



**HAL**  
open science

# Caractérisation de la contamination en pesticides azoles et néonicotinoïdes chez les espèces d'intérêt localisées en région Nouvelle-Aquitaine : développement de méthodes analytiques et applications

Louise Prouteau

► **To cite this version:**

Louise Prouteau. Caractérisation de la contamination en pesticides azoles et néonicotinoïdes chez les espèces d'intérêt localisées en région Nouvelle-Aquitaine : développement de méthodes analytiques et applications. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2021. Français. NNT : 2021LAROS019 . tel-04224004

**HAL Id: tel-04224004**

**<https://theses.hal.science/tel-04224004>**

Submitted on 1 Oct 2023

**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.



LA ROCHELLE UNIVERSITÉ

ÉCOLE DOCTORALE  
*EUCLIDE*

Laboratoire Centre d'Etudes Biologiques de Chizé UMR 7372

THÈSE

présentée par :

**Louise PROUTEAU**

soutenue le 27 septembre 2021

pour l'obtention du grade de Docteur de La Rochelle Université

Discipline : Sciences et technologie mention eau, sol, environnement

**Caractérisation de la contamination en pesticides azoles et néonicotinoïdes  
chez les espèces d'intérêt localisées en région Nouvelle-Aquitaine :  
développement de méthodes analytiques et applications**

Sous la direction de : Olivier CHASTEL et Hélène BUDZINSKI

Encadrant : Frédéric ANGELIER

Membres du jury :

<b>Maurice MILLET</b>	PR (HDR), Université de Strasbourg, CNRS	Rapporteur
<b>Emmanuelle VULLIET</b>	DR (HDR), Université de Lyon, CNRS	Rapporteuse
<b>Fabrizio BOTTA</b>	Chercheur, Docteur, ANSES	Examinateur
<b>Clémentine FRITSCH</b>	CR, Université de Franche-Comté, CNRS	Examinatrice
<b>Aurélien GOUTTE</b>	MCF (HDR), Sorbonne Université, CNRS	Examinatrice
<b>Stéphane REYNAUD</b>	PR (HDR), Université Grenoble Alpes, CNRS	Examinateur
<b>Hélène BUDZINSKI</b>	DR (HDR), Université de Bordeaux, CNRS	Codirectrice de thèse
<b>Olivier CHASTEL</b>	DR (HDR), La Rochelle Université, CNRS	Directeur de thèse

Membre invité :

<b>Frédéric ANGELIER</b>	DR (HDR), La Rochelle Université, CNRS	Encadrant de thèse
--------------------------	--	--------------------







# Avant-propos

## Affiliations

1<sup>ère</sup> affiliation :

UMR 7372 CNRS

Centre d'Etudes Biologiques de Chizé (CEBC)

Equipe Ecophysiologie et changements globaux (Ecophy)

La Rochelle Université

405 Route de Prissé la Charrière

79369 Villiers-en-Bois

France

2<sup>ème</sup> affiliation (lieu principal de réalisation de la thèse) :

UMR 5805 CNRS

L'équipe de Physico- et Toxic-Chimie de l'environnement (LPTC)

Université de Bordeaux

Bâtiment A12, 2<sup>ème</sup> étage ouest

351 cours de la Libération

33405 Talence

France



## Remerciements

Pour parvenir à réaliser cette thèse, de nombreuses personnes m'ont aidée et je souhaite les remercier une par une.

Je souhaite tout d'abord présenter mes remerciements à mon directeur de thèse, Olivier, qui m'a offert l'opportunité de préparer cette thèse. Merci pour la confiance que tu m'as confiée dès le lancement du projet. C'est sans hésiter que je me suis lancée dans l'aventure au sein de ton équipe Ecophy.

Un grand merci à Frédéric, mon encadrant de thèse, avec qui j'ai énormément échangé. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi aussi bien sur le plan scientifique qu'humain. Ta bienveillance permanente, ton écoute et ta compréhension m'ont permis d'avancer sereinement tout au long de cette thèse.

Et surtout, Hélène, je t'adresse mes sincères remerciements. Co-directrice sur le papier mais au vu de mon profil analytique et de mon temps de thèse 100 % sur Bordeaux, c'est avec toi que j'ai le plus interagi. Merci pour ces nombreux points où ton investissement était sans faille et surtout en toute confiance. La rigueur et le souci du détail pour comprendre les ficelles du développement analytique sont des qualités que j'ai grandement renforcées en étant à tes côtés. Tu m'as beaucoup apporté.

Je souhaite également remercier les rapporteurs de cette thèse à savoir Maurice MILLET et Emmanuelle VULLIET pour le temps consacré à la correction de ce manuscrit. Merci également aux autres membres du jury : Fabrizio BOTTA, Clémentine FRITSCH, Aurélie GOUTTE et Stéphane REYNAUD, pour avoir accepté d'examiner ce travail et de participer à la soutenance.

Patrick, ton aide m'a été précieuse pour mener à bien ces travaux de thèse. Merci pour l'autonomie que tu m'as donnée sur les machines LC-MS/MS bien que tu sois venu à ma rescousse plus d'une fois lorsque je ne parvenais pas à résoudre moi-même les nombreux mauvais sorts lancés. Tu as sérieusement contribué à l'agrandissement de mes connaissances sur la chromatographie liquide grâce à ta transmission de savoir en toute pédagogie. Ce fut un réel plaisir de partager ces moments avec toi.

