesticides sur la vigne. L'objectif est de mesurer l'exposition, le transfert et les effets des pesticides sur l'escargot terrestre *Helix aspersa*. Il n'y a pas de dérive des herbicides (glyphosate et glufosinate) tandis que les fongicides (cymoxanil, folpel, tébuconazole et pyraclostrobine) sont détectés jusqu'à 20 m de la parcelle traitée. Pour le folpel, et plus particulièrement le tébuconazole, les dépôts au sol (correspondant à des pertes pour la cible visée, c'est-à-dire les feuilles de vigne) sont importants (41,1% et 88,8% de la dose appliquée, respectivement). Pour les herbicides, la cible est le sol et les pertes (pourcentages des composés qui n'atteignent pas le sol) sont de 22% pour le glufosinate et 52% pour le glyphosate. Dans la parcelle, le glyphosate est détecté dans les tissus d'escargots (4 mg kg^{-1} masse sèche, MS), de même que son métabolite l'AMPA (8 mg kg^{-1} MS), probablement en relation avec une réduction de croissance observée chez ces escargots. Aucun effet sur la survie et la croissance n'est démontré pour les autres molécules organiques et pour les fongicides à base de soufre et de cuivre, bien qu'il y ait un transfert du milieu vers les escargots du tébuconazole, de la pyraclostrobine et du cuivre. Ce travail apporte des données de terrain originales sur le devenir des pesticides dans un agro-écosystème en conditions réelles d'application et montre qu'il peut y avoir transfert et effets des pesticides sur un organisme non cible.

Mots-clés : étude au champ, fongicides, herbicides, microcosme, croissance, bioaccumulation.

Abstract

This paper presents a field-study of real pesticide application conditions in a vineyard. The objective was to measure the exposure, the transfer and the effects of pesticides on a non-target soil invertebrate, the land snail *Helix aspersa*. There was no drift of the herbicides (glyphosate and glufosinate) whereas the fungicides (cymoxanil, folpet, tebuconazole and pyraclostrobin) were detected up to 20 m from the treated area. For folpet and particularly tebuconazole, spray deposits on soil (corresponding to losses for the intended target i.e. the vine leaves) were high (41.1% and 88.8% loss of applied dose, respectively). For herbicides, the target was the soil and losses (percentage of compounds which did not reach the soil) were of 22% for glufosinate and 52% for glyphosate. In the study plot, glyphosate was transferred to and accumulated in snail tissues (4 mg kg^{-1} dry weight, dw), as was its metabolite AMPA (8 mg kg^{-1} dw) which could be in relation with the reduced growth observed in snails. No effects on snail survival or growth were found after exposure to the other organic compounds or to copper and sulphur-fungicides, although transfer of tebuconazole, pyraclostrobin and copper occurred. This study brings original field data on the fate of pesticides in a vineyard agro-ecosystem under real conditions of application and shows that transfer and effects of pesticides to a non-target organism occurred.

Keywords: Field study, fungicide, herbicide, microcosm, growth, bioaccumulation.

III.4.1.1 Introduction

The intensive use of pesticides leads to chronic contamination of all compartments of the ecosystem (Aubertot *et al.* 2005; Arias-Estévez *et al.* 2008). European authorities are concerned to discover the risks for human and environment health (EC 2009). After an application, it is important to know the amount deposited on the soil, the losses and the drift to characterize the exposure of the non-target organisms to pesticides. Losses to the atmosphere and processes affecting them have been studied (Gil et Sinfort 2005) but few data concern the way losses in the soil impact on non-target terrestrial organisms. By modelling, de Jong *et al*. (2008) estimated that only 1% of spray deposits on soil of pesticide application caused 50%-effect on soil organisms (number of colonies of microorganisms, growth of plants and mortality of insects). Jansch *et al*. (2006) reviewed the field studies devoted to the effects of pesticides on soil invertebrates and pointed out that data such as soil concentrations, soil characterization or application techniques were often unavailable to correctly interpret the effects observed. In the terrestrial risk assessment of pesticides (under the Directive 91/414/EC), it appeared that the effects and transfer of pesticides to terrestrial organisms have scarcely been investigated *in situ* (EC 2002), except in earthworms for which a standardized bioassay (ISO 11268-3:1999) is available. Field or semi-field methods are necessary for improved risk assessment of pesticides and are the subject of a growing interest, e.g. for the development of the Terrestrial Model Ecosystem (Alonso *et al.* 2009; Schaeffer *et al.* 2010).

Vines are the crops that consume the largest quantities of pesticides in relation to tilled surfaces in France (UIPP 2009). Land snails may inhabit vineyards (Snyman *et al.* 2005) and may therefore be exposed to the pesticides applied. Snails may be exposed by three routes of contamination: the air, leading to cutaneous contact and respiration of aerosol; the soil, by cutaneous contact and ingestion, and plants mainly by ingestion as many snail species are primary consumers (Gomot de Vaufleury et Bispo 2000). They have proved their bioindicative capacities for metals in field studies (Dallinger *et al.* 2001). Field studies mostly consist in passive biomonitoring by the use of wild organisms but this method presents the drawbacks that the age and exposure history of the animals is unknown, and their daily or seasonal movements mean that it is never certain that the animals collected really are native. Using wild marked snails collected in uncontaminated areas and transplanted in abandoned, organic and conventional orchards, it has been shown that acetylcholinesterase (AChE) activity was significantly reduced in snails exposed in conventional orchards (Mazzia *et al.* 2011). An active biomonitoring approach has been developed, allowing the transplantation of

snails of known biological past as sentinels in microcosms. Such microcosms have already been used *in situ* with snails to assess the transfer of metals (Gomot de Vaufleury et Pihan 2000; Scheifler *et al.* 2003; Gimbert *et al.* 2008) but have not been used for pesticide assessment.

Here, we propose an integrated approach to assess the exposure, the transfer and the effects of vineyard pesticides on transplanted snails a whole growth season. Several commercial mixtures were used in the vineyard, totalling ten active ingredients (a.i.) applied during the agricultural cycle. The first aim of this study was to estimate the spray deposits on soil of pesticides at each application in the plot and at different distances from the application point. The second aim was to determine the possible effects of pesticide applications on mortality or growth of snails exposed in microcosms located in the plot or around it. Finally, this study investigated the accumulation of pesticides by snails exposed *in situ* at recommended field doses.

III.4.1.2 Materials and methods

III.4.1.2.1 Experimental sites and pesticide applications

The parcel (P) of vineyard studied, represented in Figure III.4.1, is located near Bergbieten (Bas Rhin, France) at 200 m of altitude. It covers 0.6 ha and is made up of into 28 rows. The plot delimited for the experiment was a rectangular area of 20 whole rows in the centre of the parcel. A border (B), one meter wide, surrounded the parcel. As the parcel is surrounded with other treated vineyards, a control zone (C) was defined in a meadow 1.4 km from the parcel. The soil of the parcel was defined as a clay-loam with a pH_{water} of 8.4 and an organic matter content of 2.9%.

Fungicide application (F) was carried out on alternate rows with an axial air-assisted sprayer Holder NI500 with two sets of three or five open nozzles and at 10 bars pressure. Herbicide applications (H) carried out on alternate rows with two directed-nozzle hydraulic sprayers at 1.8 bar pressure. The six treatments (two herbicides and four fungicides) are described in Table III.4.1.

Table III.4.1. Description of the pesticide treatments applied on the vineyard parcel of Bergbieten during the year 2008.

Treatment	Date	Commercial formulation	Active ingredients	Hectare dose
H1	May 1st 2008	Roundup® Flash	Glyphosate (450 g l^{-1})	4 l ha^{-1}
F1	May 29th 2008	Valiant® Flash	Cymoxanil (4%), Folpet (25%), Fosetyl-Aluminium (50%)	1.8 kg ha^{-1}
		Corail®	Tebuconazole (250 g l^{-1})	0.24 l ha^{-1}
F2	June 11th 2008	Valiant® Flash	Cymoxanil (4%), Folpet (25%), Fosetyl-Aluminium (50%)	2.74 kg ha^{-1}
		Corail®	Tebuconazole (250 g l^{-1})	0.37 l ha^{-1}
F3	June 27th 2008	Cabrio® Top	Pyraclostrobin (5%), Metiram-Zinc (55%)	1.78 kg ha^{-1}
F4	July 15th 2008	Bordeaux mixture	Copper (20%)	5.35 kg ha^{-1}
		Thiovit® RSR Disperss	Sulphur (80%)	
H2	July 25th 2008	Basta® F1	Glufosinate ammonium (150 g l^{-1})	5 l ha^{-1}

F = Fungicides; H = Herbicides

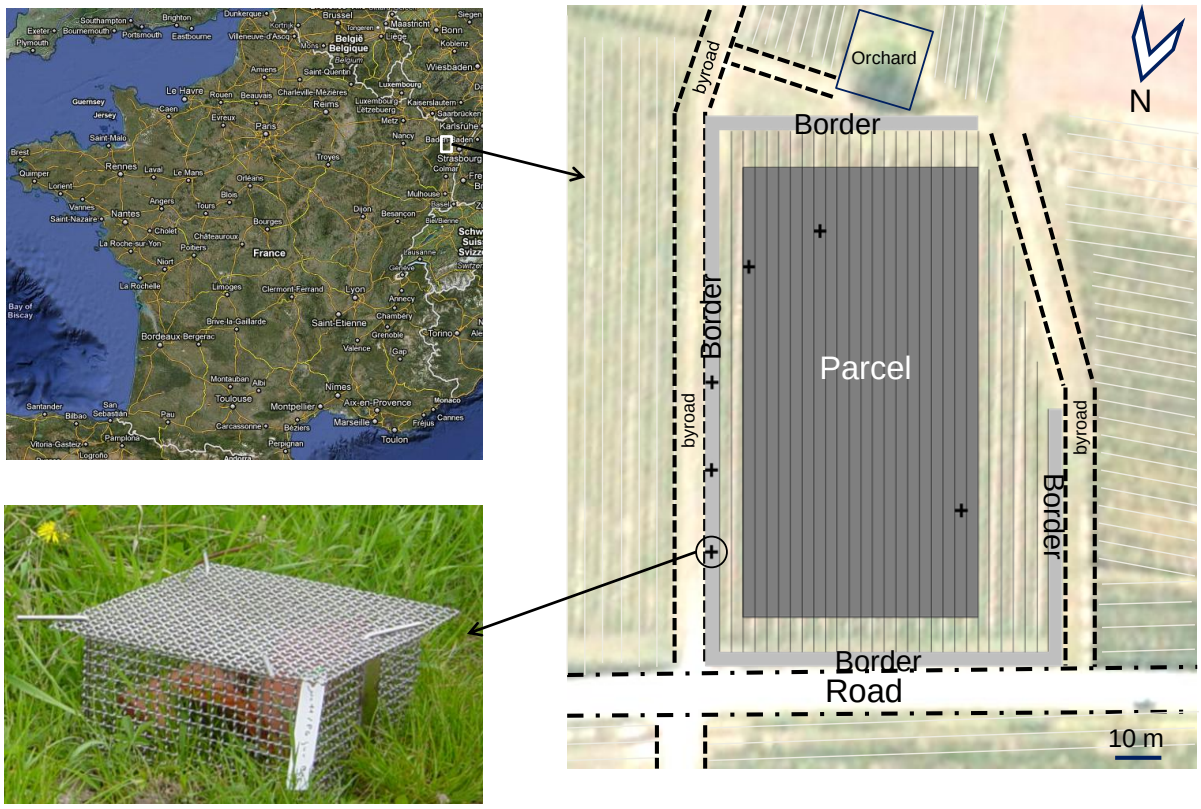


Figure III.4.1. Study site with the indication (cross) of the microcosms.

III.4.1.2.2 Snails and caging

Juvenile land snails *Helix aspersa aspersa* Müller 1774 (Syn. *Cantareus aspersus*) weighing between 4 and 7 g, came from our laboratory rearing (Gomot de Vaufleury 2000). Two days before each treatment, ninety snails were woken from aestivation by rehydration. Their initial mass and shell diameters were measured. Just before the first treatment, they were placed in microcosms in groups of ten. The microcosms were stainless steel cages of 25 x 25 x 15 cm (mesh size of grid: 1 cm) closed by a stainless steel grid of 30 x 30 cm (mesh size: 1 cm) held by four pickets (Figure III.4.1). The microcosms were placed in triplicates in each zone (Parcel, Border and Control = a total of nine). The locations of the microcosms in the control area and in the parcel were randomly determined (symbolized by crosses in the parcel; Figure III.4.1). To take into account the pesticide drift, the three microcosms on the border (about 14 m apart) were relocated so as to be downwind for each treatment. Soil and wild vegetation (mainly dandelions) in the microcosms were the only food sources for the snails during the duration of exposure. In the parcel, the microcosms were relocated in the centre of the row just after the treatments so that snails can eat vegetation. The snails remained in these cages until just prior to the next treatment (between 10 and 16 days), before being sampled. Then, they were placed for 48 h in wet boxes in the lab for starvation and rehydration. Their mass and shell diameter were measured again, giving an assessment of their growth during the exposure period. Then, they were killed by rapid freezing and kept frozen until analysis. The same operations that described above for the first treatment were renewed for the other treatments. Temperatures and precipitations during the experiments were provided by the public records for the meteorological station of Entzheim (Bas-Rhin, France) which was the nearest to Bergbieten (Figure III.4.2).

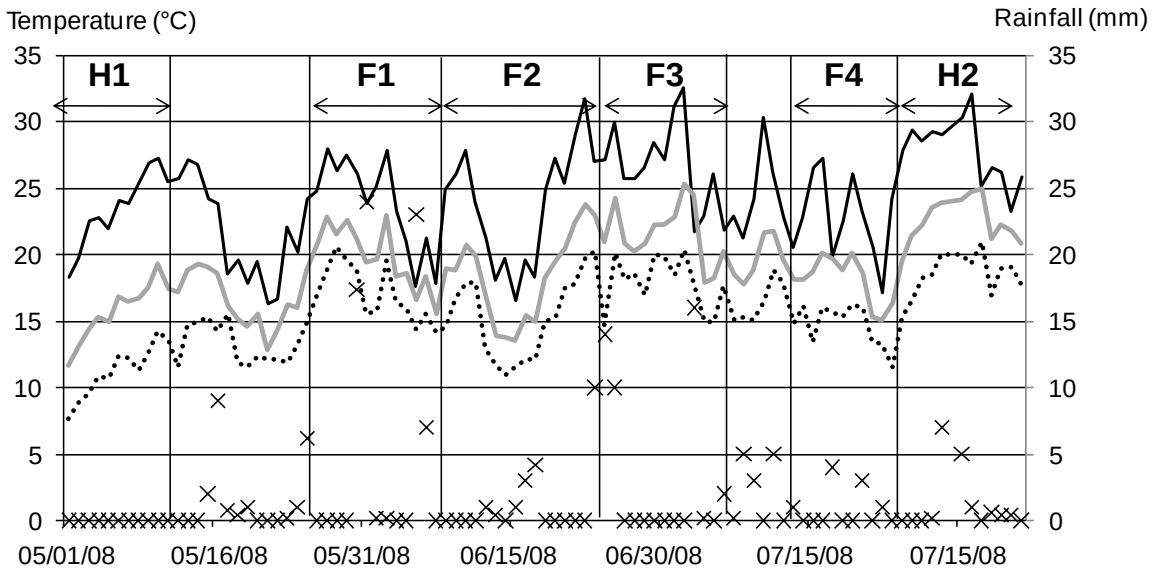


Figure III.4.2. Average (solid grey line), maximal (solid black line) and minimal temperatures (dotted black line) and rainfall (black crosses) during snail exposure. H1, H2: treatment with herbicides; F1 to F4: treatments with fungicides.

III.4.1.2.3 Spray deposits sampling

Stainless plates (for herbicides) or glass Petri dishes (for fungicides) were laid on the soil in the parcel (0 m) and at different distances downwind from the parcel before each treatment (except treatment F4). The maximal point of measure for herbicides was 3 m due to the low expected drift. For fungicides, it was not possible to measure drift after 8 m from the parcel for F3 and after 20 m for F1 and F2 due to the closeness of other vineyards. After the treatment, droplets deposited on the plates or dishes were retrieved in flasks with ultra-pure water for herbicides and ethyl acetate for fungicides and kept at -20°C until analysis. Temperatures, relative humidity and wind speed at the moment of each treatment were provided by the public records for the Entzheim station (Table III.4.2).

Table III.4.2. Meteorological data from the Entzheim station for the 1-h period corresponding to each treatment.

Treatment	Time	Temperature (°C)	Relative humidity (%)	Average wind speed (km h^{-1})
H1	10 am – 11 am	13.9 – 15.6	57 – 49	22 – 19
F1	14 pm – 15 pm	27 – 27.4	54 – 54	19 – 11
F2	16 pm – 17 pm	23.5 – 22.8	42 – 49	22 – 22
F3	16 pm – 17 pm	23.8 – 22.2	49 – 59	19 – 19
F4	10 am – 11 am	22.6 – 24	51 – 42	4 – 7
H2	17 pm – 18 pm	28.7 – 27.8	38 – 44	0 – 4

F = Fungicides; H = Herbicides

III.4.1.2.4 Drift sample analysis

For herbicides, 2.5 ml of each sample was derivatized with 250 µl of 9-fluorenylmethylchloroformate (FMOC-Cl) and 250 µl of borate buffer (pH = 9) for 1 h at room temperature under stirring. Then, liquid-liquid extraction was performed with 2 ml of ethyl ether and the extracts were injected into the HPLC system as described for soil extracts by Druart *et al*. (2011). Concentrations of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) were determined by peak integration compared with a standard at 0.5 mg l^{-1} injected before each extract. The quantification limits were 6 µg l^{-1} for glyphosate and AMPA and 9 µg l^{-1} for glufosinate.

Fungicide concentrations were determined by GC-MS. The samples were concentrated to about 0.5-0.8 ml by rotary evaporation and added to 1 ml of acetonitrile-dichloromethane (50:50 *v/v*) after addition of internal standards (4-nitrophenol-d4 for cymoxanil and tebuconazole, and atrazine for folpet and pyraclostrobin). A derivatization step was necessary because cymoxanil is not detected in direct injection: 300 µl of BSTFA + 1%TMCS were added to the sample and derivatization was performed for 1 h at 80°C under stirring. Extracts were then injected into the GC-MS (Chromatograph Autosystem XL GC Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) quadrupole system equipped with an auto-sampler. We used a 50% phenyl polysilphenylene-siloxane TR-50MS column (60 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness, Thermo Electron Corporation). Analyte solution (3 µl) was injected in splitless mode, at an injector temperature of 280°C, followed by a purge after 1 min. The oven temperature was programmed from 50°C (5 min) to 270°C at 10°C min^{-1} (3 min) then to 310°C at 10°C min^{-1} (8 min). Helium was used as carrying gas (1 ml min^{-1}). The MS ionization energy was 70 eV, the ion-source temperature was fixed at 280°C and the transfer line at 320°C. The data were acquired in Single Ion Monitoring (SIM) mode. The four compounds were identified by retention time and specific ions (*m/z* = 72-198 for cymoxanil, 104-130-260 for folpet, 168-250 for tebuconazole and 111-132-183 for pyraclostrobin), and quantified by the internal standard method. The quantification limits were 38.5 µg l^{-1} for cymoxanil and pyraclostrobin, 112.5 µg l^{-1} for folpet and 192.3 µg l^{-1} for tebuconazole.

These analyses were performed at the “Laboratoire des Matériaux, Surfaces et Procédés pour la Catalyse” of the University of Strasbourg.