Mes remerciements se portent également vers Nathalie, Karyn, Laurent, vous qui m'avez formée sur de nombreuses techniques d'extraction. J'adresse mes remerciements également à l'ensemble des membres de l'équipe LPTC qui ont partagé mon quotidien au laboratoire.

L'univers du laboratoire m'a également permis de rencontrer de nombreuses belles personnes et ainsi créer des amitiés fortes. Un grand merci à Nacho pour n'avoir jamais douté de mes capacités et qui a fait raisonner mon rire jusqu'à l'autre bout du couloir du laboratoire (étant bon public, ce n'est pas très compliqué). Manon, je ne te remercierai jamais assez pour ta bienveillance, ta bonne humeur, ton aide à toutes épreuves et j'en passe... Marine, présente dès nos débuts respectifs, tu m'as également été tellement précieuse en se soutenant mutuellement. Merci à Thibault pour les moments extrêmes entre rire et rage au bureau. Ouss, on va y parvenir en même temps et surtout merci à toi pour ton smile à toute épreuve.

Les « anciens » vous avez également contribué à la réussite de ma thèse grâce à vos conseils multiples en tous genres. J'ai dû peaufiner mon sens d'observation grâce à ton second degré Juliette, un grand merci d'avoir été là à veiller sur moi. Merci également à vous Geoffroy, Caro, Laurine, Vincent pour vos conseils. On a formé un beau collectif grâce à Camille, Laura, Nathalie, Marine, Marie, Thomas, Alexis, Chrystelle et Aurélie. Merci pour les beaux moments



passés ensemble que ce soit à nos déjeuners ou dîners/afterwork autour d'un verre, d'un billard, d'une pétanque ou d'un molky. Ces agréables moments étaient également partagés avec Rémi, Cedly, Adriana, Valentin, Pauline, Stéphane, Nicolas : merci à vous tous.

Du côté CEBC, je souhaite remercier François pour ta bonne humeur permanente notamment lors de l'épisode de terrain avec Bertille. Mon rire a également raisonné dans les couloirs du CEBC pour que tu puisses me repérer. Merci aux membres de ce laboratoire pour votre gentillesse avec qui j'ai pu échanger voire apercevoir lors de mes différentes venues sur le site : Charline, Delphine, Erika et Sydney.

Je souhaite également présenter mes remerciements à mes anciens directeurs de stage ingénieur qui m'ont soutenu, de loin, tout au long de cette thèse : Yvan et Ronan. Vous avez réellement contribué à mon souhait de continuer dans cette voie.

Je souhaite remercier mes nombreux amis, rencontrés en amont ou en parallèle de ma venue sur Bordeaux, pour leur soutien sans faille. Avec Gwendo c'est toujours plus et surtout toujours au top, merci ma Gwendo tout simplement. Clément, Camille nos rendez-vous réguliers tout au long de ces trois ans vont beaucoup me manquer, merci à vous pour ces moments de fraîcheurs. Toujours un plaisir de vous avoir auprès de moi Clément et Gauthier. Emeline, Antoine, Nathalie merci les papis/mamis. Etienne, Cédric, je vous remercie tous les deux en même temps au nom de la team Prt. Talita, Julie, Lucile, Camille, Sarah, Lou, Béné, Manon des amis de plus longue date qui avez toujours été là pour moi (et ce n'est pas terminé). Thank you Sai and Varuni for your deep friendship, I will never forget you.

Vous avez rendu ma vie pleine d'émerveillement de par votre présence permanente, c'est pour cela que vous êtes des partenaires de badminton et de vie en or. Cécilou (la campeuse), je ne te fais pas de spéciale dédicace puisque tu n'aimes pas ça... dommage ! Isa (Gradur), Alexou (Ma copine le koala), Gégé (Hbibbi), Clémentine (Ma partenaire R5 préférée), Flo' (Le snake), Jeje (Redrum frère diamant), Maxou (le ciel est bleu / sapé comme jamais) : un énorme merci pour ces moments de franches rigolades et de confessions multiples (Cécile tu en fais partie t'inquiètes pas). Laura, Domi, merci à vous les partenaires de Barbey et les nombreux autres joueurs. Un énorme merci aux électrons libres qui ne font pas de badminton mais c'est tout comme : Aurélie (Auré La Rage), Micka (Le Trépied) et Ju' (Le gémissieur). Les surnoms sont encore bien plus nombreux et sont à l'image de toutes ces expériences vécues ensemble ... et ce n'est certainement pas terminé ! Merci également à celles qui étaient présentes à mes débuts sur Bordeaux, vous m'avez beaucoup apporté. Qui dit sport (oui le badminton est un sport) peut dire blessure, merci aux kinés qui m'ont suivie et encouragée pour remettre ma patte pirate dans le droit chemin pendant plus d'un an.

Je termine par le plus important à mes yeux : ma famille. Je me rends bien compte de l'immense chance que j'ai de vous avoir à mes côtés. Merci à mes parents pour soutenir mes choix en toute confiance. Pierre, Violette, vous être une fratrie en or, je suis tellement heureuse de vous avoir auprès de moi. Toujours tous les cinq soudés, la promesse dure.