III.4.1.2.5 Residue analysis in snails

Glyphosate, AMPA, cymoxanil, folpet, tebuconazole and pyraclostrobin residues in snails exposed to treatments H1, F1, F2 and F3 in the parcel were sent for analysis to the "IPL Santé Environnement durables" laboratories of Bordeaux and Lille (France). Snails exposed to H2 were not analysed because no method was available to determine glufosinate in animal tissues. Herbicide analyses were performed by FMOC-Cl post-column derivatization and HPLC with fluorescence detection and fungicide analyses were performed by LC-MS/MS. For quality testing reasons, snails from the control area during F1 and one sample of snails from our laboratory rearing were sent for analysis as controls for fungicide and herbicide, respectively. Due to the large quantity of tissue needed by the analytical procedures, the thirty snails of a zone (ten individuals per microcosm, three microcosms per zone) were pooled for each treatment. Quantification limits in fresh weight (fw) were 0.05 mg kg^{-1} for fungicides, 0.2 mg kg^{-1} for glyphosate and 0.5 mg kg^{-1} for AMPA. All concentrations for organic pesticides were initially expressed in mg kg^{-1} fw and were converted to dry weight (dw) by considering 80% of water content in snails (Gomot 1998).

In snails exposed to treatment F4, extraction and analysis of copper (Cu) and sulphur (S) were performed individually in each snail separated into foot and viscera, for each microcosm and for each zone (P, B and C). Because two methods were necessary to analyse Cu and S, a pool of half of the snails was used for Cu analysis, the other pool for S. Each pool contained 15 snails, except for the microcosms in the parcel in which only 21 snails remained instead of 30 because some escaped due to accidental opening of the cage.

After drying in an oven (65°C), samples for Cu analysis were digested in 4 ml of 65% HNO_3 for 48 h at 65°C. Then 15 ml ultrapure water was added and Cu concentrations were determined using an atomic absorption spectrophotometer (240FS, Varian, Les Ulis, France). The reliability of the analysis was assessed with a standard reference material (TORT-2, lobster hepatopancreas, from NRCC-CNRL, Canada). These analyses were performed at the Chrono-Environment department of the University of Franche-Comté.

After drying in an oven (65°C), samples for S analysis were reduced in powder using a grinding ball dispenser. Total S was analyzed on an automated elemental analyzer (Vario Max CNS, Elementar Analysensysteme, GmbH, Hanau, Germany) according to the principle of catalytic tube combustion and reduction under oxygen supply and high temperature (1140°C). The resulting gases (N_2, CO_2 and SO_2) were separated by specific adsorption column and quantified using a thermal conductivity detector. Sulfadiazine was used as a standard. These

analyses were performed at the Chrono-Environment department of the University of Franche-Comté.

III.4.1.2.6 Statistical analysis

At the end of each treatment, differences in mass or shell diameter were assessed using a linear mixed-effects model (LME), with zone as the fixed explanatory variable and with microcosm as the random variable to take into account pseudo-replication. Differences of Cu and S accumulation were also determined using a LME, either for each zone, with the type of tissue (foot or viscera) as the fixed variable and microcosm as the random variable or for each tissue, with the zone (P, B, C) as the fixed variable and microcosm as the random variable. When significant differences ($p < 0.05$) were found, post-hoc multiple comparisons were performed using Tukey's test. Mortality for each treatment between each zone and mortality between treatments all zones pooled, were assessed by a Poisson generalized linear model (GLM). These statistical analyses were performed with R software (2.9.2) (R Development Core Team, 2010).

III.4.1.3 Results and discussion

III.4.1.3.1 Spray deposits and drift

In this study, losses are defined as the proportion of the initial amount of each substance that does not reach the target. For herbicides, the target is the weeds on the soil, so the losses are inversely proportional to the spray deposits on the soil. For fungicides, the target is the vine foliage, so the losses are at least as great as the spray deposits on the soil (Table III.4.3).

Table III.4.3. Total spray deposits on soil (calculated on all the measured points from 0 to 20 m) and losses in percentage of applied dose for organic pesticides from treatments H1 to H2.

Treatment	Substance	Applied dose (g ha^{-1})	Spray deposits (g ha^{-1})	Spray deposits (% of applied dose)	Losses (% of applied dose)
H1	Glyphosate	1800	856.9 ± 332.6	47.6	52.4
F1	Cymoxanil	72	5.8 ± 1.2	8	> 8
	Folpet	450	181.2 ± 34.6	40.3	> 40.3
	Tebuconazole	60	53.3 ± 18	88.8	> 88.8
F2	Cymoxanil	109.6	7.3 ± 4.4	6.7	> 6.7
	Folpet	685	301.8 ± 105.9	44.1	> 44.1
	Tebuconazole	92.5	24.3 ± 16.8	26.3	> 26.3
F3	Pyraclostrobin	89	1.5 ± 0.7	1.7	> 1.7
H2	Glufosinate	750	588.1 ± 102.4	78.4	21.6

F = Fungicides; H = Herbicides.

No drift of herbicides occurred during treatments H1 and H2. Indeed, no spray deposit of glyphosate or glufosinate was recorded 1, 2 or 3 m from the parcel. This was attributed to the equipment employed for the application: the nozzles of the sprayer, 30 cm above the soil were funnelled downwards and produce big droplets, which are less liable to drift than smaller droplets (Cross *et al.* 2001). Successful spray deposit accounted for close to 80% of the applied dose for glufosinate (Table III.4.3), the soil, and more precisely the weeds, being the target for herbicides. However, for glyphosate, a loss of 52.4% of the applied product was recorded (Table III.4.3). It is unlikely that this loss is due to the degradation of the molecule because a very small proportion of AMPA (0.38 g ha^{-1}) was retrieved in the spray deposits of Roundup® (H1) in the parcel, strongly suggesting that the degradation did not occur during the time (about 2-3 h) between application and the freezing of samples. The losses could however be due to evaporation, which could be important during the first hours after the application, as demonstrated by Carlsen *et al*. (2006a) for various herbicides (but not glyphosate). Although a lower air temperature should have led to a lower evaporation (Carlsen *et al.* 2006b) in H1 deposits than in H2 (Table III.4.2), losses were higher for H1 than for H2 (Table III.4.3). The wind speed and the relative humidity, which were higher for H1 than for H2 (Table III.4.2), may have led to a higher evaporation as reported by Grass *et al.* (1994) for trifluralin. However, Vischetti *et al*. (2008) demonstrated that these two parameters also induced higher drift with chlorpiryfos, which was not the case in the present experiment (no drift for herbicides). Although glyphosate and glufosinate are not considered

as volatile compounds with regards to their vapour pressure and Henry's law constants, glyphosate is slightly more volatile than glufosinate (Table III.4.4), which could explain the difference of spray deposits between the two substances (Table III.4.3).

Table III.4.4. Volatility of pesticides studied in spray deposits, e.g. vapour pressure and Henry's law constant at 25°C (Source: Footprint database).

Compound	Vapour pressure (Pa)	Henry's law constant (Pa m^{-3} mol^{-1})
Glyphosate	$1.3x10^{-5}$	$2.1x10^{-7}$
Glufosinate ammonium	$3.1x10^{-5}$	$4.5x10^{-9}$
Cymoxanil	$1.5x10^{-4}$	$3.8x10^{-5}$
Folpet	$2.1x10^{-4}$	$8.0x10^{-3}$
Tebuconazole	$1.3x10^{-6}$	$1.0x10^{-5}$
Pyraclostrobin	$2.6x10^{-8}$	$5.3x10^{-6}$

Fungicide drift was detected up to 20 m for cymoxanil, folpet and tebuconazole and 8 m for pyraclostrobin (Figure III.4.3). There is no standard deviation at 0 m of treatment F1 and 5 m of treatment F2 in Figure III.4.3 because glass Petri dishes have been crushed by the passage of the tractor. High drift was expected since, unlike herbicides, fungicide application aims for the foliage (and the jets are not close to the soil as for herbicides) using a sprayer sending out fine droplets that are dispersed by a fan. This way of spraying fungicides is obviously more susceptible to air drift than herbicide spraying. However, spray deposits and drift patterns were very different for the four fungicides. Total spray deposits in percentage of applied dose were inconsequential for pyraclostrobin (Table III.4.3). For the three other compounds, they were high but variable, particularly for tebuconazole where successful deposit ranged from 26.3% during treatment F2 to 88.8 % during F1 (Table III.4.3). For folpet 40.3% of the applied dose was deposited during F1 and 44.1% during F2 (Table III.4.3). Unlike these compounds, cymoxanil, which was applied at the same time, was less successfully deposited with 8% during F1 and 6.7% during F2 (Table 3). Carlsen *et al.* (2006b) also demonstrated differences in spray deposits between compounds applied at the same time. These authors measured maximum spray deposits between 0.08% and 9.2% depending on the pesticide considered. The low proportion of deposited pyraclostrobin could be explained by the larger foliage surface of grapevines at the time of treatment F3, which occurred about 1 month after treatment F1 (Table III.4.1). During this period, the vegetation had grown, intercepting the applied products more efficiently. This hypothesis is also supported for treatments F1 and F2 because, in terms of percentage of applied dose, there was

more deposit during F1 than during F2 in the parcel, i.e. at 0 m (Figure III.4.3). This trend was reversed for folpet and reduced for cymoxanil and tebuconazole for the deposits more distant from the parcel (Figure III.4.3), which could be due to the absence of vegetation, and thus of interception. However, the drift (sum of spray deposits from 1 m to 20 m) remained higher for F1 than for F2 for tebuconazole (57 *vs* 13%) and cymoxanil (5.5 *vs* 4.3%) whereas air temperature was lower and wind velocity was higher for F2 (Table III.4.2). But for folpet (22.6 *vs* 28.5%), which is the more volatile compound (Table III.4.4), drift spray deposits are in accordance with these two meteorological parameters. The doses applied were higher for F2 than for F1 (Table III.4.3), which concordant with the results of folpet and cymoxanil, where the concentrations on the soil were higher for F2 than for F1 (Table III.4.3). However, the concentration of tebuconazole deposited on the soil was higher for F1 (Table III.4.3), whatever the drift point, showing a different behaviour of this compound. This could be explained by the lower volatility of tebuconazole in relation to the two other compounds (Table III.4.4), leading to greater deposits on soil or leaves. In the case of F1, the deposits occurred on soil, and in the case of F2, deposits may occur on leaves of grapevines due to the higher surface area of the leaves.

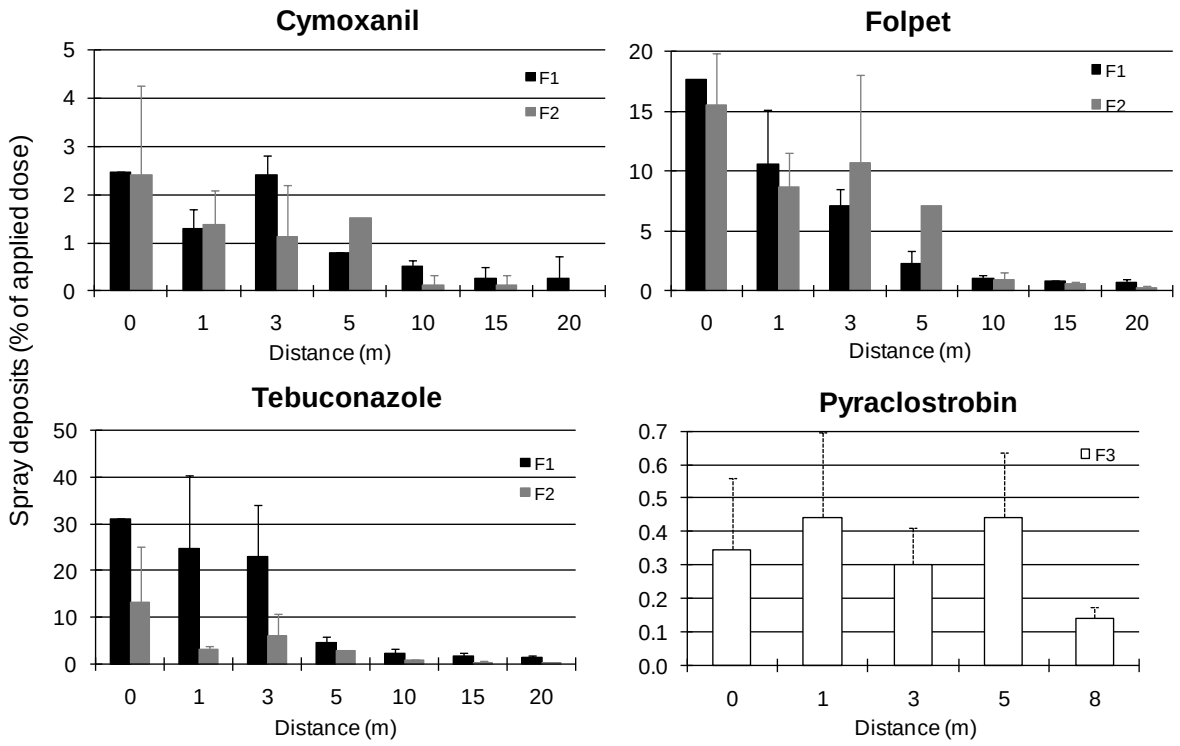


Figure III.4.3. Spray deposits on soil (in percentage of the applied dose) of cymoxanil and folpet (Valiant® Flash), of tebuconazole (Corail®) and of pyraclostrobin (Cabrio® Top) as a function of the distance after treatments F1, F2 and F3. Plots represent means with standard deviations.

Overall, the data showed that pesticide deposits or losses are difficult to account for on the basis of variations of climatic parameters, as reported by Carlsen *et al.* (2006a). The influence of meteorological data (wind speed, relative humidity, air temperature) and droplet size on deposit and drift of chemicals has been confirmed, for example by Gil *et al.* (2007) with a fluorescent tracer; however the study does not consider the physico-chemical characteristics of the substances or variation of the interception by the surface of plant leaves according to the season. While the models developed by these authors do help understanding the mechanisms involved in pesticide dispersion, they cannot currently replace experiments performed in real conditions of pesticide application.

III.4.1.3.2 Transfer and bioaccumulation

None of the organic pesticides studied was detected in the control samples.

Accumulation of glyphosate and AMPA was found in snails on the parcel exposed to Roundup® Flash 12 days after treatment H1 (Table III.4.5). With regards to its physico-chemical properties, like its negative log of K_{ow} (-3.2) or its high solubility in water (10500 mg l^{-1}), accumulation of glyphosate was not expected in animal tissues. To our best knowledge, only two published studies have already demonstrated that glyphosate may accumulate, in a fish (Wang *et al.* 1994) and in a freshwater oligochaete (Contardo-Jara *et al.* 2009). However, these studies measured radioactivity in organisms after exposure to ^{14}C-labeled glyphosate and did not allow the identification of the relative proportions of the parent compound and the metabolites. The high levels of glyphosate deposited on soil probably led to transfer to snail by cutaneous, digestive and/or respiratory exposure. The concentration of AMPA was two-fold higher than that of glyphosate, showing that metabolisation and accumulation of the metabolite occurred in tissues after 12 days exposure. Contardo-Jara *et al.* (2009) found that Roundup® exposure strongly enhanced the activity of glutathione S-transferase (GST), a detoxification and biotransformation enzyme, in worms. As *H. aspersa* presents GST activities (Ismert *et al.* 2002), the presence of AMPA in snails could be linked to this biotransformation activity. The maximum residue level (MRL) for glyphosate in food of animal origin, which is a figure used in risk assessment for humans, was determined as 0.1 mg kg^{-1} because previous "studies show that there is very little transfer of residues [glyphosate and AMPA] from feed to animal tissues and no bioaccumulation of residues occurs" (Reding 2003). However, we demonstrate here that 12 days after one field application, glyphosate and its metabolite are present in snail tissues and at concentrations

higher than the proposed MRL for an animal consumed by humans. Therefore, our results suggest that current MRL values for glyphosate should be reevaluated.

Table III.4.5. Accumulation of pesticides in snails of the parcel and effects after each treatment between snails of each zone.

Treatment	Exposure time	Substance	Concentrations in snails (mg kg^{-1} fw)	Concentrations in snails (mg kg^{-1} dw)	Significant differences of mass between zones
H1	12 days	Glyphosate	0.8	4	P < C and P < B
		AMPA	1.6	8	
F1	13 days	Cymoxanil	<LOQ	ND	No difference
		Folpet	<LOQ	ND	
		Tebuconazole	0.08	0.4	
F2	16 days	Cymoxanil	<LOQ	ND	No difference
		Folpet	<LOQ	ND	
		Tebuconazole	0.16	0.8	
		Pyraclostrobin	0.14	0.7	
F3	13 days	Pyraclostrobin	<LOQ	ND	C < B and C < P
F4	10 days	Cu	ND	See Figure 4	No difference
		S	ND	See Figure 4	
H2	11 days	Glufosinate	ND	ND	No difference

F = Fungicides; H = Herbicides; C = Control; B = Border; P = Parcel; LOQ: limit of quantification; ND: non determined

No accumulations of folpet and cymoxanil were found in snails after exposure to treatments F1 and F2 (Table III.4.5). This is in agreement with Schreck *et al*. (2008) who did not detect folpet in earthworms after 14 days exposure to soil contaminated at 1.6 mg kg^{-1} (roughly corresponding to applied concentrations in this study). These authors hypothesized that no parent compound was found because it had been metabolised. Otherwise, folpet being volatile, a possible revolatilisation from the soil may have occurred, leading to a decrease of exposure concentrations. To our knowledge, no data are available about the transfer or the accumulation of cymoxanil in animals in the literature. The absence of residues in snails could be explained by the low log of K_{ow} (0.67) but, as mentioned for glyphosate, it is not always a key parameter for the prediction of bioaccumulation in tissues. Tebuconazole was found in snails exposed to both treatments F1 and F2 (Table III.4.5), but the concentrations were inversely correlated with spray deposit (more in F1 than in F2, Table III.4.3). It is likely that

there was more degradation of tebuconazole in spray deposits during F1 due to the higher temperatures during the first 6 days (Figure III.4.2), leading to a decrease in bioavailable concentrations for snails in the first days. Pyraclostrobin was found in the snail sample exposed to treatment F2 but not to treatment F3 (Table III.4.5). Considering the low level of spray deposition after treatment F3 (Table III.4.3), it is not surprising that pyraclostrobin was not detected in this last sample. However, the accumulation observed in snails exposed to F2 was much more unexpected because Cabrio® Top had not been applied in this treatment and no pyraclostrobin was found in spray deposits. The most probable explanation is that a pyraclostrobin-based formulation was applied during the 13-days exposure of snails (between June 28th and July 10th) in a close vineyard but it was not possible to verify this information. Like for glyphosate, the MRL values in animal foodstuff for pyraclostrobin and tebuconazole were lower than the concentrations found here (Table III.4.5), the MRL for snails, for instance, being 0.05 mg kg^{-1} (EC 2008).

Cu is an element naturally present in snails, both in the foot and in the viscera (Gomot et Pihan 1997; Dallinger *et al.* 2005). Concentrations in snails were compared between zones and between the two parts of the body (Figure III.4.4). In all zones, concentrations of Cu in the foot were significantly higher than in the viscera. Cu concentrations in the foot decreased significantly with increasing distance from the parcel. This was also the case for the viscera although no significant difference of concentrations was found between snails exposed in the parcel and snails exposed in its border. On the basis of the classes of contamination in the viscera proposed by Pihan and de Vaufleury (2000) to qualify environmental quality of various field sites, snails of all zones belong to class I (i.e. Cu concentration in the viscera <130 mg kg^{-1}). The Cu concentration in soil of the parcel was 41.1 mg kg^{-1} before the treatments which is higher than the geochemical background in this region (19.7 mg kg^{-1}, BDETM database) and is in agreement with other Cu concentrations reported in vineyards (Eijsackers *et al.* 2005; Komárek *et al.* 2010). Like Cu, S is an essential element entering in the composition of proteins, which is present in animal tissues, for instance at a level of 0.3% in human body (Frieden 1972). We found higher concentrations in the foot than in viscera, except in the parcel, suggesting that accumulation occurred in viscera (Figure III.4.4).