## Sommaire général

Avant-propos .....	5
Liste des abréviations .....	12
Liste des figures .....	15
Liste des tableaux .....	20
Liste des équations .....	23
Liste des annexes.....	23
Introduction générale.....	25
Chapitre 1 : Bibliographie .....	29
1. Les pesticides : classifications, utilisations .....	32
2. Les pesticides étudiés dans le cadre de la thèse .....	37
3. Les pesticides : transferts et occurrence dans l'environnement .....	49
4. Les pesticides : transferts et occurrence dans les organismes vivants .....	54
5. Echantillonnage jusqu'à l'analyse des pesticides.....	74
6. Protocoles d'extraction pour les molécules étudiées dans les matrices biologiques et conditions analytiques .....	82
7. Objectifs des travaux de thèse et programmes de recherche associés.....	93
Chapitre 2 : Matériel et méthodes .....	96
1. Molécules étudiées : choix et propriétés .....	99
2. Echantillonnages .....	113
3. Liste des références du matériel utilisé .....	120
4. Protocoles de préparation, d'extraction et de purification des échantillons.....	122
5. Analyse des extraits par LC-MS/MS .....	129
6. Critères qualités.....	135
7. Bilan des échantillons extraits et analysés .....	148
Chapitre 3 : Usages et présence des azoles et néonicotinoïdes dans le compartiment aérien	155
1. Explication de la démarche .....	157
2. Azoles vendus et présents dans le compartiment aérien des sites étudiés.....	158
3. Néonicotinoïdes vendus et présents dans le compartiment aérien des sites étudiés ...	171

4. Bilan sur les usages reliés à la présence des azoles et néonicotinoïdes dans le compartiment atmosphérique .....	176
Chapitre 4 : Développements analytiques et applications en matrice plasma.....	180
1. Développements en injection directe et SPE en ligne.....	182
2. Applications environnementales .....	197
3. Expériences d'exposition en laboratoire .....	214
4. Bilan des concentrations plasmatiques.....	216
Publication n°1 : Development of a method to analyse selected azoles fungicides in the plasma of free-living birds using LC-MS/MS combined with on-line SPE.....	218
Publication n°2 : High contamination of a sentinel vertebrate species by azoles in vineyards: a study of Common blackbirds in multiple habitats in Western France .....	243
Publication n°3 : Plasmatic levels of neonicotinoids as indicators of global exposure of contrasted wild birds species .....	273
Chapitre 5 : Développements analytiques et applications en matrice plume .....	301
1. Méthode de préparation de l'échantillon et d'analyse de l'extrait .....	303
2. Expérience d'exposition en laboratoire .....	320
3. Applications environnementales .....	322
4. Bilan des concentrations dans les plumes .....	357
Conclusion et perspectives .....	360
Annexes .....	367
Références bibliographiques .....	409
Liste des communications scientifiques .....	430



## Liste des abréviations

A	Azoles
AA	Acide Acétique
AASQA	Associations Agréées de Surveillance de la Qualité de l'Air
ACh	Acétylcholine
AChE	Enzyme Acétylcholinestérase
ACN	Acétonitrile
ACP	Analyse en Composantes Principales
AF	Acide Formique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
Amm A	Ammonium Acétate
Amm F	Ammonium Formate
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique ou Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APR	Appel à Projets de Recherche
ASE	Extraction par Solvant Accélérée
B	Brouage
BMR	Basal Metabolic Rate
BNVd	Banque Nationale des Ventes de produits phytopharmaceutiques par les Distributeurs agréés
CAS	Chemical Abstracts Service
CAV	Cell Accelerator Voltage
CE	Energie de Collision
CEBC	Centre d'Etudes Biologiques de Chizé
CIL	Cluzeau Info Labo
CLHP / HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute pression
DCM	Dichlorométhane
DDE	DichloroDiphényldichloroÉthylène
DDT	DichloroDiphénylTrichloroéthane
DL50	Dose Létale 50 %
DMI	Inhibiteur de la déméthylation
dMRM	Dynamique Multiple Reaction Monitoring
DRAAF	Directions Régionales de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt
DREAL	Directions Régionales de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement
DSEIO	Dose Sans Effet Indésirable Observé
DSENO	Dose Sans Effet Nocif Observé
dSPE	dispersive Solid Phase Extraction
DT50	Temps de demi-vie à 50 %
Eau MQ	Eau Milli-Q
Edge	Extraction Dispersive Energisée Guidée
EFSA	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
EG	Estuaire de la Gironde
EI	Etalon Interne
ELL	Extraction Liquide-Liquide

EMV	Electron Multiplier Voltage
EPOC	Environnements et Paléo-environnements Océaniques et Continentaux
ESI	Electrospray Ionization
F (sexe)	Femelle
F (site)	Forêt
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FBA / BAF	Bioaccumulation
FBC / BCF	Bioconcentration
F <sub>d</sub>	Fréquence de détection
F <sub>q</sub>	Fréquence de quantification
FRAC	Fungicide Resistance Action Committee
GA	Goélands Argentés
GB	Goélands Bruns
GC	Chromatographie en phase gazeuse ou Gaz Chromatography
GC-MS/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem
GM	Goélands Marins
GPS	Global Positioning System
HCB	Hexachlorobenzène
HCl	Acide Chlorhydrique
HLB	Hydrophobic Lipophilic Balance
HRAC	Herbicide Resistance Action Committee
HRMS	Spectrométrie de Masse à Haute Résolution
ID	Injection Directe
IE	Impact Electronique
IFT	Indicateur de Fréquence de Traitements de phytosanitaires
IRAC	Insecticide Resistance Action Committee
J	Juvénile
K <sub>a</sub>	Constante de dissociation dans l'eau
K <sub>oa</sub>	Coefficient de partage octanol/air
K <sub>oc</sub>	Coefficient de partage eau/carbone organique
K <sub>ow</sub> / P	Coefficient de partage octanol/eau
LC	Chromatographie en phase liquide ou Liquid Chromatography
LC-MS/MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LD	Limite de Détection
LIENSs	Littoral ENvironnement et Sociétés
LPO	Ligue pour la Protection des Oiseaux
LPTC	L'équipe Physico- et Toxic-Chimie de l'environnement
LQ	Limite de Quantification
m/z	Masse sur charge
M (sexe)	Mâle
M ± SD	Moyenne ± écart-type
M	Métabolites des néonicotinoïdes
mAChRs	Récepteurs Acétylcholine Muscariniques
MAE	Extraction Assistée par Micro-ondes
MCX	Mixed-mode Cation eXchange
MeOH	Méthanol
MgSO <sub>4</sub>	Sulfate de magnésium

MRM	Multiple Reaction Monitoring
n.s.	Non significatif
N	Néonicotinoïdes
NaCl	Chlorure de sodium
NOAEL	No Observe Adversive Effect Level
NOEC/NOEL	No Observe Effect Concentration/Level
OFB	Office Français de la Biodiversité
P.C.	Poids Corporel
PBDE	PolyBromoDiphénylEthers
PCB	PolyChloroBiphényle
PFAA	Perfluoroalkyl acides
PFAS	Perfluoroalkyl substances
pH	Potentiel Hydrogène
pK <sub>a</sub>	- Log K <sub>a</sub>
POCIS	Polar Organic Chemical Integrative Sampler
POP	Polluants Organiques Persistants
PPDB	Pesticides Properties DataBase
PRC / DC	Performance Reference Compounds / Depuration Compounds
PUF	PolyUrethane Foam
Q	Quadripôle
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
RPM	Rotations per minute
Rs	Taux d'échantillonnage
SBI	Inhibiteur de la biosynthèse des stérols
SBSE	Stir-Bar Sorptive Extraction
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SM / MS	Spectrométrie de Masse / Mass Spectrometry
SPE	Solid Phase Extraction (Extraction sur Phase Solide)
SPMD	Semi-Permeable Membrane Devices
SPME	Micro-Extraction sur Phase Solide
T / TRZ	1,2,4-triazole
TA	1,2,4 triazole alanine
TAA	1,2,4-triazole acétique acide
TC	Transition confirmation
TLA	1,2,4-triazole lactique acide
TOF	Time Of Flight
TQ	Transition quantification
Tr	Temps de rétention
U	Urbain
UHPLC	Chromatographie en phase liquide à ultra haute pression
UQAR	Université du Québec à Rimouski
US	Ultrasons
UV	Ultraviolet
V	Viticole

## Liste des figures

Figure 1 : Les grandes régions de production agricole, source recensement agricole 2010 ....	35
Figure 2 : Activités agricoles en région Nouvelle-Aquitaine / IGN GEOFLA et BdCarthage ; Source : Agreste - recensement agricole 2010 .....	36
Figure 3 : Ventés de substances actives depuis 2008 en région Nouvelle-Aquitaine .....	36
Figure 4 : IFT moyen par bassin viticole en région Nouvelle-Aquitaine en 2016 (Agreste Nouvelle-Aquitaine, 2019).....	37
Figure 5 : Structure chimique des azoles.....	38
Figure 6 : Frise chronologique de l'autorisation d'application en France sur les grandes cultures et vignes des azoles (d'après la base E-Phy).....	40
Figure 7 : Structures chimiques de la nicotine, des néonicotinoïdes, des buténolides et des sulfoximines .....	43
Figure 8 : Frise chronologique de l'autorisation d'applications en France des néonicotinoïdes, du sulfoxaflor et du flupyradifurone sur les grandes cultures et les vignes (d'après la base E- Phy) .....	46
Figure 9 : Transferts des pesticides vers les différents compartiments de l'environnement figure adaptée de Chataing (2016) et Bedos et al. (2002).....	49
Figure 10 : Schéma des différentes voies de contamination d'un organisme vivant.....	55
Figure 11 : Schéma du cheminement de l'absorption d'une molécule au sein d'un organisme	55
Figure 12 : Proposition de réactions de métabolisations de certains néonicotinoïdes (Taira et al., 2013) puis de métabolisation de l'imidaclopride chez le rat par Solecki, (2001) .....	58
Figure 13 : Composants du sang .....	59
Figure 14 : Schéma des parties de la plume .....	61
Figure 15 : Cinétique du triadiméfon après administration orale suivi dans le plasma et différents organes chez le lézard ( <i>Eremis argus</i> ) modifié à partir de Li et al. (2017).....	62
Figure 16 : Cinétique de l'imidaclopride et deux de ses métabolites après administration orale suivie dans le sang, l'urine et différents organes chez le rat femelle modifié à partir de Kapoor et al. (2014) .....	63
Figure 17 : Photographies des différentes espèces de goélands présentes en région Nouvelle- Aquitaine .....	69
Figure 18 : Photographie de l'espèce cigogne blanche présente en région Nouvelle-Aquitaine .....	71
Figure 19 : Période de reproduction des cigognes blanches ainsi que le calendrier de pousse des plumes .....	71
Figure 20 : Photographie de deux espèces de passereaux présentes en région Nouvelle- Aquitaine .....	72
Figure 21 : Photographie du crapaud épineux.....	73
Figure 22 : Concentration réelle du milieu, échantillonnage passif, échantillonnage ponctuel	74
Figure 23 : Profil d'accumulation d'une molécule dans un échantillonneur passif .....	75
Figure 24 : Design d'un échantillonnage passif d'un disque à mousse PUF .....	75
Figure 25 : Schéma d'un analyseur triple quadripôles.....	81
Figure 26 : Bilan des LQ en matrices biologiques liquides pour l'analyse des azoles présentes dans la littérature .....	85
Figure 27 : Bilan des LQ en matrices biologiques liquides pour l'analyse des néonicotinoïdes présentes dans la littérature .....	88