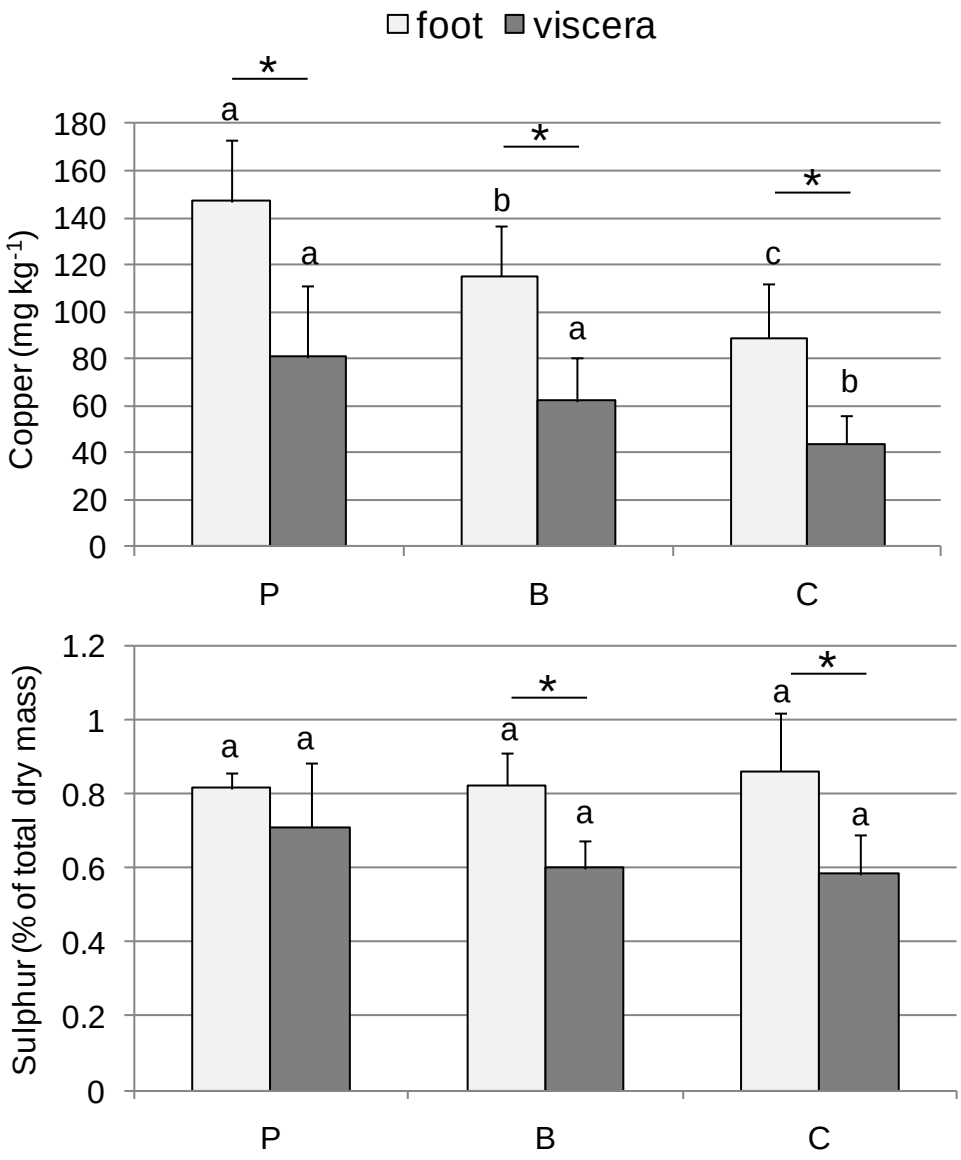


Figure III.4.4. Copper and sulphur concentrations in snails (foot and viscera) after ten days exposure to treatment F4 in the three zones (C, control; B, border; P, parcel). Letters indicate differences (< 0.05) between zones for foot and viscera, respectively and asterisks indicate differences (< 0.05) for each zone between foot and viscera.

III.4.1.3.3 Mortality and growth of snails

After each treatment, no significant difference of mortality between zones was found (Figure III.4.5). This no-effect on snail survival means that exposure concentrations of pesticides (applied individually or at the same time for certain compounds) represented by spray deposits (Table III.4.3), were not lethal to snails. In agreement with our results on mortality, high concentration of 5000 mg kg^{-1} of glyphosate was not lethal by ingestion, for *H. aspersa* snails (Schuytema *et al.* 1994). We only found a significant increase of the mortality after treatment F3, when adding the mortality of the 3 zones (parcel, border and

control). This could be explained by the particularly warm and dry weather during this period (Figure 2), conditions that are well known to be not favourable to snails (Kerney *et al.* 2006). The lower mortality in the parcel compared to the border and the control zones (either having short herbaceous or no vegetation) during F3 could be due to the shadiness brought by the foliage of the vineyard, which probably protects the snails from the sun.

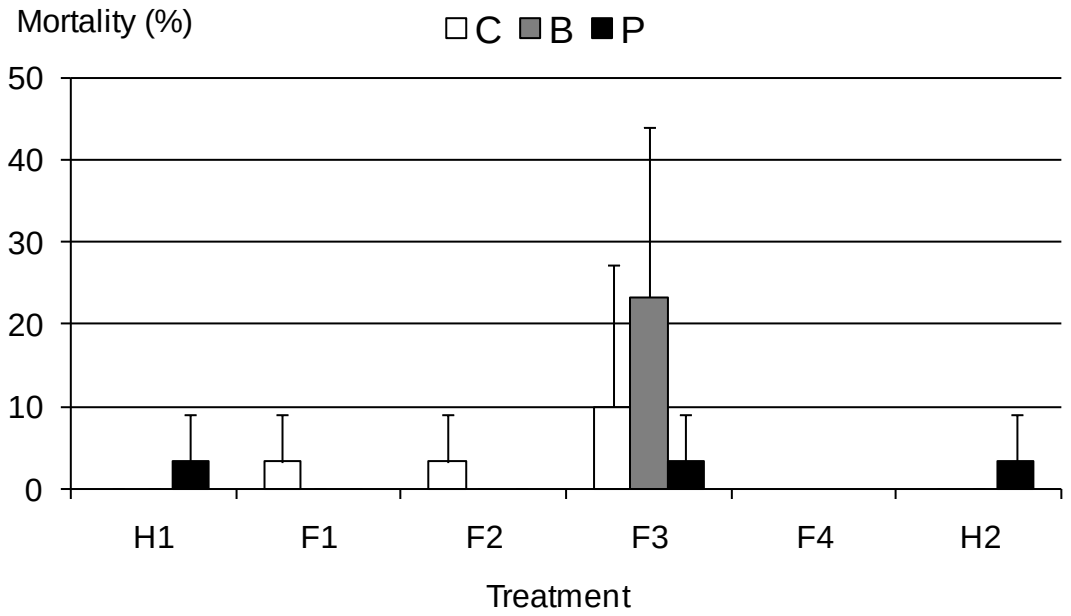


Figure III.4.5. Average mortality (in percentage) of snails in microcosms for the three zones (C, control; B, border; P, parcel) and the six treatments (F, fungicides; H, herbicides).

Irrespective of the treatment, the growth of snails was not affected in terms of shell diameter. Regarding initial biomasses, those of snails exposed before each treatment never differed significantly, except before H1 where snails exposed in the parcel were heavier than snails exposed in the border. Comparing the final biomasses, significant differences of weight between zones were found after two treatments, H1 and F3 (Table III.4.5). For H1, and despite the difference observed at the beginning of the exposure, snails exposed in the parcel were significantly lighter than snails from the border or the control zones, suggesting a deleterious effect of the application of Roundup® on snail growth. This is in agreement with the high concentration of glyphosate deposited on the soil (857 g ha^{-1}, i.e. about 1.2 mg kg^{-1} in soil, considering a vertical distribution in the first 5 cm and a soil density of 1.4) and the accumulation of the compound observed in snail tissues. The absence of difference between snails from the border and the control zones is also in agreement with the fact that no drift of herbicides was observed and, therefore, that snails present in the border of the parcel were not exposed to the herbicide. The reduced growth of snails exposed to a field dose of glyphosate

was unexpected considering the low toxicity generally reported for soil organisms. For example, Dalby *et al*. (1995) did not show any effect of glyphosate on survival and growth of earthworms at recommended field concentrations. Toxicity of glyphosate has been reported but at higher rates of application than here. For example, Yasmin and D'Souza (2007) showed a decrease in growth of earthworms but only for a high concentration in soil (8 mg kg^{-1}, i.e. 5760 g ha^{-1}) of a glyphosate-based formulation (Glycel®). In earthworms exposed to soil sprayed with 1440 g ha^{-1} of Roundup®, Casabe *et al*. (2007) observed a significant reduction of fertility and feeding, as well as alterations at subcellular levels (revealed by positive NRRT and Comet assays). The effects observed in the present study could be due to the spray leading to cutaneous exposure. It has already been demonstrated that snails exposed by cutaneous route to pesticide (dimethoate) were more affected than those exposed only by digestive route (Coeurdassier *et al.* 2002). On the other hand, Contardo-Jara *et al*. (2009) assumed that detoxification and biotransformation require energy (synthesis of biotransformation enzyme or for elimination) to the detriment of other activities like growth. Thus, the effects of glyphosate we observed on growth may also be explained by indirect effects due to energy requirements for glyphosate detoxification, which occurred in snail tissues in the present study as proved by detectable AMPA concentrations. Toxicity of AMPA could also be involved although very little information is available on that point. We only found a study reporting a low effect on earthworm reproduction (NOEC = 28.1 mg kg-1, Traas et Smit 2003).

No effect of pesticides on snail growth was observed after the other treatments, although an accumulation was highlighted for tebuconazole and pyraclostrobin. The literature is poor on the effects or the toxicity of the products (or their a.i.) used in F1, F2 and F3 treatments on soil organisms. A study demonstrated a significant response of two stress biomarkers (AChE and catalase activity) on earthworms after 3 or 7 days exposure to recommended doses of a mixture of four fungicides including folpet and fosetyl-Al (Schreck *et al.* 2008). The effects of cymoxanil and tebuconazole have only been studied on aquatic organisms and were revealed as slightly toxic (Pagano 2001; Guida *et al.* 2008; Kreutz *et al.* 2008; Adam *et al.* 2009; Ferreira *et al.* 2010; Sancho *et al.* 2010). No data was found for pyraclostrobin or metiram-Zn.

We observed for F3 that the weight of control snails was lower than that of snails in other zones (Table III.4.5). This may be due to overexposure of the control snails to heat, as they did not benefit from the shading of the canopy which the snails in the parcel had. This is in

line with the results obtained on mortality, which was higher for F3, maybe due to the high temperatures and low humidity observed during this period (Figure III.4.2).

The spray deposits for treatment F4 were not measured but, according to concentrations in snails, exposure occurred and these Cu or S-based fungicides did not cause toxic effects on snail survival or growth. Copper is an essential metal for snails, which is a constituent of hemocyanin, their oxygen carrying respiratory protein (El-Gendy *et al.* 2009). The highest concentration found in tissues (147 mg kg^{-1}) in the present study is unlikely to produce deleterious effects on growth since Gomot and Pihan (1997) observed concentration of Cu in foot reaching 2113 mg kg^{-1} without signs of toxicity. Actually, snails have efficient detoxification systems partly composed of metallothioneins, which are able to bind metals (Dallinger *et al.* 2005; Schuler *et al.* 2008) and to limit or avoid toxicity. However, El-Gendy *et al*. (2009) determined an LD_{50} of copper sulphate (the form of Cu used in Bordeaux mixture) of 26.5 µg $snail^{-1}$ when this dose was applied directly on the surface of the body of *Theba pisana*. By comparison, the applied concentration in Bergbieten vineyard was 38 g l^{-1} of Bordeaux mixture in the tank (i.e. 7.6 g l^{-1} of Cu sulphate). Therefore, this application may have constituted a risk if droplets (10 µl, i.e. 76 µg $snail^{-1}$) had fallen directly on snail bodies. The effects of sulphur-based fungicides were poorly studied on non-target species. It is commonly recognized that its application significantly reduced the density of pests (such as spider mites) but also of their predators (Prischmann *et al.* 2005). Direct pulverisation of sulphur solution on coccinellids (mycophagous coleopteran) at 3.8 g l^{-1} led to 100% mortality after 24 h (Sutherland *et al.* 2010), whereas, in Bergbieten vineyard, an application of 30.4 g l^{-1} of S had no observed effect on snails.

No observed effect was found during H2, in agreement with the literature where glufosinate was reported as non-toxic, e.g. by Volkmar *et al.* (2003) studying arthropod ecology (diversity, population density after 3 years of treatment) or by Dinehart *et al.* (2009) who demonstrated that concentration of 448 g ha^{-1} was not lethal for juvenile toads. This is also in agreement with the low toxicity determined by Kang *et al*. (2001) in juvenile springtails, with a high LC_{50} (19800 g ha^{-1}) which is much higher than the 588 g ha^{-1} of exposure concentration in this study.

III.4.1.4 Conclusion

The pesticides showed very different fates (deposition and drift) after their application in the vineyard. Several studies carried out in real conditions (in field or reconstituted crops)

found contradictory results or disagree concerning the parameters (droplet size, wind velocity, air temperature, vapour pressure of compound, atmospheric stability and relative humidity) that mainly influence the losses to air or to the soil. For fungicides, losses (spray deposition on non-target surfaces) were very high, reaching close to 90% for certain compounds, indicating a very low efficiency of the application and a high exposure for soil organisms. Transfer of pesticides to the snail was demonstrated for glyphosate, tebuconazole and pyraclostrobin, at concentrations higher than the MRL in animal foodstuffs. However, no damaging effect was observed in snails, except for glyphosate, the active ingredient of Roundup®, probably in relation with heavy spray deposits on the soil, accumulation and metabolisation of the compound in the tissues. This last result showed the suitability of the experimental design (drift measurement and microcosms) to assess exposure, transfer and effects of pesticides to transplanted organisms.

Acknowledgements

This work was financially supported by grants from the ADEME (“Agence De l’Environnement et de la Maîtrise de l’Energie”), the “Conseil Régional de Franche-Comté”, the ERICHE (“Evaluer et Réduire l’Impact de la Chimie sur l’Environnement”) network of the CNRS, the interdisciplinary INSU-CNRS program EC2CO (“Ecosphère Continentale et Côtière” CYTRIX, “Cycles hydro-biogéochimiques, transferts et impact écotoxicologique”) and the AFFDU (“Association des Femmes Françaises Diplômées de l’Université”). We thank Matthieu Moser, who kindly allowed realizing our experiment in his vineyard, and for information about his agricultural practices. We also thank Pierre-Emmanuel Baurand, Nadia Crini and Christophe Loup for their technical help.

III.4.2 Références

Sites internet

BDETM (database on trace metallic elements in agricultural soils) available on the website http://www.gissol.fr/programme/bdetm/Collecte_2/index.php. Last access: 2011-02-01.

Footprint database (creating tools for pesticide risk assessment and management in Europe) available on the website http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/fr/index.htm. Last access: 2011-02-10.

Publications

(ISO 11268-3:1999). Effects of pollutants on earthworms - Part 3: Guidance on the determination of effects in field situations. Soil quality

Adam O, Badot PM, Degiorgi F et Crini G (2009). "Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.)." Ecotoxicology and Environmental Safety **72**(2): 441-449.

Alonso E, González-Núñez M, Carbonell G, Fernández C et Tarazona JV (2009). "Bioaccumulation assessment via an adapted multi-species soil system (MS·3) and its application using cadmium." Ecotoxicology and Environmental Safety **72**(4): 1038-1044.

Arias-Estévez M, López-Periago E, Martínez-Carballo E, Simal-Gándara J, Mejuto J-C et García-Río L (2008). "The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources." Agriculture Ecosystems & Environment **123**(4): 247-260.

Aubertot JN, Barbier JM, Carpentier A, Gril JJ, Guichard L, Lucas P, Savary S, Savini I et Voltz M (2005). Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'expertise scientifique collective, synthèse du rapport. INRA et Cemagref (France).

Carlsen S, Spliid N et Svensmark B (2006a). "Drift of 10 herbicides after tractor spray application. 1. Secondary drift (evaporation)." Chemosphere **64**(5): 787-794.

Carlsen S, Spliid N et Svensmark B (2006b). "Drift of 10 herbicides after tractor spray application. 2. Primary drift (droplet drift)." Chemosphere **64**(5): 778-786.

Casabe N, Piola L, Fuchs J, Oneto ML, Pamparato L, Basack S, Gimenez R, Massaro R, Papa JC et Kesten E (2007). "Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field." Journal of Soils and Sediments **7**(4): 232-239.

Coeurdassier M, Gomot de Vaufleury A, Saint-Denis M, Ribera D, Narbonne JF et Badot PM (2002). "Effects of dimethoate on snail B-esterase and growth as a function of dose, time and exposure route in a laboratory bioassay." Biomarkers **7**(2): 138-150.

Contardo-Jara V, Klingelmann E et Wiegand C (2009). "Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes." Environmental Pollution **157**(1): 57-63.

Cross JV, Walklate PJ, Murray RA et Richardson GM (2001). "Spray deposits and losses in different sized apple trees from an axial fan orchard sprayer: 2. Effects of spray quality." Crop Protection **20**(4): 333-343.

Dalby PR, Baker GH et Smith SE (1995). "Glyphosate, 2,4-DB and dimethoate: Effects on earthworm survival and growth." Soil Biology and Biochemistry **27**(12): 1661-1662.

Dallinger R, Berger B, Triebskorn-Köhler R et Köhler H (2001). Soil biology and ecotoxicology. The biology of terrestrial molluscs. Barker GM. Oxon, CABI**:** 489-525.

Dallinger R, Chabicovsky M, Hödl E, Prem C, Hunziker P et Manzl C (2005). "Copper in *Helix pomatia* (Gastropoda) is regulated by one single cell type: differently responsive metal pools in rhogocytes." American Journal of Physiology **184**(4): R1185-R1195.

de Jong FMW, de Snoo GR et van de Zande JC (2008). "Estimated nationwide effects of pesticide spray drift on terrestrial habitats in the Netherlands." Journal of Environmental Management **86**(4): 721-730.

Dinehart SK, Smith LM, McMurry ST, Anderson TA, Smith PN et Haukos DA (2009). "Toxicity of a glufosinate- and several glyphosate-based herbicides to juvenile amphibians from the Southern High Plains, USA." Science of the Total Environment **407**(3): 1065-1071.

Druart C, Delhomme O, de Vaufleury A, Ntcho E et Millet M (2011). "Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil." Analytical and Bioanalytical Chemistry **399**: 1725-1732.

EC (2002). DRAFT working document. Guidance document on terrestrial ecotoxicology under Council directive 91/414/EC. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General.

EC (2008). "Commission Regulation (EC) No 839/2008 of 31 July 2008 amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards Annexes II, III and IV on maximum residue levels of pesticides in or on certain products." Official Journal of the European Union **L 234**: 1-216.

EC (2009). "Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides (Text with EEA relevance)." Official Journal of the European Union **L309/71**.

Eijsackers H, Beneke P, Maboeta M, Louw JPE et Reinecke AJ (2005). "The implications of copper fungicide usage in vineyards for earthworm activity and resulting sustainable soil quality." Ecotoxicology and Environmental Safety **62**(1): 99-111.

El-Gendy KS, Radwan MA et Gad AF (2009). "In vivo evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail, *Theba pisana* exposed to copper-based pesticides." Chemosphere **77**(3): 339-344.

Ferreira D, Motta ACd, Kreutz LC, Toni C, Loro VL et Barcellos LJG (2010). "Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals." Chemosphere **79**(9): 914-921.

Frieden E (1972). "The chemical elements of life." Scientific American **July**: 52-60.

Gil Y et Sinfort C (2005). "Emission of pesticides to the air during sprayer application: A bibliographic review." Atmospheric Environment **39**(28): 5183-5193.

Gil Y, Sinfort C, Brunet Y, Polveche V et Bonicelli B (2007). "Atmospheric loss of pesticides above an artificial vineyard during air-assisted spraying." Atmospheric Environment **41**(14): 2945-2957.

Gimbert F, Mench M, Coeurdassier M, Badot P-M et de Vaufleury A (2008). "Kinetic and dynamic aspects of soil-plant-snail transfer of cadmium in the field." Environmental Pollution **152**(3): 736-745.

Gomot A (1998). "Biochimical composition of *Helix* snails: influence of genetic and physiological factors." Journal of Molluscan Studies **64**: 173-181.