Figure 28 : Bilan des LQ en matrices biologiques solides (plumes, cheveux) pour l'analyse des azoles et des néonicotinoïdes présentes dans la littérature .....	92
Figure 29 : Bilan des axes et chapitres du projet de thèse.....	94
Figure 30 : Registre parcellaire 2019 source Geoportail, accompagné des espèces dont leur sang et/ou plumes ont été échantillonnés ainsi que les échantillons de mousses PUF .....	113
Figure 31 : Capture d'un merle noir dans le filet installé.....	115
Figure 32 : Cultures présentes aux alentours des sites de prélèvement d'air mousses PUF – source géoportail 2019 .....	118
Figure 33 : Schéma de l'expérience d'exposition au tébuconazole des moineaux domestiques via l'eau de boisson .....	119
Figure 34 : Etapes du protocole d'extraction en matrice plasma.....	123
Figure 35 : Etapes du protocole de préparation des plumes.....	124
Figure 36 : Etapes des différents protocoles d'extraction des plumes .....	125
Figure 37 : Etapes du protocole d'extraction des mousses PUF .....	127
Figure 38 : Schéma de l'ajout des EI et natifs en fonction de l'évaluation de la perte protocole ou effet matriciel .....	140
Figure 39 : LQ validées pour les deux méthodes d'acquisition P1 (toutes les molécules)et 5N (ces 5 néonicotinoïdes).....	144
Figure 40 : Périodes principales d'application des azoles sur les vignes et grandes cultures selon le mois de l'année .....	159
Figure 41 : Evolution des concentrations en azoles estimées en ng/m <sup>3</sup> dans les mousses PUF) selon les dates d'échantillonnages pour les trois sites (site n°4 forestier, site n°6 viticole et site n°7 viticole).....	164
Figure 42 : Modélisation NOAA HYSPLIT sur la provenance des vents 24 heures avant trois dates de l'année 2017 sur les deux sites n°4 et n°6 à 1,20 m de hauteur .....	167
Figure 43 : Comparaison des concentrations obtenues dans notre étude avec la littérature où A : toutes les publications exceptée la vi en ng/m <sup>3</sup> , B : toutes les publications exceptées la iv et la vi en ng/m <sup>3</sup> et C : uniquement la vi avec les concentrations en ng/PUF issues du Tableau 7 mentionnées dans le chapitre 1.....	169
Figure 44 : Quantités de fenbuconazole vendues en France entre 2008 et 2019 (source BNVD) .....	170
Figure 45 : Périodes principales d'application des néonicotinoïdes sur les vignes et grandes cultures selon le mois de l'année.....	172
Figure 46 : Evolution des concentrations en néonicotinoïdes estimées en ng/m <sup>3</sup> dans les mousses PUF) selon les dates d'échantillonnages pour les trois sites (site n°4 forestier, site n°6 viticole et site n°7 viticole).....	175
Figure 47 : Diagrammes des LQ extrapolées des EI azoles dans le plasma de différente espèces.....	184
Figure 48 : TQ et TC du triadiméfon sur un plasma dopé à la LQ poulet et de cigogne blanche .....	184
Figure 49 : Influence de la tension de buse sur les aires de la transition de quantification du dinotéfurane.....	185
Figure 50 : LQ extrapolées obtenues avec les conditions de source optimisées pour les néonicotinoïdes divisée par celles obtenues avec la méthode optimisée des azoles (n = 2) ..	186
Figure 51 : Rapport des aires pour différents temps de chargement sur la cartouche pré-colonne C18 en SPE en ligne pour les néonicotinoïdes, leurs métabolites et leurs EI .....	188