Gomot A et Pihan F (1997). "Comparison of the bioaccumulation capacities of copper and zinc in two snail subspecies (*Helix*)." Ecotoxicology and Environmental Safety **38**(2): 85-94.

Gomot de Vaufleury A (2000). "Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*." Ecotoxicology and Environmental Safety **46**: 41-50.

Gomot de Vaufleury A et Bispo A (2000). "Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails. 1. Sublethal effects on growth." Environmental Science and Technology **34**(9): 1865-1870.

Gomot de Vaufleury A et Pihan F (2000). "Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements." Chemosphere **40**(3): 275-284.

Grass B, Wenclawiak BW et Rüdel H (1994). "Influence of air velocity, air temperature, and air humidity on the volatilisation of trifluralin from soil." Chemosphere **28**(3): 491-499.

Guida M, Inglese M et Meriç S (2008). "A multi-battery toxicity investigation on fungicides." Desalination **226**(1-3): 262-270.

Ismert M, Oster T et Bagrel D (2002). "Effects of atmospheric exposure to naphthalene on xenobiotic-metabolising enzymes in the snail *Helix aspersa*." Chemosphere **46**(2): 273-280.

Jansch S, Frampton GK, Rombke J, Van Den Brink PJ et Scott-Fordsmand JJ (2006). "Effects of pesticides on soil invertebrates in model ecosystem and field studies: A review and comparison with laboratory toxicity data." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(9): 2490-2501.

Kang S, Choi WI et Ryoo MI (2001). "Demography of *Paronychiurus kimi* (Lee) (Collembola: Onychiuridae) under the influence of glufosinate-ammonium on plaster charcoal substrate and in artificial soil." Applied Soil Ecology **18**(1): 39-45.

Kerney M, Cameron R et Bertrand A (2006). A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe, French ed. Paris, Delachaux et Niestlé SA.

Komárek M, Cadková E, Chrastný V, Bordas F et Bollinger J-C (2010). "Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects." Environment International **36**(1): 138-151.

Kreutz LC, Barcellos LJG, Silva TO, Anziliero D, Martins D, Lorenson M, Marteninghe A et Da Silva LB (2008). "Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings." Ciencia Rural **38**(4): 1050-1055.

Mazzia C, Capowiez Y, Sanchez-Hernandez JC, Köhler H-R, Triebskorn R et Rault M (2011). "Acetylcholinesterase activity in the terrestrial snail *Xeropicta derbentina* transplanted in apple orchards with different pesticide management strategies." Environmental Pollution **159**(1): 319-323.

Pagano G (2001). "Factors affecting R6 fungicide toxicity on sea urchin fertilization and early development: Roles of exposure routes and mixture components." Human & Experimental Toxicology **20**(8): 404-411.

Pihan F et de Vaufleury A (2000). "The snail as a target organism for the evaluation of industrial waste dump contamination and the efficiency of its remediation." Ecotoxicology and Environmental Safety **46**(2): 137-147.

Prischmann DA, James DG, Wright LC, Teneyck RD et Snyder WE (2005). "Effects of chlorpyrifos and sulfur on spider mites (Acari: Tetranychidae) and their natural enemies." Biological Control **33**(3): 324-334.

Reding MA (2003). Evaluation of the impact of glyphosate residues in food on human health. Monsanto. Brussels.

Sancho E, Villarroel MJ, Fernandez C, Andreu E et Ferrando MD (2010). "Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*)." Ecotoxicology and Environmental Safety **73**(3): 370-376.

Schaeffer A, Van Den Brink PJ, Heimbach F, Hoy SP, de Jong FMW, Rombke J, Roß-Nickoll M et Sousa JP (2010). Semi-field methods for the environmental risk assessment of pesticides in soil, 1st ed. Boca Raton, CRC Press 144pp.

Scheifler R, Brahim MB, Gomot de Vaufleury A, Carnus JM et Badot PM (2003). "A field method using microcosms to evaluate transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from sewage sludge amended forest soils to *Helix aspersa* snails." Environmental Pollution **122**(3): 343-350.

Schreck E, Geret F, Gontier L et Treilhou M (2008). "Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*." Chemosphere **71**(10): 1832-1839.

Schuler D, Dallinger R, Hispard F et de Vaufleury A (2008). "Biochemical characterization of metallothionein isoforms in terrestrial snails: Relationship between amino acid sequence and metal binding specificity." Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology **151**(1, Supplement 1): S20.

Schuytema GS, Nebeker AV et Griffis WL (1994). "Effects of dietary exposure to forest pesticides on the brown garden snail *Helix aspersa* Muller." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **26**(1): 23-28.

Snyman RG, Reinecke AJ et Reinecke SA (2005). "Quantitative changes in the digestive gland cells of the snail *Helix aspersa* after exposure to the fungicide copper oxychloride." Ecotoxicology and Environmental Safety **60**(1): 47-52.

Sutherland AM, Gubler WD et Parrella MP (2010). "Effects of fungicides on a mycophagous coccinellid may represent integration failure in disease management." Biological Control **54**(3): 292-299.

Traas TP et Smit CE (2003). Environmental risk limits for aminomethylphosphonic acid (AMPA). RIVM, National Institute of Public Health and the Environment.

UIPP (2009). Rapport d'activité 2008-2009. Union des Industries et de la Protection des Plantes.

Vischetti C, Cardinali A, Monaci E, Nicelli M, Ferrari F, Trevisan M et Capri E (2008). "Measures to reduce pesticide spray drift in a small aquatic ecosystem in vineyard estate." Science of the Total Environment **389**(2-3): 497-502.

Volkmar C, Lübke-Al Hussein M, Jany D, Hunold I, Richter L, Kreuter T et Wetzel T (2003). "Ecological studies on epigeous arthropod populations of transgenic sugar beet at Friemar (Thuringia, Germany)." Agriculture Ecosystems & Environment **95**(1): 37-47.

Wang YS, Jaw CG et Chen YL (1994). "Accumulation of 2,4-D and glyphosate in fish and water hyacinth." Water Air and Soil Pollution **74**(3-4): 397-403.

Yasmin S et D'Souza D (2007). "Effect of pesticides on the reproductive output of *Eisenia fetida*." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **79**(5): 529-532.

PARTIE IV

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Cette discussion s'inscrit dans une démarche globale d'évaluation du risque des pesticides sur l'environnement et la santé humaine en s'appuyant sur une synthèse des principaux résultats obtenus : du développement embryonnaire à la reproduction, du laboratoire aux études au champ, des techniques analytiques aux bioessais écotoxicologiques.

IV. 1 De l'évaluation du danger à l'évaluation du risque environnemental

IV.1.1 Apports du volet analytique de la thèse pour l'évaluation de l'exposition et du transfert des pesticides

La caractérisation de l'exposition et du transfert des pesticides chez l'escargot constituaient deux des trois axes étudiés dans ces travaux (Figure I.4). Afin de pouvoir répondre à ces questionnements, le premier chapitre de cette thèse portait sur le développement de méthodes d'analyse des composés étudiés dans des matrices liquides et solides (sol et tissus). Le Tableau IV.1 fait le bilan des techniques développées pour chaque molécule, de leur aboutissement et de leur utilisation pour répondre aux objectifs initiaux de la thèse. Il présente également les méthodes de laboratoires privés auxquels nous avons eu recours dans certains cas pour comparer les performances de nos méthodes, ou pour disposer de données sur le transfert de molécules pour lesquelles nous n'avons pas pu développer de méthodes par manque de temps.

Tableau IV.1. Développements et techniques d'analyse des 8 molécules organiques étudiées.

Molécule	Dépôts (matrice liquide) – LQ	Sol – Rendements – LQ	Tissus d'escargot – Rendements – LQ non déterminée	Laboratoires privés (tissus animaux) – LQ – Rendements non disponibles
Métirame-Zn	-	-	-	IPL Nord Δ Séchage / Minéralisation / Analyse du disulfure de carbone (CS_2) / GC-MS
Pyraclostrobine	Concentration / Dérivation / GC-MS 38,5 µg l^{-1}	-	ASE / Concentration / Dérivation / GC-MS 0% *	IPL Nord Broyage / Lyophilisation / USE (solvant organique) / LC-MS/MS 0,05 mg kg^{-1}
Cymoxanil	Concentration / Dérivation / GC-MS 38,5 µg l^{-1}	-	ASE / Concentration / Dérivation / GC-MS 42-95% *	IPL Nord Broyage / Lyophilisation / USE (solvant organique) / LC-MS/MS 0,05 mg kg^{-1}
Folpel	Concentration / Dérivation / GC-MS 112,5 µg l^{-1}	-	ASE / Concentration / Dérivation / GC-MS 0% *	IPL Nord Broyage / Lyophilisation / USE (solvant organique) / LC-MS/MS 0,05 mg kg^{-1}
Fosétyl-Al	-	-	-	IPL Nord Δ Broyage / Lyophilisation / USE (eau) / LC-MS/MS
Tébuconazole	Concentration / Dérivation / GC-MS 192,3 µg l^{-1}	-	ASE / Concentration / Dérivation / GC-MS 84-104% *	IPL Nord Broyage / Lyophilisation / USE (solvant organique) / LC-MS/MS 0,05 mg kg^{-1}
Glyphosate	Dérivation / HPLC-Fluo 6 µg l^{-1} (et AMPA 6 µg l^{-1})	Extraction par agitation / Centrifugation / Dérivation / HPLC-Fluo 97% (et AMPA 90%) 0,172 mg kg^{-1} (et AMPA 0,028 mg kg^{-1})	Extraction par agitation / Centrifugation / SPE / Dérivation / HPLC-Fluo 0-70% (et AMPA 0-100%) *	IPL Bordeaux Protocole d'extraction non divulgué / Analyse HPLC-Fluo 0,2 mg kg^{-1} (et AMPA 0,5 mg kg^{-1})
Glufosinate	Dérivation / HPLC-Fluo 9 µg l^{-1}	Extraction par agitation / Centrifugation / Dérivation / HPLC-Fluo 96% 0,025 mg kg^{-1}	Extraction par agitation / Centrifugation / SPE / Dérivation / HPLC-Fluo 0% *	-

* : Technique non utilisée sur les échantillons provenant des expériences issues des Chapitres 3 et 4 car méthode pas complètement au point.

Δ : Technique non utilisée sur les échantillons provenant des expériences issues des Chapitres 3 et 4 car leur analyse a été jugé peu utile.

Dans le contexte de notre étude, le métirame-Zn et le fosétyl-Al n'ont pas été considérés comme des molécules prioritaires et n'ont pas fait l'objet de développement de techniques d'analyse. D'une part, ces deux molécules sont non persistantes dans les sols et l'accumulation du fosétyl-Al est peu attendue (Tableau I.2). D'autre part, l'analyse de ces composés nécessitait le développement de deux autres méthodes sélectives ne pouvant être intégrées aux méthodes développées pour les autres composés comme en témoignent les méthodes d'analyse présentées dans les Tableaux I.5 et IV.1, donc nécessitait un investissement que nous avons jugé préférable de reporter sur d'autres molécules. En effet, de par sa solubilité dans l'eau et sa valeur de K_{ow} (Tableau I.2), le fosétyl-Al doit être analysé dans l'eau à la différence des autres fongicides. De plus, l'analyse du métirame-Zn par la mesure du CS_2 est non spécifique et valable pour tous les carbamates (les LMR de ces composés sont exprimées en CS_2). Comme le fosétyl-Al est intégré dans la formulation de Valiant® Flash avec le cymoxanil et le folpel et que le métirame-Zn est intégré dans la formulation de Cabrio® Top avec la pyraclostrobine, nous avons fait le choix de porter nos efforts sur ces trois autres composés pour caractériser l'exposition et le transfert de ces deux formulations à l'escargot.

Concernant la pyraclostrobine et le folpel, des techniques d'analyse sur matrice liquide ont été développées et utilisées pour la mesure des dépôts au sol (cf. Chapitre 4). Les techniques d'extraction dans les escargots n'ayant pu aboutir à des rendements efficaces, nous avons préféré envoyer les échantillons à un laboratoire privé.

Les méthodes d'analyse du tébuconazole et du cymoxanil ont été utilisées pour la mesure des dépôts au sol et la méthode d'extraction promet de bons résultats compte tenu des rendements obtenus lors des essais (Tableau IV.1). Cette méthode reste cependant à valider (détermination de la répétabilité, de la linéarité et des LD et LQ).

Le glyphosate est la molécule sur laquelle les efforts les plus importants ont été portés au cours de ces travaux. Comme attendu, le développement de méthodes d'analyse dans les matrices solides a révélé de nombreuses difficultés mais a cependant abouti à une méthode d'extraction dans un sol de type argileux. Les méthodes d'extraction et d'analyse dans les tissus animaux n'étant pas connues ou tout du moins non disponibles (pas de publication à ce jour), il est important de continuer leur développement, surtout depuis que l'accumulation non attendue de ce composé a été révélée dans les tissus d'escargot.

Comme pour le glyphosate, une méthode d'extraction et d'analyse du glufosinate a été mise au point dans un sol de type argileux. L'extraction dans les tissus s'est révélée plus difficile puisqu'il a été impossible de déterminer un rendement malgré le nombre d'essais

entrepris. Généralement, des rendements entre 85 et 100 sont considérés comme bons mais s'ils n'atteignent pas ces valeurs, une bonne répétabilité peut suffire à valider la méthode (par une gamme de calibration linéaire sur matrice par exemple). Comme en témoignent les Tableaux I.5 et IV.1, reflets de nos recherches, il semblerait que le glufosinate ne dispose pas de méthode permettant son analyse dans les tissus d'origine animale, probablement du fait des difficultés analytiques déjà évoquées dues à ses propriétés physico-chimiques (comme sa structure polaire).

S'il est nécessaire de disposer de méthodes analytiques permettant de caractériser l'exposition des pesticides aux organismes et leur transfert potentiel dans les chaînes alimentaires, il est également important de pouvoir les maîtriser en routine. En effet, en plus du coût élevé demandé par les laboratoires privés pour réaliser les analyses de molécules organiques, il est difficile de connaître la validité de leur méthode. Généralement, la méthode est développée pour un seul type de matrice et l'efficacité, le rendement et les limites de détection et de quantification ne sont valables que pour cette matrice. Il y a donc une incertitude quant aux résultats obtenus car il est peu probable, par exemple, que les méthodes aient été développées avec de la chair d'escargot, dont la composition est très différente des autres matrices utilisées pour la méthode (par exemple viandes de porc, bœuf), du fait notamment de la présence des mucopolysaccharides (Skingsley *et al.* 2000). De plus, lorsque les grandes lignes de la méthode employée sont données, seule la limite de quantification est fournie avec le descriptif de la méthode. Pourtant, dans une note de la DGAL (Direction Générale de l'Alimentation) donnant les instructions pour le plan de surveillance des contaminants chimiques du milieu aquatique dans les produits de la pêche, mis en application au 1er janvier 2011, il est précisé que les laboratoires agréés pour les analyses doivent fournir l'incertitude de la méthode analytique employée pour pouvoir interpréter la conformité d'un résultat (DGAL 2010). De même, lorsque les échantillons analysés doivent subir une phase d'extraction, le rendement doit être mentionné (EC 2006, 2007c) sur les bulletins d'analyse.

Le développement des techniques d'analyse et le recours aux laboratoire privés ont permis d'apporter des informations sur l'exposition et l'accumulation de ces molécules dans l'escargot, en lien avec leurs effets (troisième axe).

Tableau IV.2. Synthèse des bioessais développés dans ce travail pour la caractérisation du danger et du risque des pesticides étudiés.

Bioessai (n°)	Protocole / Paramètres observés	Notion évaluée	Résultats
Subchronique Embryotoxicité en phase liquide (1)	Œufs exposés directement aux substances (ou formulations commerciales) durant le développement embryonnaire Conditions contrôlées de laboratoire Effets mesurés sur le succès d'éclosion	DANGER EFFET-DOSE	Méthode de screening simple et rapide Classement des formulations selon leur toxicité
Subchronique Embryotoxicité en phase solide (2)	Œufs exposés à du sol contaminé aux formulations commerciales durant le développement embryonnaire Conditions contrôlées de laboratoire Effets mesurés sur le succès d'éclosion	DANGER EFFET-DOSE (prend en compte la biodisponibilité des contaminants pour les œufs)	Classements des formulations selon leur toxicité Effets des caractéristiques du sol sur la biodisponibilité des contaminants
Chronique (3)	Exposition des escargots depuis leur sortie de l'œuf jusqu'à la maturation sexuelle Conditions contrôlées de laboratoire Effets mesurés sur la survie, la croissance et la maturation de l'appareil reproducteur	DANGER (concentration d'exposition supra-environnementale) RISQUE (concentration environnementale)	Pas d'effet du Bypass® (glyphosate) Pas d'effet du Basta® (glufosinate)
Chronique (4)	Exposition sur l'ensemble du cycle de vie Conditions contrôlées de laboratoire Effets mesurés sur la survie, la croissance et la reproduction	RISQUE (concentration environnementale)	Peu d'effet du Bypass® (glyphosate)
Au champ (5)	Exposition de juvéniles dans la vigne en conditions réelles d'application des pesticides Conditions naturelles *in situ* Effets mesurés sur la survie et la croissance	RISQUE (*in situ*)	Pas d'effets des différentes formulations commerciales appliquées sauf du Roundup® (glyphosate)

IV.1.2 Apports de ce travail pour l'évaluation du risque environnemental des pesticides

Concernant le troisième axe de la thèse, l'étude des effets, différentes approches ont été développées dans ce travail, visant à mettre en place des protocoles mesurant le danger puis permettant de se rapprocher de plus en plus de l'évaluation du risque. Elles sont présentées dans le Tableau IV.2.

Lorsqu'il a été possible de mettre en évidence un effet dose-dépendant du pesticide (substance ou formulation) et donc de définir les paramètres écotoxicologiques tels que la EC50 et la NOEC, comme c'est le cas avec les bioessais d'embryotoxicité (Tableau IV.2), le risque peut être déterminé en relation avec l'exposition. Le Tableau IV.3 présente les données relatives à l'exposition (PEC et DT50), à l'accumulation et à l'écotoxicité (EC50) de chaque molécule organique étudiée dans ce travail. A l'aide de ces données, une évaluation du risque est réalisée pour chaque substance lorsque cela est possible.

Dans l'évaluation du risque des substances chimiques, il est possible dans le cas où l'on dispose uniquement de données d'effets sur des organismes aquatiques, d'extrapoler à des effets sur des organismes terrestres en appliquant l'«equilibrium partionning method» (ECHA 2008). Il est ainsi possible d'estimer une $PNEC_{sol}$ à partir d'une $PNEC_{eau}$ selon l'équation suivante :

$$PNEC_{sol} = \frac{K_{oc}}{densité} \times PNEC_{eau} \times 1000 \qquad (8)$$

Dans le Tableau IV.3, cette formule a été appliquée avec les EC50 du bioessai d'embryotoxicité en phase liquide ($EC50_{embL}$), le K_{oc} des substances (Tableau I.2) et la densité du sol de Bergbieten pour modéliser les EC50 du bioessai en phase solide estimées ($EC50_{embSe}$).

Cependant, lorsque l'on compare les $EC50_{embSe}$ et les $EC50_{embS}$ qui ont été déterminées pour le tébuconazole et le glyphosate (Tableau IV.3), on s'aperçoit que la toxicité et le risque sont très sous-estimés. Ainsi les valeurs de TER estimées (TER_e) déterminées pour le cymoxanil, le folpel et le glufosinate avec l'approche de modélisation (équation 8) sont probablement surestimées. Elles démontrent que l'acquisition de données expérimentales est encore nécessaire pour adapter/améliorer les équations proposées pour modéliser la toxicité terrestre à partir de données obtenues avec des organismes aquatiques.

Tableau IV.3. Evaluation du risque environnemental des 8 molécules organiques étudiées.

Molécule	Exposition	Accumulation / FBA	Ecotoxicité (Embryotoxicité)	TER
Métirame-Zn	ND	ND	$EC50_{embL}$ = 460 mg l^{-1}	ND
Pyraclostrobine	0	0,7 mg kg^{-1} / ND	$EC50_{embL}$ = 45 mg l^{-1}	0
Cymoxanil	PEC_i = 0,004 mg kg^{-1}	0 / ND	$EC50_{embL}$ = 1,9 mg l^{-1} *$EC50_{embSe}$ = 51,6 mg kg^{-1}*	*TER_e = 12893*
Folpel	PEC_i = 0,15 mg kg^{-1}	0 / ND	$EC50_{embL}$ = 11,9 mg l^{-1} *$EC50_{embSe}$ = 2584 mg kg^{-1}*	*TER_e = 17227*
Fosétyl-Al	ND	ND	$EC50_{embL}$ = 23,8 mg l^{-1}	ND
Tébuconazole	PEC_i = 0,03 mg kg^{-1}	0,8 mg kg^{-1} / 26,7	$EC50_{embL}$ = 0,1 mg l^{-1} *$EC50_{embSe}$ = 57,3 mg kg^{-1}* $EC50_{embS}$ = 0,9 mg kg^{-1}	*TER_e = 1910* TER_r = 28
Glyphosate	PEC_i (Roundup®) = 1,22 mg kg^{-1} DT50 = 10,6 j	4 mg kg^{-1} (Roundup®) - 6 mg kg^{-1} (Bypass®) / 3,3-4,9	$EC50_{embL}$ (Roundup) = 49,2 mg l^{-1} $EC50_{embL}$ (Bypass®) = 110,4 mg l^{-1} *$EC50_{embSe}$ (Bypass®) = 69710 mg kg^{-1}* $EC50_{embS}$ (Bypass®) = 219 mg kg^{-1}	*TER_e = 57139* TER_r = 179
Glufosinate	PEC_i = 0,8 mg kg^{-1} DT50 = 3,7 j	ND	$EC50_{embL}$ = 4,53 mg l^{-1} *$EC50_{embSe}$ = 32 mg kg^{-1}*	*TER_e = 40*

ND : Non déterminé.

FBA : Facteur de bioaccumulation déterminé comme le ratio de la concentration dans les tissus sur la concentration dans le sol.

PEC_i : Concentration initiale prévisible dans l'environnement, déterminée à partir des dépôts au sol en g ha^{-1} les plus importants quantifiés dans la parcelle de vigne (soit à 0 m) lors d'une seule application au champ (cf. Chapitre 4), en considérant la densité du sol de Bergbieten égale à 1,4 et une distribution verticale du pesticide dans les 5 premiers cm du sol.

$EC50_{embL}$ ou $EC50_{embS}$: EC50 déterminées par les bioessais d'embryotoxicité en phase liquide ou en phase solide, respectivement (Chapitre 2).

$EC50_{embSe}$: EC50 modélisée selon l'«equilibrium partionning method ».

TER_r ou *TER_e* : Ratio toxicité réelle ou estimée ($EC50_{embS}$ ou *$EC50_{embSe}$*) sur exposition (PEC) ; Quand le TER est élevé, le risque est faible (se reporter à la section I.2.1).

Sur la base des données obtenues dans ce travail, en partie synthétisées dans les Tableaux IV.1 et IV.3, 3 molécules semblent présenter un risque particulier, soit en raison de leur accumulation dans les tissus, soit en fonction de leur toxicité :

- Le glyphosate : le TER_r déterminés dans cette étude révèle un risque écotoxique assez faible, cependant le glyphosate est l'herbicide le plus utilisé au monde et il est retrouvé dans les tissus, ainsi que son métabolite, à des concentrations d'environ 6 mg kg^{-1}. De plus, la différence de toxicité suivant la formulation employée est un point particulièrement important à prendre en compte sur lequel nous reviendrons en section IV.2.2.2.
- Le tébuconazole : en plus de sa forte persistance dans les sols (Tableau I.2), ce fongicide est également détecté dans les escargots et s'est révélé être très toxique pour ses embryons. Le TER_r déterminé n'est cependant pas inférieur à 5, seuil à partir duquel la réglementation conclut à un risque probable et où il est nécessaire d'effectuer des tests d'un « tier » supérieur chez le ver de terre en plus des tests aigus et chroniques (EC 1991; EPPO 2003). Cette molécule s'accumule également dans les tissus d'escargots, c'est pourquoi le développement d'une méthode d'analyse spécifique est nécessaire pour pouvoir multiplier les scenarii d'exposition et d'analyse des transferts.
- Le glufosinate : cette molécule, classée comme non toxique pour les organismes aquatiques (Tableau I.4), l'est tout du moins pour un organisme terrestre, notamment durant l'embryogénèse. Avec un TER_e de 40 largement surestimé, on peut estimer qu'il existe un risque, bien que cette substance soit peu persistante dans le sol. De plus, comme le glyphosate, l'utilisation de cette molécule reste très importante dans le monde et est même en expansion du fait du développement d'espèces cultivées OGM résistantes à cet herbicide (Lee *et al.* 2005).

IV.2 Facteurs de variabilité des réponses mesurées

IV.2.1 Embryotoxicité des pesticides : influence du stade de développement des œufs lors de l'exposition

Comme cela a été évoqué dans le Chapitre 2, la variation importante, mais cependant acceptable si l'on se réfère aux normes ISO des bioessais d'écotoxicité (où le coefficient de variation doit être inférieur à 30%), observée dans le succès d'éclosion chez *H. aspersa* pour

une même concentration d'exposition, peut être expliquée par « l'âge » des embryons au moment de l'exposition (entre 2 h et 36 h environ). En effet, si le polluant exerce son effet toxique à un stade très précoce du développement, il est possible que certains œufs aient déjà passé ce stade au moment de leur exposition. Le constat d'une toxicité variable des pesticides suivant l'âge de l'embryon a été fait par Hamm et Hinton (2000) et Pennati *et al.* (2006). En exposant des embryons de poisson et d'ascidie, respectivement, à différents moments du développement embryonnaire, ces auteurs ont démontré que les premiers stades étaient les plus sensibles. La mise en place du système nerveux (neurulation) semble jouer un rôle clé chez l'ascidie (Pennati *et al.* 2006) tandis que chez l'embryon de medaka traité précocement au diazinon, c'est l'absence de granules dans la glande d'éclosion (qui contient normalement l'enzyme d'éclosion) qui serait impliquée (Hamm et Hinton 2000). Les études de Lacoue-Labarthe *et al.* (2008; 2009; 2010) sur la bioaccumulation d'une dizaine de métaux dans les œufs de seiche montrent que, suivant le métal et suivant le moment auquel les œufs sont exposés, les métaux franchissent ou non la coque de l'œuf. A l'inverse de notre hypothèse, ces auteurs montrent que, durant les premiers stades embryonnaires, les métaux sont liés à la coque et ne sont pas en contact avec l'embryon. Puis, après l'organogénèse, la coque devient perméable et les métaux peuvent exercer leur toxicité sur l'embryon. D'autres auteurs estiment également que la coque de l'œuf ou l'albumen forment un rempart à l'embryon contre la toxicité des contaminants (Howe *et al.* 2004; Oliveira-Filho *et al.* 2005), démontrant ainsi que les stades embryonnaires sont moins sensibles que les stades larvaires de l'organisme (Perkins *et al.* 2000; Geffard *et al.* 2002; Howe *et al.* 2004; Lacoue-Labarthe *et al.* 2009). Cependant, nous avons démontré qu'à 7 jours du développement embryonnaire (soit le tout début du stade larvaire), le Cd avait déjà franchi la barrière protectrice de l'œuf pouvant ainsi atteindre l'embryon et exercer sa toxicité (cf. Chapitre 2, section III.2.1). De manière générale et particulièrement chez certaines espèces aquatiques (escargots, poissons), les stades précoces (larves, embryons) sont plus sensibles que les stades juvéniles ou adultes (Gomot 1998; Strmac *et al.* 2002; Hallare *et al.* 2005; Pietrock *et al.* 2008).

IV.2.2 Effets du glyphosate sur la croissance : influence des modalités d'exposition

Une différence d'effet du glyphosate sur la croissance a été démontrée lors de deux expériences (bioessais 3 et 5, Tableau IV.2) dont les conditions d'exposition et les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau IV.4.

Tableau IV.4. Effets du glyphosate sur l'escargot *Helix aspersa*.

Lieu d'exposition	Formulation	Sources et modes de contamination	Voie(s) d'exposition	Durée d'exposition	Accumulation	Effets : Mortalité Croissance
Laboratoire	Bypass®	Sol (statique : une seule application à t0) et nourriture (continue : renouvellement tous les 3 jours)	Digestive Cutanée	168 jours	6 mg kg^{-1} de glyphosate Pas d'AMPA	non non
In situ	Roundup®	Sol, végétaux et air (pulvérisation sur le sol à t0)	Probablement digestive, cutanée et respiratoire	12 jours	4 mg kg^{-1} de glyphosate et 8 mg kg^{-1} d'AMPA	non oui (néfaste)

IV.2.2.1 Influence des conditions environnementales : laboratoire versus *terrain*

De plus en plus d'études tendent à démontrer que les effets des contaminants sur un organisme sont aggravés lorsque l'expérience est réalisée *in situ* par rapport aux conditions de laboratoire (Hatch et Burton 1999; Castro *et al.* 2003; Anderson *et al.* 2004; Spurgeon *et al.* 2005; Jones *et al.* 2011). Plusieurs phénomènes peuvent être mis en cause : les variations climatiques (humidité, température), la disponibilité et la qualité de la nourriture qui est moindre sur le terrain et soumise à la compétition des autres espèces, et la présence de pathogènes (Gauthier *et al.* 2006; Jones *et al.* 2011). Ainsi les conditions environnementales peuvent directement influer les paramètres observés *in situ*, tels que la survie et la croissance, mais des effets indirects peuvent également être mis en jeu. Hopkins *et al.* (2004) ont montré que des cendres contaminées, résultant de l'incinération des déchets, entraînaient une diminution de croissance chez une espèce de poisson, auquel s'ajoutait, *in situ*, une diminution de leur ressource en nourriture, elle-même causée par l'effet néfaste des cendres. De même que la dépense d'énergie de l'organisme pour lutter contre les stress environnementaux et maintenir son métabolisme peut entrainer un déficit de l'énergie allouée au système de défense contre les contaminants. D'autre part, les protocoles d'exposition peuvent être sensiblement différents entre le laboratoire et le terrain. Anderson *et al.* (2001) ont montré que lorsque les sédiments sont homogénéisés, comme c'est le cas dans les tests réalisés en laboratoire, ils ont un effet moins toxique sur les embryons d'oursins que les

sédiments naturels sur le terrain, du fait d'une biodisponibilité moindre. Ces auteurs soulignent l'importance du temps d'équilibration après avoir artificiellement contaminé les sédiments.

Cependant, certaines études démontrent l'inverse, à savoir des effets significativement plus importants en laboratoire. Costa *et al.* (2011) montrent que les effets génotoxiques des sédiments sur les poissons sont atténués sur le terrain, dû à la multiplicité des variables, qui, de part leurs interactions, masquent l'effet de la contamination. En laboratoire, du fait des conditions contrôlées sur les variables environnementales, il est plus facile d'isoler et de suivre une seule variable pouvant ainsi mettre en évidence un effet significatif de celle-ci. Wang *et al.* (2004) montrent dans une synthèse sur la toxicité des sédiments sur les amphipodes que le test en laboratoire surestime les effets du fait de conditions d'exposition contraignantes en laboratoire. La surestimation des effets en laboratoire par rapport au terrain peut également être due au fait d'une possible adaptation des populations naturelles exposées aux pesticides (Relyea et Hoverman 2006; Lopes *et al.* 2008) tandis qu'en laboratoire, les études de toxicité sont généralement réalisées avec des animaux d'élevage non préalablement exposés et donc non adaptés.

Notre étude, ainsi que celles présentées ci-dessus, couplent les deux approches, laboratoire et terrain, et posent ainsi le problème de la transposition des résultats. Les deux approches présentant des avantages (relation causes-conséquences facilement identifiable en conditions de laboratoire, haute pertinence environnementale en conditions de terrain)(Vignati *et al.* 2007), la complémentarité du laboratoire et du terrain nous parait nécessaire pour estimer de façon globale et pertinente le risque des contaminants étudiés.

IV.2.2.2 Influence de la formulation commerciale : Bypass® versus *Roundup®*

Deux formulations à base de glyphosate ont été utilisées dans ces travaux du fait d'un changement de formulation opéré par le viticulteur au cours de la thèse (cf. section I.1.3). Le Bypass® a été testé en laboratoire pour déterminer les effets chroniques sur l'escargot et le Roundup®, appliqué au champ, a permis de mesurer les effets sur l'escargot en conditions réelles.

PAGE 1 DE 8

FICHE DE DONNEES DE SECURITE

Déc. 2005

1. IDENTIFICATION DU PRODUIT ET DE LA SOCIETE

Dow AgroSciences S.A.S.
Service Commercial
Marco Polo, Bâtiment B
ZAC du Font de l'Orme 1, BP 1220
790 Avenue du Docteur Donat
06254 MOUGINS CEDEX / FRANCE

NUMERO D'APPEL D'URGENCE : 03 88 53 36 76 (DRUSENHEIM / Bas Rhin)

CENTRE ANTI-POISONS DE PARIS : 01 40 05 48 48
(HOPITAL FERNAND WIDAL / PARIS)

Nom du produit: **BYPASS HERBICIDE**

Code produit: 75604 Date de création: Mai 99 Référence: DDV14
Date de révision: Nov. 04 (Section/s 3 & 15)

2. COMPOSITION/INFORMATION SUR LES COMPOSANTS

Composants dangereux (voir Section 16 pour les phrases R complètes)

			CAS	Nø CE
Sel d'isopropylamine du glyphosate (soit en équivalent acide : 360 g/L)	41,5 %	N; R51/53	038641-94-0	254-056-8

Ingrédients inertes q.s.p.

12. INFORMATIONS ECOLOGIQUES

Persistance et dégradabilité
Evaluation basée en grande partie ou entièrement sur des données relatives à la (ou aux) matière(s) active(s).

Glyphosate : Etroitement lié au sol et très résistant à l'entraînement par lessivage et à l'élution. Le processus majeur de dégradation est de nature microbienne et intervient rapidement. La demi-vie dans les sols dépend du type de sol et des conditions ; elle est d'environ 60 jours.

Toxicité aquatique
D'après des données relatives à une formulation similaire.

Produit légèrement toxique pour les poissons dans les conditions aiguës (10 mg/L < CL50 < 100 mg/L).
Produit légèrement toxique pour les invertébrés aquatiques dans des conditions aiguës (10 mg/L < CL50 < 100mg/L).
Produit très toxique pour les algues (CI50 < 1mg/L).

Toxicité aviaire.
Evaluation basée en grande partie ou entièrement sur des données relatives à la (ou aux) matière(s) active(s).

Glyphosate : Ce produit n'est pratiquement pas toxique pour les oiseaux dans des conditions aiguës (DL50 > 2000 mg/kg).

Informations supplémentaires
Informations basées sur les données relatives à la formulation.

DL50 pour les abeilles : > 360 microgramme/abeille. Ce produit n'est pratiquement pas toxique pour les abeilles dans des conditions aiguës.

Figure IV.1. Extraits de la fiche de données de sécurité (FDS) du Bypass®.

MONSANTO Europe S.A.
Fiche de Données de Sécurité
Produit Commercial

1. IDENTIFICATION DE LA SUBSTANCE ET DE LA SOCIÉTÉ

Nom du produit
Roundup® Flash

Dénomination chimique
Non applicable.
Synonymes
Néant.
Société
MONSANTO Europe S.A., Haven 627, Scheldelaan 460, B-2040, Anvers, Belgique
Téléphone: +32 (0)3 568 51 11, **Fax/Télécopieur:** +32 (0)3 568 50 90

MONSANTO Europe S.A., Avenue De Tervuren, 270-272, 1150, Brussels, BE
Téléphone: +32027764111, **Fax/Télécopieur:** +32027764040
Numéros d'urgence
Téléphone: Belgique +32 (0)3 568 51 23

2. COMPOSITION/INFORMATIONS SUR LES COMPOSANTS

Principe actif
Sel d'isopropylamine de N-(phosphonométhyl)glycine; {Sel d'isopropylamine de glyphosate}

Composition

Composants	No. CAS	No. EINECS/ ELINCS	% pondéraux (approximatif)	Symboles EU & phrases R des composants
Sel d'isopropylamine de glyphosate	38641-94-0	254-056-8	51	
Surfactant	68478-96-6		7,5	Xn, N; R22, 38, 50/53; {a}
Eau	7732-18-5	231-791-2	41,5	

12. INFORMATIONS ÉCOLOGIQUES

Cette section est réservée à l'usage des écotoxicologues et autres spécialistes de l'environnement.

Les données sur le produit, les produits similaires et les composants sont résumées ci-dessous.

Toxicité aquatique, algues/plantes aquatiques
Algue verte (Selenastrum capricornutum):
Toxicité aiguë, 72 heures, statique, CEr50 (rythme de croissance): 14 mg/L
Toxicité pour les arthropodes
Abeille commune (Apis mellifera):
Contact, 48 heures, DL50: > 265 µg/abeille
Abeille commune (Apis mellifera):
Oral, 48 heures, DL50: > 285 µg/abeille
Toxicité pour les organismes du sol, invertébrés
Ver de terre (Eisenia foetida):
Toxicité aiguë, 14 jours, CL50: > 2.700 mg/kg de sol sec
Toxicité pour les organismes du sol, micro-organismes
Test de transformation de l'azote et du carbone:
48 L/ha, 28 jours: Moins de 25% des effets sur les processus de transformation de l'azote et du carbone contenus dans le sol.

Formulation similaire

Toxicité aquatique, poissons
Crapet arlequin (Lepomis macrochirus):
Toxicité aiguë, 96 heures, statique, CL50: 21 mg/L
Carpe commune (Cyprinus carpio):
Toxicité aiguë, 96 heures, statique, CL50: 12 mg/L
Toxicité aquatique, invertébrés
Daphnie (Daphnia magna):
Toxicité aiguë, 48 heures, statique, CE50: 56 mg/L

N-(phosphonométhyl)glycine; {glyphosate}

Toxicité aviaire
Colin de Virginie (Colinus virginianus):
Toxicité alimentaire, 5 jours, CL50: > 4.640 mg/kg d'aliment
Canard colvert (Anas platyrhynchos):
Toxicité alimentaire, 5 jours, CL50: > 4.640 mg/kg d'aliment
Colin de Virginie (Colinus virginianus):
Toxicité orale aiguë, dose unique, DL50: > 3.851 mg/kg de poids corporel
Bioaccumulation
Crapet arlequin (Lepomis macrochirus):
Poisson entier: FBC: < 1
Aucune bioaccumulation significative n'est à prévoir.

Figure IV.2. Extraits de la fiche de données de sécurité (FDS) du Roundup®.

Ces deux formulations n'ont pas exactement la même composition ni les mêmes effets écotoxicologiques (Figures IV.1 et IV.2). Sur la FDS du Roundup® Flash, il est indiqué que le produit contient un surfactant identifié par son N° de CAS à hauteur de 7,5% tandis que sur celle du Bypass®, il n'en est pas fait mention. Nous en déduisons donc qu'il n'en contient pas, bien que cela ne soit pas une certitude.