Figure 52 : Allure du pic chromatographique de la transition de quantification (TQ) du dinotéfurane pour deux temps de chargement sur la cartouche pré-colonne C18 en SPE en ligne.....	189
Figure 53 : LQ extrapolée en pg injectés (n = 3) pour l'injection d'une solution à 20 pg inj avec 12,5 % d'acétonitrile pour les méthodes néonicotinoïdes et leurs métabolites individuelles ainsi que regroupée.....	191
Figure 54 : LQ extrapolée sur des plasma de poulet dopés à la LQ pour les deux protocoles 25 et 10 µL de prise d'essai pour les néonicotinoïdes.....	191
Figure 55 : Diagrammes des LQ extrapolées des EI néonicotinoïdes dans le plasma de différentes espèces.....	193
Figure 56 : Lignes de base obtenues pour la TQ du tétraconazole lors d'un blanc système en ID.....	196
Figure 58 : Boîtes à moustaches des concentrations en azoles quantifiés chez les merles noirs et mésanges charbonnières viticoles des mois de juin/juillet 2019. Test statistique Kruskal-Wallis (* indique p-value < 5 %, ** < 1 % et *** < 0,1 %, n.s. : non significatif).....	200
Figure 59 : Somme des concentrations en azoles (toutes les valeurs sont prises et pas seulement celles supérieures à la LQ) par individu de cigognes blanches de l'estuaire de la Gironde.....	202
Figure 60 : Localisation des sites de capture des cigognes blanches en estuaire de la Gironde accompagnée du registre parcellaire 2019 (Géoportail).....	203
Figure 61 : Fréquences de détection et quantification des néonicotinoïdes chez les merles noirs, les cigognes blanches et les goélands (marins, argentés et bruns).....	205
Figure 62 : Concentrations plasmatiques en néonicotinoïdes chez les merles noirs viticoles des deux années 2016 et 2019 superposées avec la concentration quantifiée dans une mousse PUF de 2017.....	207
Figure 63 : Proportion d'habitat marin ou terrestre quand les néonicotinoïdes ont été quantifiés ou non chez les goélands bruns munis d'une balise GPS.....	208
Figure 64 : Relation entre la somme des concentrations en néonicotinoïdes avec différentes signatures isotopiques pour les trois espèces de goélands.....	209
Figure 65 : Analyse en composantes principales sur les azoles et néonicotinoïdes quantifiés en matrice plasma de quatre espèces d'oiseaux.....	212
Figure 66 : Concentrations cumulées en néonicotinoïdes et leurs métabolites chez les merles noirs, goélands argentés et goélands bruns.....	213
Figure 67 : Etapes du protocole analytique pour l'analyse des plumes.....	303
Figure 68 : Rapport des LQ obtenues par rapport au témoin « Ki » pour les trois méthodes d'extraction assistée par micro-ondes (MO), ultrasons (US), Edge pour les azoles (A), néonicotinoïdes (B) et leurs métabolites (C).....	305
Figure 69 : Rapport des bruits par rapport au témoin « Ki » pour les azoles avec et sans prélavage des Q-Cup et filtres Edge.....	306
Figure 70 : Comparaison des LQ entre le protocole d'extraction au méthanol/eau avec celui seulement au méthanol pour les trois méthodes d'extraction assistée par micro-ondes (MO), ultrasons (US), Edge en azoles (A), néonicotinoïdes (B) et leurs métabolites (C).....	307
Figure 71 : Impact sur l'aire normalisée par la concentration de la double extraction assistée par micro-ondes pour les azoles, les néonicotinoïdes et leurs métabolites en matrice plume.....	307
Figure 72 : Aire normalisée par la masse pour évaluer la perte de composés durant l'étape de purification SPE.....	308

Figure 73 : LQ extrapolées en solvant et en matrice plume avec et sans purification par SPE comparées avec les LQ validées dans la littérature .....	309
Figure 74 : Etapes du protocole retenu et ajout des étalons internes pour quantifier les pertes .....	309
Figure 75 : Rendements par étalonnage interne tout au long des étapes du protocole retenu pour les azoles (A), les néonicotinoïdes (B), et leurs métabolites (C) en solvant.....	311
Figure 76 : Rendements par étalonnage interne tout au long des étapes du protocole retenu pour les azoles (A), les néonicotinoïdes (B), et leurs métabolites (C) en matrice plume .....	313
Figure 77 : LQ extrapolées des étalons internes (EI) dans les échantillons de plumes des différentes espèces afin de regarder l'effet matriciel pour les azoles (A), les néonicotinoïdes et leurs métabolites (B/C).....	316
Figure 78 : Impact de la tension EMV sur les LQ de la plume de référence dopée à la LQ..	317
Figure 79 : Impact des « dwell time » pour les 5 néonicotinoïdes sur la sensibilité de la plume de référence dopée à la LQ.....	317
Figure 80 : Comparaison des LQ validées en matrice plume avec la littérature.....	319
Figure 81 : Résultats de l'expérience d'exposition au tébuconazole en matrice plume.....	320
Figure 82 : Proportion des concentrations quantifiées en matrice plume pour les échantillons de merles noirs avec au moins une molécule quantifiée par individus en 2016 et moyenné par sites pour 2017 et 2019.....	326
Figure 83 : Boîtes à moustaches représentant les azoles quantifiés dans les plumes de merles noirs pour les trois habitats et pour les trois années accompagnées du test statistique Kruskal-Wallis pour 2016 et Mann-Whitney pour 2019 (* indique p-value < 5 %, ** < 1 %, *** < 0,1 %, n.s. : non significatif) .....	327
Figure 84 : Concentrations plumes pour 6 azoles reliées à la date de capture du merle noir en site n°6 viticole.....	329
Figure 85 : Boîtes à moustaches représentant les azoles quantifiés dans les plumes de cigognes blanches pour les deux habitats accompagnées du test statistique Mann-Whitney (* indique p-value < 5 %, ** < 1 %, *** < 0,1 %, n.s. : non significatif).....	331
Figure 86 : Concentration cumulée en azoles par individu des deux espèces de goélands argentés (GA) et bruns (GB) ordonnée de façon décroissante .....	333
Figure 87 : Relation entre la somme des concentrations en azoles avec les taux isotopiques pour les deux espèces de goélands argentés et bruns en matrice plume, tests statistiques en Annexe 14 sous-partie a .....	334
Figure 88 : Comparaison des concentrations maximales en matrice plume dans le cadre de notre étude avec celles en matrice cheveu dans la littérature pour les azoles .....	336
Figure 89 : Boîtes à moustaches représentant les néonicotinoïdes quantifiés dans les plumes de merles noirs pour les trois habitats et pour les trois années accompagnées du test statistique Kruskal-Wallis .....	339
Figure 90 : Concentrations plumes et mousses PUF pour 5 néonicotinoïdes reliées à la date de capture du merle noir en site n°6 viticole.....	340
Figure 91 : Concentration cumulée en néonicotinoïdes et leurs métabolites par individus des deux espèces de goélands argentés (GA) et bruns (GB) ordonnée de façon décroissante.....	343
Figure 92 : Relation entre la somme des concentrations en néonicotinoïdes avec les taux isotopiques pour les deux espèces de goélands argentés et bruns en matrice plume, tests statistiques en Annexe 14 sous-partie b .....	344
Figure 93 : Corrélation entre les métabolites quantifiés en matrice plume par rapport à leur molécule parent .....	345