Dans la littérature, aucune étude ne rapporte avoir testé le Bypass®, ne permettant pas de comparer sa toxicité à celle du Roundup®. Par ailleurs, il est difficile de se baser sur les données présentes sur les FDS, car les informations sont différentes : celle du Roundup® indique une LC50 pour le ver de terre de 2,7 mg kg^{-1} (Figure IV.2) mais cette information n'est pas donnée pour le Bypass® (Figure IV.1). La toxicité aiguë pour les poissons (LC50) est comprise entre 12 et 21 mg l^{-1} pour le Roundup® (Figure IV.2) et entre 10 et 100 mg l^{-1} pour le Bypass® (Figure IV.1), mais ces valeurs sont déterminées pour des « formulations similaires » dans les deux cas. Seule la toxicité pour les abeilles peut être comparée, avec des LD50 de 265 et 285 µg $abeille^{-1}$ (contact et oral) pour le Roundup® (Figure IV.2) et 360 µg $abeille^{-1}$ (il n'est pas précisé si l'exposition est réalisée par voie orale ou par contact) pour le Bypass® (Figure IV.1). De ces données, il semblerait que le Roundup® soit plus toxique que le Bypass®, ce qui est confirmé par nos résultats sur les embryons en phase liquide où nous avons déterminé des EC50 de 49,2 mg l^{-1} pour le Roundup® et de 110,4 mg l^{-1} (Tableau IV.3) pour le Bypass®. La plus forte toxicité du Roundup® vient très probablement du fait du surfactant qu'il contient, le POEA, identifié comme étant très toxique, beaucoup plus que le glyphosate, voire également plus que le Roundup® lui-même (cf. section I.2.2.2.3). Des études ayant testé des formulations à base de glyphosate (autres que le Bypass®) sur diverses espèces aquatiques (bivalves, amphibiens) indiquent que celles contenant du POEA sont toujours plus toxiques que celles n'en contenant pas ou que celles dont les surfactants ne sont pas identifiés (Mann et Bidwell 1999; Howe *et al.* 2004; Bringolf *et al.* 2007).

L'ensemble de ces données de toxicité relatif à ces deux formulations suggère que la différence d'effet sur la croissance des escargots (Tableau IV.4) peut être expliquée par l'utilisation de deux formulations différentes à base de glyphosate, le Roundup® étant plus toxique que le Bypass®.

Par ailleurs, en comparant ces deux formulations, nous constatons que les informations figurant sur les FDS sont hétérogènes et peu claires. Ainsi, il est remarqué que sur la FDS du Roundup® (Figure IV.2), le glyphosate n'est pas classé dangereux pour l'environnement au niveau réglementaire (« N » devenu « SGH09 » avec le nouveau système de classification et d'étiquetage) alors qu'il l'est pourtant bien (Tableau I.4) et que ce renseignement est précisé

pour le Bypass® (Figure IV.2). De même, la concentration en glyphosate acide (de 450 g l^{-1}) n'est pas indiquée sur la FDS du Roundup® et seul figure le pourcentage en sel d'IPA (Figure IV.1). Enfin, il est difficile de déterminer à quoi correspond exactement la mention « ingrédients inertes : q.s.p. » (soit : « quantité suffisante pour ») sur la FDS du Bypass® (Figure IV.1). Cependant, comme mentionné dans le guide d'élaboration des fiches de données de sécurité pour les préparations dangereuses (EC 2001), « Il n'est pas nécessaire d'indiquer la composition complète (nature des composants et leur concentration), même si une description générale des composants et de leur concentration est utile ». De même que si la rubrique écotoxicité est obligatoire, il n'est pas clairement exigé tous les résultats des tests demandés pour les substances actives (cf. section I.2.2.1) puisque « ce point comprend les données disponibles pertinentes sur la toxicité aquatique aiguë et chronique pour les poissons, la daphnie, les algues et les autres plantes aquatiques. En outre, les données de toxicité sur les micro-organismes et les macro-organismes du sol et les autres organismes importants du point de vue de l'environnement, tels que les oiseaux, les abeilles et la flore, sont incluses lorsqu'elles sont disponibles ». Nous suggérons une harmonisation et une meilleure lisibilité des données figurant sur les FDS, qui pourraient par ailleurs retranscrire pour les substances actives, les informations majeures provenant des DAR.

IV.2.2.3 Influence des sources/voies d'exposition sur l'accumulation du glyphosate et la présence d'AMPA dans les tissus

Le Tableau IV.4 montre une différence d'accumulation du glyphosate entre les deux expériences, et notamment une présence d'AMPA dans les tissus des escargots suite à l'exposition sur le terrain. Les sources et voies d'exposition impliquées dans les deux cas de figures peuvent probablement expliquer cette différence. En conditions contrôlées elles sont clairement identifiées : la présence exclusive de glyphosate en fin d'expérience est observée suite à une exposition continue par la nourriture, le glyphosate du sol étant dégradé à ce stade. D'après les données dont on dispose chez le rat, le glyphosate administré par voie orale est rapidement et presque totalement excrété mais surtout il est très peu métabolisé (Williams *et al.* 2000). Le métabolite retrouvé en petite quantité est bien de l'AMPA, mais il a été démontré que chez des rats à qui il avait été administré entre 10 et 1000 mg kg^{-1} de glyphosate, 97,5% de cette dose était excrétée en tant que composé parent. Dans notre expérience, les escargots ayant été congelés rapidement après l'arrêt de l'exposition (après 2 jours de jeûne), la présence de glyphosate non encore excrété et l'absence d'AMPA sont en

accord avec les résultats de Williams *et al.* (2000), même si le facteur de bioaccumulation du glyphosate observé dans nos travaux (0,2 ; cf. Chapitre 3 section III.3.1.3.3) est plus important que celui déterminé pour le rat (0,0012) après 10 jours d'exposition (Williams *et al.* 2000). Dans le cas de l'expérience *in situ*, les sources d'exposition sont multiples (Tableau IV.4) et le protocole ne permet pas de déterminer laquelle prévaut sur les autres. Une des hypothèses proposées pour expliquer la présence d'AMPA dans les escargots exposés *in situ* est qu'une autre voie de contamination que la voie digestive serait en jeu : les voies cutanée et respiratoire ont pu générer une exposition non négligeable des escargots, notamment lors de la pulvérisation de l'herbicide. L'exposition par voies cutanée et respiratoire par la suite, *via* la revolatilisation de l'herbicide à partir du sol, est peu probable, le glyphosate n'étant pas un composé très volatil. D'autre part, l'exposition par voie cutanée par le sol est également possible, mais à la différence des escargots exposés en laboratoire uniquement par le sol (qui ne contenaient ni glyphosate ni AMPA dans leurs tissus), le prélèvement des individus a eu lieu 12 jours après l'exposition et non pas 168 jours, permettant ainsi de conserver la trace d'une exposition dans les tissus. Le glyphosate, entrant par ces voies cutanée et respiratoire, emprunte probablement des voies de métabolisation différentes que par la voie digestive, pouvant expliquer la présence d'AMPA dans les tissus lors de l'exposition sur le terrain. Une autre hypothèse pour expliquer la présence de ce métabolite dans les tissus est la possible absorption d'AMPA déjà présent dans le sol. Cela implique donc que la biotransformation du glyphosate en AMPA ait eu lieu dans le sol selon les voies de dégradation présentées sur la Figure IV.3. La métabolisation du glyphosate en AMPA a par ailleurs aussi été démontrée en laboratoire (cf. Chapitre 3, section III.3.1).

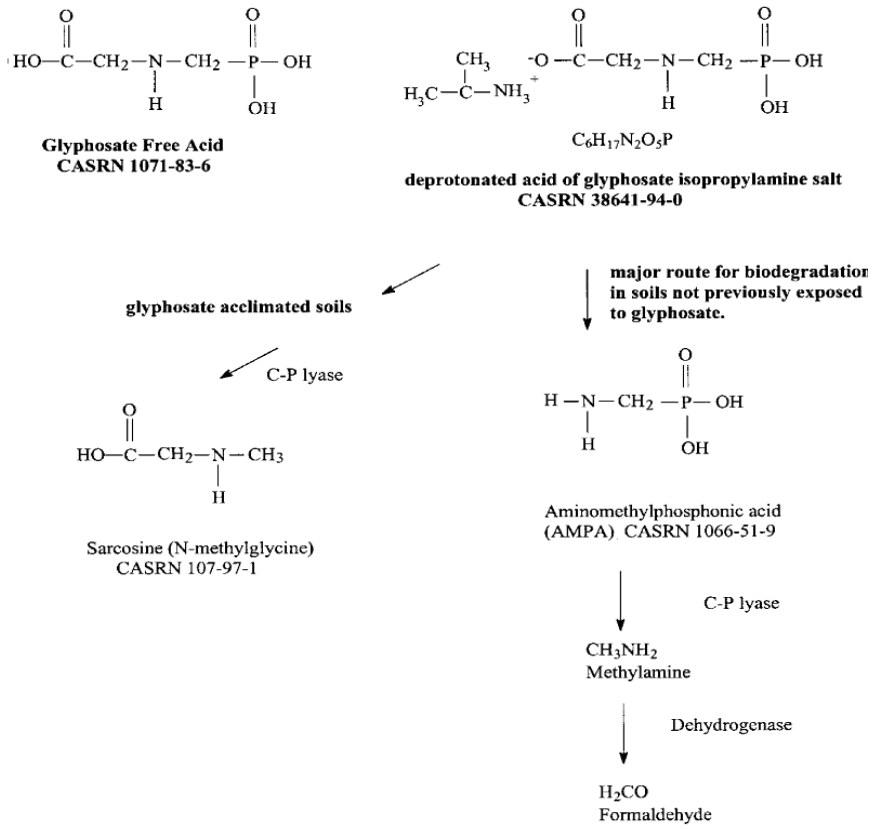


Figure IV.3. Voies de dégradation du glyphosate et du sel d'IPA de glyphosate dans le sol d'après Williams *et al.* (2000).

IV.2.2.4 Influence des sources/voies d'exposition sur l'effet du glyphosate/AMPA

Diverses hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'impact différent du glyphosate sur la croissance entre les deux expériences menées en laboratoire et *in situ* en plus des facteurs avancés en sections IV.2.2.1 et IV.2.2.2 :

Comme nous venons de l'expliquer ci-dessus, l'exposition par voie cutanée, notamment lors de la pulvérisation, a probablement été une voie d'exposition majeure. Or, il a déjà été démontré que l'exposition par voie cutanée de *H. aspersa* à un pesticide (en l'occurrence le diméthoate) entraînait un effet significativement plus important sur la croissance que l'exposition par voie digestive (Coeurdassier *et al.* 2002).

En second lieu, il peut être évoqué un effet direct ou indirect de l'AMPA, présent dans les tissus des escargots exposés sur le terrain. La toxicité de l'AMPA a été très peu étudiée et les seules données dont on dispose sont des données toxicologiques provenant des études réalisées lors de l'évaluation du glyphosate pour son inscription à l'annexe I de la directive 91/414/EC. Ces données sont résumées dans la synthèse de Williams *et al.* (2000) et il ressort que l'AMPA est faiblement toxique, moins que son composé parent, que ce soit au cours

d'expériences de toxicité aiguë ou chronique (EC 2002). Cependant, Williams *et al.* (2000) concluent également que ni le glyphosate ni l'AMPA ne s'accumulent dans aucun tissu animal, à l'inverse de ce qui a pu être démontré par nos expériences. Quelques rares données écotoxicologiques ont pu être trouvées dans un rapport réalisé par le *National Institute of Public Health and the Environment* des Pays-Bas mentionnant des LC50 de 691 mg l^{-1} et 520 mg l^{-1}, respectivement pour les daphnies et les poissons et une NOEC-reproduction de 28,1 mg kg^{-1} pour les vers de terre (Traas et Smit 2003). Ces données montrent que l'AMPA est peu toxique, comme le glyphosate (Tableau I.4). Cependant, Mamy *et al.* (2010) ont étudié les impacts du glyphosate et d'autres herbicides conventionnels quand ils sont appliqués sur des cultures tolérantes ou non au glyphosate. Dans certains cas, l'impact sur l'écosystème terrestre est plus important dans le cas des cultures tolérantes au glyphosate (résultat non attendu), principalement en raison des applications fréquentes et répétées de glyphosate conduisant à de fortes teneurs en AMPA dans les sols.

L'AMPA peut aussi avoir un effet indirect sur la croissance des escargots. Le coût énergétique de la métabolisation du glyphosate en AMPA (Contardo-Jara *et al.* 2009) pourrait entraîner un déficit des dépenses d'énergie normalement allouées à la croissance (ou à l'alimentation). Cependant, cette hypothèse n'est valable que si la présence de l'AMPA est bien due à une métabolisation du glyphosate dans les tissus de l'escargot, ce qui reste à démontrer (cf. discussion précédente section IV.2.2.3).

IV.3 Apport de la thèse à l'interface de l'évaluation du risque environnemental et sanitaire

IV.3.1 Accumulation et évaluation du risque de transfert dans les chaînes trophiques

Le transfert et l'accumulation du tébuconazole, de la pyraclostrobine et du glyphosate dans les escargots ont été révélés au cours des travaux de cette thèse (Tableau IV.3). Comme cela a déjà été mentionné auparavant, l'escargot est impliqué dans de multiples chaînes alimentaires : oiseaux (grives, corvidés), mammifères (hérisson, rats, musaraignes), amphibiens (grenouilles), carabes, autres gastéropodes (limaces), sans oublier l'homme (Barker 2004). De ce fait, la présence de pesticides dans les tissus des escargots peut conduire à une exposition pour les consommateurs et à un risque d'empoisonnement secondaire. Dans les systèmes aquatiques, le transfert, la bioaccumulation et/ou la biomagnification (qui se

définit comme l'augmentation des concentrations accumulées avec l'élévation du niveau trophique) de contaminants organiques ont principalement été étudiés avec les PCBs, les HAPs, les OCs et les OPs (Pruell *et al.* 2000; Varo *et al.* 2002; Blais *et al.* 2006; Filipowicz *et al.* 2007). Dans le compartiment terrestre, il n'existe pas d'étude de transfert des pesticides étudiés dans cette thèse au sein des réseaux trophiques. En revanche, de nombreuses études sont consacrées au transfert des métaux dans la chaîne alimentaire, dont certaines impliquant l'escargot *Helix aspersa* (Scheifler *et al.* 2002; Fritsch *et al.* 2008; Hispard *et al.* 2008). Au sein de la directive 91/414/EC, le risque de transfert des pesticides dans les chaînes trophiques est considéré seulement lorsque le K_{ow} de la substance est supérieur à 3 (EC 1991). Dans ce cas, ce risque est modélisé pour les vertébrés terrestres (mammifères et oiseaux) à partir du FBC chez le poisson, de la PEC_{eau} et de la dose journalière, ou à partir du FBC chez le ver de terre, de la PEC_{sol} et de la dose journalière (EC 2002). Pour les vers de terre, les FBC ne sont pas déterminés comme pour le poisson, mais modélisés selon l'équation :

$$FBC=\frac{0,84+0,01K_{ow}}{f_{oc}\times K_{oc}} \qquad (9)$$

Où K_{ow} et K_{oc} sont des paramètres physico-chimiques de la substance définis en section I.1.2.3 et où f_{oc} est le pourcentage en carbone organique dans le sol (valeur par défaut = 0,02). Ainsi, pour le tébuconazole, il a été estimé à 2,56 (EC 2007b) tandis que le FBA que nous avons déterminé chez l'escargot d'après nos données est de 26,7 (Tableau IV.3), soit 10 fois supérieur à celui modélisé chez le ver de terre, d'où l'importance de réaliser des études expérimentales pour déterminer ces facteurs. Nous avons également pu déterminer un FBA chez l'escargot de 4,9 pour le glyphosate (Tableau IV.3). Cependant nous ne disposons d'éléments de comparaison car ni le FBC-ver de terre, ni le FBC-poisson n'ont été modélisés/déterminés, étant considérés comme peu utiles au regard du faible K_{ow} du glyphosate (Tableau I.2).

L'estimation du transfert et de la bioaccumulation des contaminants au sein des réseaux trophiques terrestres est une approche nécessaire à l'évaluation du risque environnemental qui peut être intégrée dans des modélisations prédictives que propose par exemple le logiciel TerraSys (http://www.sanexen.com/fr/terrasys/index.htm). D'autres outils tels que les Eco-SSL (EPA 2005) requièrent des données telles que l'accumulation afin de déterminer quelles concentrations de contaminants dans les sols sont acceptables ou sans risque pour les organismes susceptibles d'être en contact avec ce substrat. Les Eco-SSL sont déterminées pour 3 catégories d'êtres vivants, les plantes, les invertébrés du sol et les vertébrés (oiseaux et mammifères) et concernent pour l'instant principalement des métaux et seulement quelques

molécules organiques (HAP, dieldrin, DDT et pentachlorophénol). Cependant, si la modélisation représente un outil efficace pour appréhender le risque environnemental, les études conduites en conditions réelles d'application, comme celle présentée dans le Chapitre 4, apportent des informations indispensables à la validation de ces modèles théoriques de transfert.

IV.3.2 Accumulation et lien entre approches écotoxicologiques et sanitaires

Les données d'accumulation des contaminants dans certains organismes peuvent aider à la modélisation de l'exposition humaine à ces substances et donc estimer le risque sanitaire.

Les concentrations de pesticides que nous avons déterminées dans les escargots exposés en conditions réelles d'application dépassent les LMR fixées pour des denrées alimentaires de type animal (Tableau IV.5). Deux étapes sont nécessaires pour établir les LMR : la première étape consiste à étudier le métabolisme de la substance active dans les plantes et les animaux à l'aide de molécules radiomarquées. Cette première étape permet de définir ce qui va être considéré comme « résidus », à savoir s'ils prendront en compte uniquement la substance active ou la substance et un/ou plusieurs de ses métabolite(s) (Tableau IV.5). La seconde étape consiste à réaliser des études de résidus (selon ce qui a été défini dans l'étape 1) sur la base d'une exposition en conditions de bonnes pratiques agricoles et avec des méthodes analytiques n'utilisant plus de molécules radiomarquées (Tableau IV.5). Ces LMR sont utilisées pour l'évaluation du risque sanitaire des consommateurs, qui est construit sur la même base que l'évaluation du risque écotoxicologique, c'est-à-dire en comparant l'exposition et les effets (WHO et FAO 2009).

L'évaluation des effets (études toxicologiques essentiellement réalisées sur le rat, mais aussi sur le chien) va permettre de définir la DSE (dose sans effet) ou NOAEL, c'est-à-dire la dose maximale sans effet chez l'espèce la plus sensible après une exposition sur le long terme. La DSE est divisée par un facteur de sécurité pour donner la DJA, soit la dose journalière admissible (en mg kg^{-1} $jour^{-1}$) qu'un consommateur moyen de 60 kg peut absorber sans risque tout au long de sa vie. Le facteur de sécurité est au minium de 100 pour prendre en compte à la fois la différence supposée d'effets entre l'homme et l'animal (sur lequel les études ont été réalisées) et la variabilité interindividuelle qui existe naturellement entre les individus.

L'exposition des consommateurs aux résidus de pesticides est déterminée à partir des LMR et de la consommation journalière des aliments susceptibles d'être contaminés, le tout divisé

par la masse corporelle. Elle s'exprime par l'AJMT, apport journalier maximum théorique (en mg kg^{-1} $jour^{-1}$).

Il n'y a pas de risque encouru lorsque la DJA est inférieure à l'AJMT. Le risque à court terme, pouvant correspondre à une prise importante de nourriture contaminée sur une journée, est déterminé de la même façon à partir de la dose maximale sans effet chez l'espèce la plus sensible après une exposition à court terme.

Le Tableau IV.5, qui présente les données tirées des DARs, montre que toutes les substances présentées ne disposent pas de méthode d'analyse dans les tissus animaux et/ou de LMR. Parfois (c'est le cas du folpel), il est indiqué dans le DAR que les méthodes analytiques restent à valider, c'est-à-dire que la méthode analytique développée par le producteur industriel n'est pas validée par un laboratoire extérieur. De plus, la définition des résidus semble parfois contradictoire avec les données de métabolisme : par exemple, pour le folpel et le tébuconazole, ces substances sont rapidement métabolisées mais les métabolites ne sont pas pris en compte dans la quantification des résidus alors que c'est l'inverse pour le glufosinate. Concernant le glyphosate, la définition de résidus est en accord avec les résultats obtenus des études de métabolisme ; cependant, comme nous avons pu le démontrer dans l'expérience conduite *in situ*, le glyphosate est bien métabolisé en AMPA et cela, à des concentrations importantes (Tableau IV.5). Les principaux métabolites pourraient être inclus dans les LMR lorsqu'ils sont identifiés, lorsque des informations sur leur toxicité existent et lorsque leur analyse est possible. Pour plus de clarté, les méthodes analytiques utilisées pour les études de résidus devraient être validées puis publiées.

Tableau IV.5. Définition des LMR pour 6 des composés étudiés selon les deux étapes définies ci-dessus en relation avec l'accumulation dans les tissus d'escargots. Données obtenues des DAR (EC 1998b, 2004, 2005a, 2007b, 2007a), du Règlement 839/2008 (EC 2008) et des sites Santé Canada (http://www.hc-sc.gc.ca), FAO/OMS (http://www.codexalimentarius.net) et EU pesticides database (http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=substance.selection).

Substance	Métabolites identifiés dans les animaux	Métabolisme dans les animaux (étape 1)	Définition des résidus (étape 1)	Méthode analytique dans les produits animaux (viande, œufs, lait) (étape 2)	LMR produit animal (mg kg^{-1})	[escargots] (mg kg^{-1})
Glyphosate	AMPA	s.a. rapidement excrétée sous forme inchangée.	Glyphosate	Fragmentation / Agitation (eau basique) Centrifugation / Ebullition du surnageant Centrifugation / SPE / Lavage au charbon Centrifugation / Evaporation à sec Dérivation / Centrifugation Extraction liquide/liquide Analyse GC-MS	0,1	6 AMPA : 8
Tébuconazole	37	s.a. hautement métabolisée. Peu de s.a. trouvée mais pas d'importance toxicologique donnée aux métabolites.	Tébuconazole	Extraction MeOH Filtration Fractionnement dichlorométhane (dichlo)/eau Fraction organique hydrolysée avec acide hydrochlorique / Purification Analyse GC-NPD	0,1	0,8
Pyraclostrobine	Environ 50	s.a. hautement métabolisée.	Pyraclostrobine + 2 métabolites	HPLC-MS/MS	0,05	0,7
Folpel	Thiazolidine, acide phthalamique, phthalique anydryde, acide phthalique et phthalimide	s.a. rapidement et hautement métabolisée, principalement en phthalimide.	Folpel	Extraction acétone + acide 0-phosphorique. Fractionnement dichlo / Purification par GPC Purification gel de silice Analyse GC-ECD	ND	-
Cymoxanil	Substances naturelles (acides gras, glycine, acines aminés, glycérol, lactose…).	Pas de résidus de s.a. ni de ses métabolites.	ND	ND	0,05	-
Glufosinate	MPP, NAG et MPA	s.a rapidement excrétée sous forme inchangée. Principaux résidus = s.a. et MPP	Glufosinate + MPP + NAG	Extraction eau Purification par échange d'anions ou précipitation avec éthanol/acétone suivant nature matrice / Evaporation à sec Dérivation avec trimethyl orthoacétate dans acide acétique glacial / Purification sur colonne de gel de silice. Analyse GC-FPD	0,1	-

ND : non déterminé ; s.a. : substance active.

Les consommateurs, régulièrement alertés par les organismes publics (tels que l'ANSES, l'INERIS, l'ADEME…) de leur possible exposition aux pesticides à travers leur alimentation, souhaitent une réglementation plus stricte, avec plus de contrôles et, d'une manière générale, une meilleure qualité des aliments. Il y a donc nécessité, en amont, de développer des outils et des méthodes permettant des quantifications toujours plus fines et de rassembler de nombreuses données d'exposition et d'accumulation. La préoccupation des pouvoirs publics quant à l'exposition aux pesticides des consommateurs ressort à travers certaines grandes enquêtes nationales : les études de l'alimentation totales (EAT) 2006-2010 pilotées par l'ANSES ; étude SAPOTILLE 2008-2010 pilotée par l'ANSES sur les résidus de pesticides dans les denrées alimentaires aux Antilles ; le Plan Interministériel de Réduction des Risques liés aux Pesticides (PIRRP) 2006-2009 dont un des axes est de renforcer la connaissance et la transparence en matière d'impact sanitaire et environnemental ; la mise en place de l'Observatoire des Résidus de Pesticides (ORP) qui a entre-autres pour mission de rassembler les informations sur les contrôles et mesures de résidus de pesticides dans les milieux et produits consommés par l'homme. Au niveau international, la réunion conjointe FAO/OMS sur les résidus de pesticides (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, JMPR) a lieu chaque année et des experts internationaux évaluent l'exposition humaine aux pesticides et fixent les LMR. L'exposition aux pesticides par le sol est une source prise en compte dans l'évaluation du risque sanitaire notamment chez les enfants du fait de l'ingestion accidentelle de sol (Bouvier 2009). Nos données d'accumulation complètent les données sur les résidus présentées dans les DARs de chaque substance et peuvent révéler des résultats inattendus par rapport aux limites de résidus fixées (cas du glyphosate et de l'AMPA dans notre étude). C'est dans ce sens que les données acquises dans ces travaux sur les 6 molécules organiques présentées dans le Tableau IV.5 permettent de contribuer à l'évaluation du risque sanitaire.

IV.4 Conclusion et perspectives

Nos travaux, s'inscrivant dans une approche intégrée « Exposition – Transferts – Effets » des pesticides à l'escargot, contribuent à l'apport de méthodes, d'outils et d'informations écotoxicologiques pouvant aider à l'amélioration de l'évaluation du risque des contaminants. Si la plupart des objectifs définis au début de ce manuscrit sont atteints, certaines études ont soulevé quelques limites amenant des perspectives à ce travail.

La recherche en chimie analytique n'a pas pu aboutir à la mise au point de l'ensemble des méthodes nécessaires. Nos objectifs dans ce domaine étaient ambitieux car nous avons voulu suivre un itinéraire d'usage de pesticides réellement appliqués en viticulture, ce qui imposait le développement de méthodes analytiques sur une quantité importante de substances et dans plusieurs matrices (dépôts, sol, tissus). Des difficultés ont été rencontrées, notamment sur l'analyse des herbicides polaires dans les tissus, mais comme nous avons pu le constater lors de nos recherches, un seul laboratoire en France offre la possibilité d'analyser le glyphosate dans les animaux, ce qui laisse encore de nombreuses perspectives de travail sur ces molécules. Sur la base de certains critères, notamment d'effets et de transfert, trois molécules nous paraissent prioritaires à considérer pour de futures recherches :

- Le glyphosate : l'objectif est d'aboutir à une méthode validée sur l'extraction et l'analyse de cette substance dans les escargots sur la base des résultats prometteurs obtenus en fin de thèse. Le développement d'une méthode d'extraction et d'analyse dans les aliments d'origine végétale permettrait de mesurer les concentrations nominales dans les plantes ingérées par les escargots *in situ* et dans les farines alimentaires pour escargots, ce qui permettrait de s'affranchir des laboratoires privés dont les résultats ne sont pas toujours fiables (cf. Chapitre 3, section III.3.1.6).
- Le tébuconazole : la mise au point d'une méthode d'extraction et d'analyse dans les sols est nécessaire afin de pouvoir déterminer les concentrations d'exposition lors des bioessais effectués en phase solide, mais également afin de pouvoir déterminer la DT50 dans le sol de Bergbieten.
- Le glufosinate : en plus des données d'exposition et de toxicité, il serait pertinent de développer une méthode d'analyse dans les tissus afin de déterminer si l'accumulation de cette molécule préoccupante est démontrée.

L'objectif concernant l'analyse de l'embryotoxicité des pesticides est atteint et des bioessais mettant en œuvre les diverses sources d'exposition des œufs sont proposés. Cependant, si les méthodes d'exposition sont au point, des travaux sont encore nécessaires :

- Le dispositif permettant d'analyser la toxicité de substances volatiles reste à valider avec un témoin positif. Il sera dans un premier temps nécessaire d'identifier une molécule de référence efficace (c'est à dire volatile et toxique pour les embryons d'escargots), peut-être extraite à partir de boues de station d'épuration qui contiennent souvent des composés volatils.

- Pour tenter de comprendre et de limiter la variabilité intra-ponte observée dans le pourcentage d'éclosion, la recherche de l'influence du stade de développement sur les effets de contaminants doit être entreprise. Cette étude permettra de déterminer pour quelques catégories de molécules, si un ou des stade(s) sensible(s) du développement embryonnaire existent. Il sera également important de déterminer si, dans le cas où ce stade sensible existe, il est variable suivant le contaminant, en relation avec les mécanismes d'action. Cette étude contribuera alors à apporter des informations sur les sites d'action des pesticides dans les tissus animaux.
- Si les développements analytiques le permettent, la détermination de la capacité de transfert du pesticide à l'œuf, puis à l'embryon, sera un appui considérable pour comprendre les mécanismes mis en jeu et dans quelle structure et à quel moment les substances agissent. Dans le cas du bioessai en phase solide, l'analyse de la biodisponibilité (par la détermination de la quantité de substance transférée par unité de temps et de surface) des pesticides suivant le sol d'exposition pourra être déterminée.

Les études sur les effets du glyphosate sur la croissance menées en laboratoire et sur le terrain ont soulevé de nombreuses questions et hypothèses de réflexion.

- Une des perspectives prioritaire est de déterminer quelles source(s) et voie(s) d'exposition conduisent à une toxicité du glyphosate chez l'escargot. Une expérience avec plusieurs modalités pourra être réalisée en laboratoire, par exemple sur la base du test normalisé de 28 jours évaluant la croissance (ISO 15952:2006).
- Une éventuelle toxicité de l'AMPA pouvant également être mise en cause et les données bibliographiques étant trop rares pour pouvoir la confirmer ou l'infirmer, il sera nécessaire de le tester seul, au minimum avec les bioessais d'embryotoxicité en phases liquide et solide, afin de comparer sa toxicité avec celle du glyphosate.
- La comparaison de la toxicité du Bypass® et du Roundup® pourrait être envisagée en laboratoire sur la base du test normalisé de 28 jours évaluant la croissance (ISO 15952:2006).
- Le développement des TME pour l'évaluation du risque des pesticides a fait l'objet d'un numéro spécial de la revue internationale *Ecotoxicology* (Knacker *et al.* 2004; Römbke *et al.* 2004; Weyers *et al.* 2004). Selon Schaeffer *et al.* (2010), c'est un bon compromis entre le laboratoire et le terrain car les micro/mésocosmes permettent d'obtenir des effets-doses (qui peuvent être comparés avec ceux déterminés en laboratoire) tout en étant en conditions naturelles (Jansch *et al.* 2006). C'est une perspective qui pourra être envisagée.

In situ, il serait souhaitable de déterminer quelles peuvent être les conséquences sur les escargots d'une exposition cumulée à l'ensemble des formulations appliquées au cours d'un cycle cultural. Cette étude s'approcherait encore un peu plus du risque réel encouru par les organismes vivant dans la parcelle de vigne (notamment parce que les périodes d'activité des escargots coïncident avec la période des applications) et permettrait de mettre en évidence d'éventuelles interactions entre les formulations (synergie, antagonisme). Par ailleurs, cette étude, qui engloberait divers stress, chimiques mais aussi physiques et biologiques (évoqués dans la section IV.2.2.1), pourrait être conduite avec des escargots capturés à proximité de la vigne et des escargots d'élevage, ce qui permettrait de prendre en compte une éventuelle adaptation des populations autochtones à ces divers stress. La mise en place de cette expérience nécessiterait en premier lieu d'étudier les populations naturelles (diversité, abondance, accumulation de pesticides dans les tissus) et de procéder à des captures-marquages-recaptures.

Pour conclure, la Figure IV.4 présente les outils et méthodes développés au cours de ces travaux, ainsi que les connaissances apportées à l'écotoxicité des pesticides étudiés et la contribution de ces différents éléments à l'évaluation du risque environnemental et sanitaire.

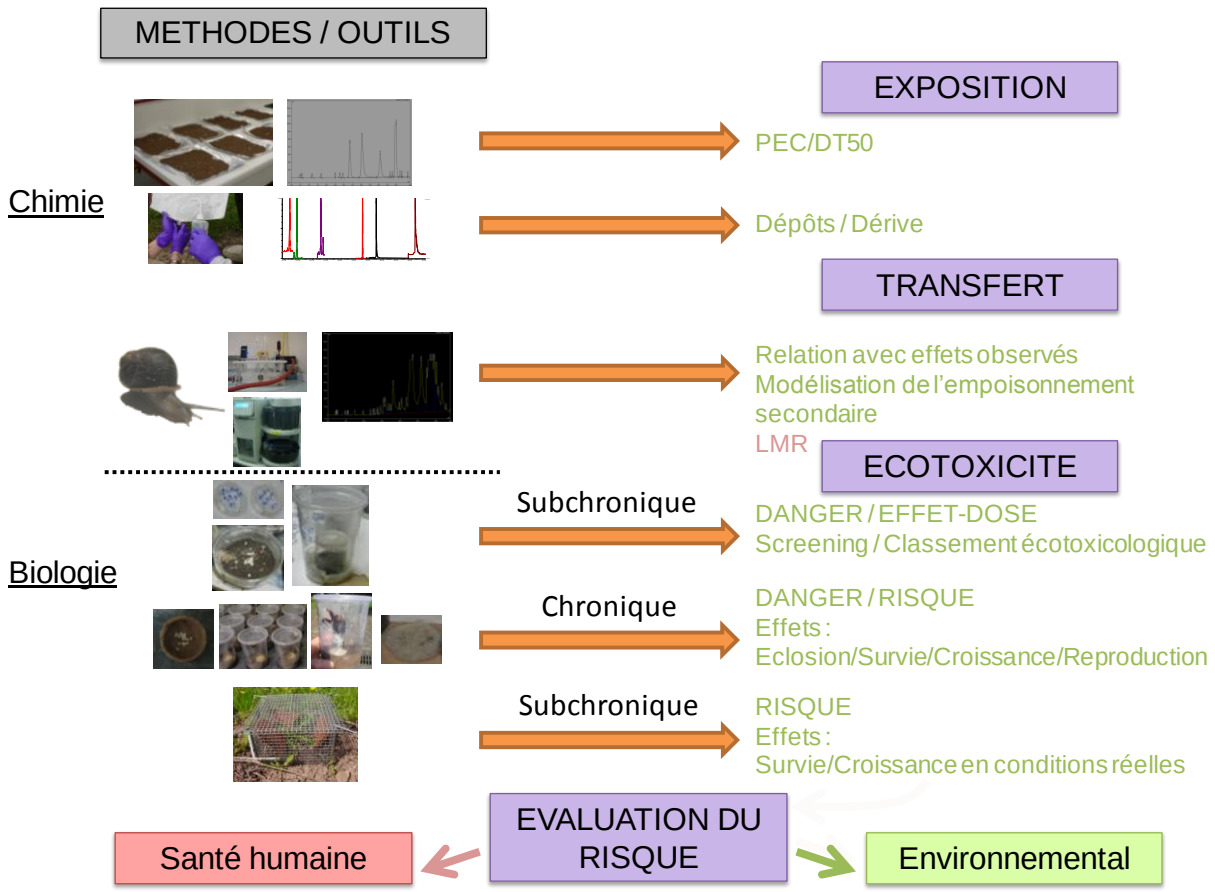


Figure IV.4. Schéma général de la contribution de ces travaux à l'évaluation du risque.

IV.5 Références

Sites internet

EU Pesticides database : données disponibles sur les LMR des pesticides

http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=substance.selection

FAO/OMS : données disponibles sur les LMR des substances chimiques

http://www.codexalimentarius.net

Santé Canada :

http://www.hc-sc.gc.ca

Terra Sys : Logiciel d'évaluation des risques écotoxicologiques

http://www.sanexen.com/fr/terrasys/index.htm

Publications

(ISO 15952:2006). Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae). Determination of the effects on growth by soil contamination. Soil quality.

AFFSET (2009). Exposition de la population générale aux résidus de pesticides en France. Synthèse des données d'utilisation, de contamination des milieux et d'imprégnation de la population. RAPPORT du groupe d'étude « Expositions, déterminants des expositions et imprégnation de la population générale aux pesticides ».

Anderson BS, Hunt JW, Phillips BM, Fairey R, Puckett HM, Stephenson M, Taberski K, Newman J et Tjeerdema RS (2001). "Influence of sample manipulation on contaminant flux and toxicity at the sediment-water interface." Marine Environmental Research **51**(3): 191-211.

Anderson BS, Hunt JW, Phillips BM, Nicely PA, Tjeerdema RS et Martin M (2004). "A comparison of in situ and laboratory toxicity tests with the estuarine amphipod *Eohaustorius estuarius*." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **46**(1): 52-60.

Barker GM (2004). Natural enemies of terrestrial mollusks. Wallingford, UK, CABI Publishing 644p.

Blais JM, Charpentie S, Pick F, Kimpe LE, Amand AS et Regnault-Roger C (2006). "Mercury, polybrominated diphenyl ether, organochlorine pesticide, and polychlorinated biphenyl concentrations in fish from lakes along an elevation transect in the French Pyrenees." Ecotoxicology and Environmental Safety **63**(1): 91-99.

Bringolf RB, Cope WG, Mosher S, Barnhart MC et Shea D (2007). "Acute and chronic toxicity of glyphosate compounds to glochidia and juveniles of *Lampsilis siliquoidea* (Unionidae)." Environmental Toxicology and Chemistry **26**(10): 2094-2100.

Castro BB, Guilhermino L et Ribeiro R (2003). "In situ bioassay chambers and procedures for assessment of sediment toxicity with *Chironomus riparius*." Environmental Pollution **125**(3): 325-335.

Coeurdassier M, Gomot de Vaufleury A, Saint-Denis M, Ribera D, Narbonne JF et Badot PM (2002). "Effects of dimethoate on snail B-esterase and growth as a function of dose, time and exposure route in a laboratory bioassay." Biomarkers **7**(2): 138-150.

Contardo-Jara V, Klingelmann E et Wiegand C (2009). "Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes." Environmental Pollution **157**(1): 57-63.

Costa PM, Neuparth TS, Caeiro S, Lobo J, Martins M, Ferreira AM, Caetano M, Vale C, Ángel DelValls T et Costa MH (2011). "Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: Laboratory versus in situ studies." Environmental Research **111**(1): 25-36.

DGAL (2010). NOTE DE SERVICE: Objet : Plan de surveillance des contaminants chimiques du milieu aquatique dans les produits de la pêche –2011. Ministère de l'alimentation de l'agriculture et de la pêche.

EC (1991). "Council directive of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. 91/414/EC." Official Journal of the European Union **L230**: 1-154.

EC (1998). Monograph of Glyphosate. Report and proposed decision. Rapporteur member state: Germany.

EC (2001). "Directive 2001/58/CE de la commission du 27 juillet 2001 portant deuxième modification de la directive 91/155/CEE définissant et fixant, en application de l'article 14 de la directive 1999/45/CE du Parlement européen et du Conseil, les modalités du système d'information spécifique relatif aux préparations dangereuses et, en application de l'article 27 de la directive 67/548/CEE du Conseil, les modalités du système d'information spécifique relatif aux substances dangereuses (fiches de données de sécurité)." Journal Officiel de l'Union Européenne **212**: 24-33.

EC (2002). Review report for the active substance glyphosate. Finalised in the Standing Committee on Plant Health at its meeting on 29 June 2001 in view of the inclusion of glyphosate in Annex I of Directive 91/414/EEC. European Comission. Health & Consumer Protection Directorate-General. Directorate E – Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions. E1 - Plant health.

EC (2004). Draft Assessment report (DAR) - public version - Initial risk assessment provided by the rapporteur Member State Sweden for the existing active ingredient Glufosinate (based on the variant glufosinate-ammonium) of the second stage of the review programme referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC. European Commission.

EC (2005). Draft Assessment report (DAR) - public version - Initial risk assessment provided by the rapporteur Member State Italy for the existing active substance Folpet of the second stage of the review programme referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC. European Commission.

EC (2006). "Réglement n°1883/2006 de la Commission du 19 décembre 2006 portant fixation des méthodes de prélèvement et d'analyse d'échantillons utilisées pour le contrôle officiel des teneurs en dioxines et en PCB de type dioxine de certaines denrées alimentaires." Journal Officiel de l'Union Européenne **364**.