Figure 94 : Formule chimique des 5 néonicotinoïdes vendus en région Nouvelle-Aquitaine	346
Figure 95 : Comparaison des concentrations maximales en matrice plume dans le cadre de notre étude avec celles en matrices cheveu et plume dans la littérature pour les néonicotinoïdes.....	347
Figure 96 : Analyse en composantes principales sur les azoles et néonicotinoïdes quantifiés en matrice plume de trois espèces d'oiseaux .....	349
Figure 97 : Corrélation entre les concentrations en azoles plasmatiques et dans les plumes.	351
Figure 98 : Corrélation entre les concentrations en néonicotinoïdes plasmatiques et dans les plumes .....	352
Figure 99 : Bilan des azoles, néonicotinoïdes et certains de leurs métabolites quantifiés en matrices mousses PUF, plasma et plumes des différentes espèces capturées en région Nouvelle-Aquitaine .....	363

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Usages des azoles .....	39
Tableau 2 : Quantités de substances actives de la famille des azoles achetées dans la région Nouvelle-Aquitaine d'après les données de la BNVD.....	41
Tableau 3 : Valeurs des NOAEL/NOEL (mg/kg p.c. jour) et DL50 orale (mg/kg p.c.) pour les azoles sur PPDB pour les mammifères et les oiseaux.....	42
Tableau 4 : Usages des néonicotinoïdes.....	44
Tableau 5 : Quantités de substances actives de la famille des néonicotinoïdes achetées dans la région Nouvelle-Aquitaine d'après les données de la BNVD.....	47
Tableau 6 : Valeurs des NOAEL/NOEL et DL50 orale pour les néonicotinoïdes sur PPDB pour les mammifères et les oiseaux.....	48
Tableau 7 : Azoles et néonicotinoïdes analysés dans l'air en France et en Espagne d'après la bibliographie.....	53
Tableau 8 : Concentrations des néonicotinoïdes et leurs métabolites obtenues dans le plasma/sang et plumes de provenance environnementale dans la littérature .....	65
Tableau 9 : Concentrations des azoles, néonicotinoïdes et leurs métabolites obtenues dans les cheveux et urine de provenance environnementale dans la littérature .....	66
Tableau 10 : Bilan des conditions d'extraction et d'analyse pour les azoles dans les matrices biologiques liquides à provenance environnementale ou expérimentale de la littérature .....	83
Tableau 11 : Bilan des conditions d'extraction et d'analyse pour les néonicotinoïdes dans les matrices biologiques liquides à provenance environnementale ou expérimentale de la littérature .....	86
Tableau 12 : Bilan des conditions de préparation d'échantillon, d'extraction et d'analyse pour les azoles et néonicotinoïdes dans les matrices biologiques solides (plumes et cheveux) à provenance environnementale ou expérimentale de la littérature .....	90
Tableau 13 : Quantités de substances actives azoles achetées en région Nouvelle-Aquitaine de 2013 à 2019 et vendues dans les deux départements Charente et Charente-Maritime en 2017 par types de culture .....	100
Tableau 14 : Propriétés physico-chimiques, réactivité et écotoxicologie des azoles étudiés dans le cadre de la thèse .....	102
Tableau 15 : Propriétés physico-chimiques, réactivité et écotoxicologie des métabolites des azoles listés mais non analysés dans le cadre de la thèse.....	106
Tableau 16 : Quantités de substances actives néonicotinoïdes achetées en région Nouvelle-Aquitaine de 2013 à 2019 et vendues dans les deux départements Charente et Charente-Maritime en 2017 par types de culture .....	107
Tableau 17 : Propriétés physico-chimiques, réactivité et écotoxicologie des néonicotinoïdes étudiés dans le cadre de la thèse.....	108
Tableau 18 : Propriétés physico-chimiques, réactivité et écotoxicologie des métabolites néonicotinoïdes étudiés dans le cadre de la thèse .....	111
Tableau 19 : Marque et fournisseur des différents réactifs et solvants utilisés.....	120
Tableau 20 : Pureté et fournisseur des standards analytiques .....	121
Tableau 21 : Caractéristiques des deux protocoles (25 et 10 µL) de préparation du plasma. ....	124
Tableau 22 : Références des appareils spécifiques au protocole préparation des plumes ....	124
Tableau 23 : Références des appareils spécifiques au protocole d'extraction assistée par micro-ondes des plumes .....	125