EC (2007a). Draft Assessment report (DAR) - public version - Initial risk assessment provided by the rapporteur Member State Austria for the existing active substance Cymoxanil of the third stage (part B) of the review programme referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC. European Commission.

EC (2007b). Draft Assessment report (DAR) - public version - Initial risk assessment provided by the rapporteur Member State Denmark for the existing active substance

tebuconazole of the third stage of the review programme referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC. European Commission.

EC (2007c). "Réglement n°333/2007 de la Commission du 28 mars 2007 portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en plomb, en cadmium, en mercure, en étain inorganique, en3-MCPD et en benzo(a)pyrène dans les denrées alimentaires." Journal Officiel de l'Union Européenne **88**.

EC (2008). "Commission Regulation (EC) No 839/2008 of 31 July 2008 amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards Annexes II, III and IV on maximum residue levels of pesticides in or on certain products." Official Journal of the European Union **L 234**: 1-216.

ECHA (2008). Guidance for the implementation of REACH: Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.10: Characterisation of dose [concentration]-response for environment. European Chemicals Agency.

EPA (2005). Guidance for Developing Ecological Soil Screening Levels. OSWER Directive 9285.7-55. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC 20460.

EPPO (2003). "Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8: Soil organisms and functions. European and Mediterranean Plant Protection Organization." EPPO Bulletin **33**: 147-209.

Filipowicz AB, Weinstein JE et Sanger DM (2007). "Dietary transfer of fluoranthene from an estuarine oligochaete (*Monopylephorus rubroniveus*) to grass shrimp (*Palaemonetes pugio*): Influence of piperonyl butoxide." Marine Environmental Research **63**(2): 132-145.

Fritsch C, Scheifler R, Beaugelin-Seiller K, Hubert P, Coeurdassier M, de Vaufleury A et Badot P-M (2008). "Biotic interactions modify the transfer of cesium-137 in a soil-earthworm-plant-snail food web." Environmental Toxicology and Chemistry **27**(8): 1698-1707.

Gauthier C, Couture P et Pyle GG (2006). "Metal effects on fathead minnows (*Pimephales promelas*) under field and laboratory conditions." Ecotoxicology and Environmental Safety **63**(3): 353-364.

Geffard O, Budzinski H et His E (2002). "The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin." Ecotoxicology **11**(6): 403-416.

Gomot A (1998). "Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring." Ecotoxicology and Environmental Safety **41**(3): 288-297.

Hallare AV, Schirling M, Luckenbach T, Köhler H-R et Triebskorn R (2005). "Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos." Journal of Thermal Biology **30**(1): 7-17.

Hamm JT et Hinton DE (2000). "The role of development and duration of exposure to the embryotoxicity of diazinon." Aquatic Toxicology **48**(4): 403-418.

Hatch AC et Burton GA (1999). "Sediment toxicity and stormwater runoff in a contaminated receiving system: consideration of different bioassays in the laboratory and field." Chemosphere **39**(6): 1001-1017.

Hispard F, de Vaufleury A, Cosson RP, Devaux S, Scheifler R, Coeurdassier M, Gimbert F, Martin H, Richert L, Berthelot A et Badot PM (2008). "Comparison of transfer and effects of Cd on rats exposed in a short experimental snail-rat food chain or to CdCl2 dosed food." Environment International **34**: 381-389.

Hopkins WA, Staub BP, Snodgrass JW, Taylor BE, DeBiase AE, Roe JH, Jackson BP et Congdon JD (2004). "Responses of benthic fish exposed to contaminants in outdoor microcosms--examining the ecological relevance of previous laboratory toxicity tests." Aquatic Toxicology **68**(1): 1-12.

Howe CM, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Werry K et Veldhoen N (2004). "Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species." Environmental Toxicology and Chemistry **23**(8): 1928-1938.

Jansch S, Frampton GK, Rombke J, Van Den Brink PJ et Scott-Fordsmand JJ (2006). "Effects of pesticides on soil invertebrates in model ecosystem and field studies: A review and comparison with laboratory toxicity data." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(9): 2490-2501.

Jones DK, Hammond JI et Relyea RA (2011). "Competitive stress can make the herbicide Roundup® more deadly to larval amphibians." Environmental Toxicology and Chemistry **30**: 446-454.

Knacker T, van Gestel CAM, Jones SE, Soares A, Schallnass HJ, Forster B et Edwards CA (2004). "Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME) - An instrument for testing potentially harmful substances: Conceptual approach and study design." Ecotoxicology **13**(1-2): 9-27.

Lacoue-Labarthe T, Warnau M, Metian M, Oberhänsli F, Rouleau C et Bustamante P (2009). "Biokinetics of Hg and Pb accumulation in the encapsulated egg of the common cuttlefish *Sepia officinalis*: Radiotracer experiments." Science of the Total Environment **407**(24): 6188-6195.

Lacoue-Labarthe T, Warnau M, Oberhänsli F, Teyssié J-L et Bustamante P (2010). "Contrasting accumulation biokinetics and distribution of 241Am, Co, Cs, Mn and Zn during the whole development time of the eggs of the common cuttlefish, *Sepia officinalis*." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **382**(2): 131-138.

Lacoue-Labarthe T, Warnau M, Oberhänsli F, Teyssié J-L, Koueta N et Bustamante P (2008). "Differential bioaccumulation behaviour of Ag and Cd during the early development of the cuttlefish *Sepia officinalis*." Aquatic Toxicology **86**(3): 437-446.

Lee HE, Burdick CA et Olszyk DM (2005). GIS-based risk assessment of pesticides drift case study: Fresno county, California. United States Environmental Protection Agency. Washington D.C.

Lopes PC, Sucena E, Santos ME et Magalhaes S (2008). "Rapid experimental evolution of pesticide resistance in *C. elegans* entails no costs and affects the mating system." PLoS One **3**(11).

Mamy L, Gabrielle B et Barriuso E (2010). "Comparative environmental impacts of glyphosate and conventional herbicides when used with glyphosate-tolerant and non-tolerant crops." Environmental Pollution **158**(10): 3172-3178.

Mann RM et Bidwell JR (1999). "The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern australian frogs." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **36**(2): 193-199.

Oliveira-Filho EC, Geraldino BR, Grisolia CK et Paumgartten FJ (2005). "Acute toxicity of endosulfan, nonylphenol ethoxylate, and ethanol to different life stages of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835)." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **75**(6): 1185-90.

Pennati R, Groppelli S, Zega G, Biggiogero M, De Bernardi F et Sotgia C (2006). "Toxic effects of two pesticides, Imazalil and Triadimefon, on the early development of the ascidian *Phallusia mammillata* (Chordata, Ascidiacea)." Aquatic Toxicology **79**(3): 205-212.

Perkins PJ, Boermans HJ et Stephenson GR (2000). "Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay - *Xenopus*." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(4 I): 940-945.

Pietrock M, Meinelt T et Marcogliese DJ (2008). "Effects of cadmium exposure on embryogenesis of *Stagnicola elodes* (Mollusca, Gastropoda): Potential consequences for parasite transmission." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **55**(1): 43-48.

Pruell RJ, Taplin BK, McGovern DG, McKinney R et Norton SB (2000). "Organic contaminant distributions in sediments, polychaetes (*Nereis virens*) and American lobster (*Homarus americanus*) from a laboratory food chain experiment." Marine Environmental Research **49**(1): 19-36.

Relyea R et Hoverman J (2006). "Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems." Ecology Letters **9**(10): 1157-1171.

Römbke J, Van Gestel CAM, Jones SE, Koolhaas JE, Rodrigues JML et Moser T (2004). "Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME) - An instrument for testing potentially harmful substances: Effects of carbendazim on earthworms." Ecotoxicology **13**(1-2): 105-118.

Schaeffer A, Van Den Brink PJ, Heimbach F, Hoy SP, de Jong FMW, Rombke J, Roß-Nickoll M et Sousa JP (2010). Semi-field methods for the environmental risk assessment of pesticides in soil, 1st ed. Boca Raton, CRC Press 144pp.

Scheifler R, Gomot de Vaufleury A, Toussaint ML et Badot PM (2002). "Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*." Chemosphere **48**(6): 571-579.

Skingsley DR, White AJ et Weston A (2000). "Analysis of pulmonate mucus by infrared spectroscopy." Journal of Molluscan Studies **66**: 363-371.

Spurgeon DJ, Svendsen C, Lister LJ, Hankard PK et Kille P (2005). "Earthworm responses to Cd and Cu under fluctuating environmental conditions: a comparison with results from laboratory exposures." Environmental Pollution **136**(3): 443-452.

Strmac M, Oberemm A et Braunbeck T (2002). "Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae." Journal of Fish Biology **60**(1): 24-38.

Traas TP et Smit CE (2003). Environmental risk limits for aminomethylphosphonic acid (AMPA). RIVM, National Institute of Public Health and the Environment.

Varo I, Serrano R, Pitarch E, Amat F, Lopez FJ et Navarro JC (2002). "Bioaccumulation of chlorpyrifos through an experimental food chain: Study of protein HSP70 as biomarker of sublethal stress in fish." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **42**(2): 229-235.

Vignati DAL, Ferrari BJD et Dominik J (2007). "Laboratory-to-field extrapolation in aquatic sciences. Conceptual frameworks are needed to narrow the gap between laboratory- and field-based research." Environmental Science & Technology **15**(1067-1073).

Wang F, Goulet RR et Chapman PM (2004). "Testing sediment biological effects with the freshwater amphipod *Hyalella azteca*: the gap between laboratory and nature." Chemosphere **57**(11): 1713-1724.

Weyers A, Sokull-Kluttgen B, Knacker T, Martin S et Van Gestel CAM (2004). "Use of terrestrial model ecosystem data in environmental risk assessment for industrial chemicals, biocides and plant protection products in the EU." Ecotoxicology **13**(1-2): 163-176.

WHO et FAO (2009). Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. résumé (french summary). World Health Organization

Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Williams GM, Kroes R et Munro IC (2000). "Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans." Regulatory Toxicology and Pharmacology **31**(2): 117-165.

Liste des participations aux congrès nationaux et internationaux

De Vaufleury A, Druart C, Coeurdassier M, Scheifler R. *Effect of soil contamination on embryonic development and hatchability of land snail eggs.* SETAC Europe 17th Annual Meeting, 20 to 24 May 2007, Porto, Portugal. poster

Druart C, Millet M, Scheifler R, de vaufleury A. *Impact des pesticides de la vigne sur le cycle vital de l'escargot dans divers contextes d'exposition*. Journées ERICHE, 2 et 3 Octobre 2008, Saint Valéry sur Somme, France. Communication orale.

Druart C, Millet M, Delhomme, O, Raeppel C, Scheifler R, de Vaufleury A. *Snails in vineyards: active bioindication and drift effects of pesticides*. SETAC Europe 19th Annual Meeting, 31 May to 4 June 2009, Göteborg, Sweden. Poster.

Druart C, Millet M, Scheifler R, de Vaufleury A. *Les herbicides utilisés en viticulture sont ils toxiques pour l'escargot ?* Forum des jeunes chercheurs 2009, 25 et 26 Juin 2009. Dijon, France. Communication orale.

Druart C, Scheifler R, Millet M, de Vaufleury A. *Embryotoxicity testing of pesticides on snail eggs.* 14 th International Symposium on Toxicity Assessment. August 30 to September 4 2009. Metz, France. Communication orale.

Druart C, Scheifler R, Millet M, de Vaufleury A. *Approches analytiques et écotoxicologiques pour l'évaluation du devenir de pesticides en milieu terrestre*. Colloque de synthèse Chimie Pour le Développement Durable, 3 et 4 novembre 2009. Paris, France. Communication orale.

Liste des publications soumises et acceptées

Druart C, Scheifler R, de Vaufleury A, 2010. Towards the development of an embryotoxicity bioassay with terrestrial snails: Screening approach for cadmium and pesticides. *Journal of Hazardous Materials*. **184**: 26-33.

Druart C, Delhomme O, de Vaufleury A, Ntcho E, Millet M. Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **399**: 1725-1732.

Druart C, Millet M, Scheifler R, Delhomme O, de Vaufleury A. Glyphosate and glufosinate-based herbicides: fate in soil, transfer to and effects on land snails. En révisions dans *Journal of Soils and Sediments*.

Druart C, Millet M, Scheifler R, Delhomme, O, Raeppel C, de Vaufleury A. Snails as indicators of pesticide drift, deposit, transfer and effects in the vineyard. Soumis à *Science of the Total Environment*.

Druart C, Scheifler R, Millet M, de Vaufleury A. Liquid, solid and volatile phase bioassays for soil risk assessment using land snail eggs. Soumis à *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

Résumé Français

De plus en plus de substances chimiques sont produites dans le monde et une grande partie d'entre elles entrent dans la composition des produits phytosanitaires. La France en est le premier consommateur européen et le troisième au niveau mondial. L'objectif de nos recherches est de comprendre le devenir et les effets de ces molécules dans l'environnement, notamment agricole, grâce à l'utilisation d'un invertébré bioindicateur, l'escargot *Helix aspersa*. Nous avons choisi de caractériser l'exposition, le transfert et les effets sur l'escargot de 8 formulations commerciales de fongicides et d'herbicides (Roundup® et Bypass® = glyphosate; Basta® = glufosinate; Valiant® Flash = folpel + cymoxanil + fosétyl-Al; Corail® = tébuconazole; Cabrio® Top = pyraclostrobine + métirame-Zn; Thiovit® = soufre; Bouillie bordelaise = cuivre), communément utilisées en viticulture.

Une étude réalisée en conditions *in situ* a permis de quantifier les retombées au sol des pesticides appliqués sur la vigne, dans la parcelle et en périphérie mettant en évidence les dépôts suite à la dérive des substances. En parallèle, peu d'effets ont été démontrés sur la survie et la croissance d'escargots juvéniles placés en microcosmes et soumis aux différents traitements de pesticides, mis à part un effet inhibiteur du Roundup® sur la masse des organismes, probablement en relation avec d'importants dépôts au sol, l'accumulation du glyphosate et sa métabolisation en AMPA dans les tissus. Par ailleurs, le transfert de la pyraclostrobine et du tébuconazole a également été mis en évidence à de faibles concentrations, mais pourtant supérieures aux limites maximales de résidus fixées pour les produits d'origine animale. Une méthode d'extraction et d'analyse de deux herbicides (glyphosate et glufosinate) dans le sol a été développée afin de pouvoir mesurer les concentrations d'exposition pour diverses expériences et de caractériser leur persistance dans ce sol de vigne. Les effets du Bypass® et du Basta® ont été étudiés sur l'ensemble du cycle de vie de l'escargot en conditions contrôlées. Aucun effet significatif sur la survie et la croissance n'a été démontré bien qu'une accumulation de glyphosate ait été quantifiée chez des escargots (6 mg kg^{-1}) nourris continuellement par de l'aliment contaminé (à 30 mg kg^{-1}). Cependant, une exposition au glyphosate des escargots durant le développement embryonnaire semble perturber leur reproduction (diminution de la fertilité) du fait d'un effet différé de cet herbicide. Les cibles potentiellement affectées au niveau du contrôle neuroendocrine sont discutées. Tous les pesticides inhibent l'éclosion des œufs de l'escargot à des concentrations inférieures à celles appliquées au champ et l'influence des caractéristiques

du sol sur leur toxicité a été démontrée. Ces effets ont été mis en évidence lors d'expériences réalisées en laboratoire dans le cadre d'un développement de bioessais d'embryotoxicité.

Ces travaux de thèse ont apporté des connaissances sur le comportement, en surface et dans le sol, ainsi que dans l'escargot (transfert, toxicité), de plusieurs pesticides appliqués sur la vigne. Ils ont également permis de développer plusieurs outils (bioessais de laboratoire, dispositif d'exposition sur le terrain) visant à améliorer les procédures d'évaluation du risque des pesticides dans l'environnement terrestre. Les techniques d'analyse de ces composés mises au point pour des matrices complexes (sols, tissus animaux), constituent un apport original pour l'évaluation du risque environnemental et sanitaire. D'importantes difficultés analytiques ont été rencontrées et il n'a pas été possible de finaliser les méthodes de dosage pour la totalité des substances. Ainsi, la mesure des résidus de pesticides dans les tissus d'origine animale reste un challenge fort et qui plus est, au cœur des préoccupations environnementales actuelles.

Mots clés : Pesticides, escargots, vigne, dérive, écotoxicité, embryotoxicité, bioessais, bioindication, microcosmes, méthodes d'extraction et d'analyse, sol, matrices complexes, accumulation, biodisponibilité, évaluation du risque.

Résumé Anglais

An increasing number of chemicals are produced worldwide and a large part of them are plant protection products (PPPs). France is the first European consumer of PPPs and the third on the global level. The aim of our research was to investigate the fate and the effects of pesticides in the environment, particularly in the agrosystem, with the use of a bioindicator model, the snail *Helix aspersa*. We chose to characterize the exposure, the transfer and the effects on snails of 8 commercial herbicide and fungicide formulations (Roundup® and Bypass® = glyphosate; Basta® = glufosinate; Valiant® Flash = folpet + cymoxanil + fosetyl-Al; Corail® = tebuconazole; Cabrio® Top = pyraclostrobin + metiram-Zn; Thiovit® = sulphur; Bordeaux mixture = copper salts), commonly employed in vineyards.

A field study in real conditions of pesticide application allowed the quantification of the spray deposits on soil in the parcel and in its surroundings showing the PPP drift deposits. At the same time, few effects were demonstrated on the survival and growth of juvenile snails exposed in microcosms to the different treatments, except for growth inhibition after Roundup® exposure, probably in relation to heavy spray deposits on the soil, accumulation of

glyphosate and metabolisation in AMPA in the tissues. Moreover, the transfer of pyraclostrobin and tebuconazole was also demonstrated at low concentrations, but however higher than LMR drawn for animal products. A soil extraction and analysis method involving two herbicides (glyphosate, glufosinate) was developed allowing the determination of exposure concentrations along the experiments and their persistence in a vineyard soil. The effects of Bypass® and Basta® were studied on the whole life cycle of snails in laboratory conditions. No significant effects were shown on survival and growth although an accumulation of glyphosate was revealed in snails (6 mg kg^{-1}) exposed continuously to contaminated food (30 mg kg^{-1}). However, we found that exposure of snails to glyphosate during their embryonic development tended to disrupt reproduction in the resulting adult snail (by decreasing fertility) due to a delayed effect of the herbicide. The potential targets affected at the level of neuro-endocrine control are discussed. All pesticides inhibited egg hatching success at lower concentrations than those applied in the field and the influence of soil characteristics on the toxicity of the pesticides was demonstrated. These effects were showcased by laboratory experiments that led to the development of embryotoxicity bioassays.

This work has contributed to current understanding of the in- and on-soil fate and effects on snails (transfer and toxicity) of various pesticides applied to the vineyard. It allowed the development of tools (laboratory bioassays and field exposure device) that could help improving pesticide risk assessment proceedings in a terrestrial environment. The analysis methods designed for use in complex matrixes (soil and animal tissues) make an original contribution to environmental and human health risk assessment. Extensive analytic difficulties were encountered and it was not possible to finalize the analytical methods for all of the substances studied. Thus, the determination of pesticide residues in animal tissues still represents an essential challenge for current environmental concerns.

Keywords: pesticides, snails, vineyard, drift, ecotoxicity, embryotoxicity, bioassays, bioindication, microcosms, extraction and analytical methods, soil, complex matrixes, accumulation, bioavaibility, risk assessment.

Ce travail a été realisé au Laboratoire Chrono-Environnement à Besançon et au Laboratoire des Matériaux, Surfaces et Procédés pour la Catalyse à Strasbourg.

Thèse financée par l'Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie (ADEME) et le Conseil Régional de Franche-Comté. Ce travail a également bénéficié du soutien financier du réseau de recherche « Evaluer et Réduire l'Impact de la Chimie sur l'Environnement » (ERICHE) au sein du programme « Chimie Pour le Développement Durable » du CNRS, du programme interdisciplinaire INSU-CNRS « Ecosphère Continentale et Côtière » (EC2CO) et de l' « Association des Femmes Françaises Diplômées de l'Université » (AFFDU).