Tableau 24 : Références des appareils et consommables spécifiques au protocole d'extraction ASE des mousses PUF .....	127
Tableau 25 : Paramètres des transitions MRM pour les molécules des différentes méthodes d'acquisition .....	132
Tableau 26 : Etalon interne associé à chaque molécule analysée et valeurs des coefficients de réponse Ki .....	134
Tableau 27 : Valeurs des rapports (Aire TC/TQ x100) pour les transitions de quantification et confirmation sélectionnées .....	137
Tableau 28 : Sensibilité et linéarité instrumentales en injection directe et en SPE en ligne pour les trois méthodes analytiques .....	138
Tableau 29 : Sensibilité et linéarité en matrice plasma pour les trois méthodes distinctes SPE en ligne .....	141
Tableau 30 : Justesse et sensibilité du protocole d'extraction plasma pour les trois méthodes distinctes en SPE en ligne avec 25 µL de prise d'essai.....	142
Tableau 31 : Justesse et sensibilité du protocole d'extraction/quantification plasma pour les azoles et néonicotinoïdes en SPE en ligne avec 10 µL de prise d'essai.....	143
Tableau 32 : Sensibilité et gamme de linéarité par étalonnage interne validées en matrice plume .....	145
Tableau 33 : Justesse d'extraction/quantification et sensibilité du protocole d'extraction des plumes .....	146
Tableau 34 : Sensibilité validée et justesse d'extraction/quantification du protocole d'extraction des mousses PUF pour la méthode P2 en injection directe.....	147
Tableau 35 : Bilan des échantillons de plasma accompagnés par la méthode de préparation et d'analyse en SPE en ligne .....	148
Tableau 37 : Bilan des échantillons de plumes accompagnés par la méthode de préparation ainsi que d'analyse en injection directe.....	150
Tableau 37 : Bilan des données mentionnées dans les chapitre du manuscrit et des publications insérées .....	152
Tableau 38 : Quantités de substances actives des azoles étudiés vendues dans les deux départements Charente et Charente-Maritime en 2017 par types de culture extrait du Tableau 13.....	158
Tableau 39 : Concentrations estimées en ng/m <sup>3</sup> en azoles accompagnées des LQ estimées pour les mousses PUF appliquées sur les sites n°4 forestier, n°6 viticole et n°7 viticole .....	160
Tableau 40 : Constante de Henry et temps de demi-vie atmosphérique en heures pour les azoles analysés d'après le Tableau 14 du chapitre 2 .....	165
Tableau 41 : Quantités de substances actives des néonicotinoïdes étudiés vendues dans les deux départements Charente et Charente-Maritime en 2017 par types de culture issues du Tableau 16 .....	171
Tableau 42 : Concentrations estimées en néonicotinoïdes accompagnées des LQ estimées pour les mousses PUF appliquées sur les sites n°4 forestier, n°6 viticole et n°7 viticole .....	173
Tableau 43 : Constante de Henry et temps de demi-vie atmosphérique pour les néonicotinoïdes analysés d'après le Tableau 17 du chapitre 2.....	176
Tableau 45 : Bilan de la coïncidence entre vente des azoles et néonicotinoïdes avec présence dans le compartiment atmosphérique .....	177
Tableau 45 : Paramètres de sources pour la méthode optimisé des néonicotinoïdes et des azoles.....	186

Tableau 46 : Comparaison des sensibilités en pg injectés en ID pour les métabolites néonicotinoïdes entre ESI+ et ESI- .....	187
Tableau 47 : Comparaisons de deux cartouches SPE en ligne pour deux temps de chargement pour 1 néonicotinoïde et 3 métabolites .....	189
Tableau 48 : Comparaison des LQ en pg injectés en eau de rivière .....	190
Tableau 49 : Comparaison des LQ obtenues en matrice plasma pour les néonicotinoïdes avec la littérature .....	194
Tableau 50 : Conditions analytiques des publications analysant les néonicotinoïdes en matrice plasma issues du Tableau 11 .....	195
Tableau 51 : Fréquences de quantification, moyenne et écart-type pour les concentrations en azoles supérieures à la LQ dans le plasma de merles noirs et de mésanges charbonnières capturés en juin et juillet 2019 sur les sites forestier et viticole.....	199
Tableau 52 : Fréquences de détection et de quantification, moyenne et écart-type pour les concentrations en azoles supérieures à la LQ dans le plasma de cigognes blanches .....	202
Tableau 53 : Aires normalisées par la masse et LQ comparées par rapport aux valeurs du coefficient de réponse « Ki » afin de déterminer l'effet matrice plume (n = 3 à deux concentrations) .....	315
Tableau 54 : Impact de la dilution des extraits plumes par deux et par quatre sur les LQ ....	318
Tableau 55 : Fréquence de quantification et moyenne des concentrations pour les azoles quantifiés dans les plumes de merles noirs 2016, 2017 et 2019 .....	324
Tableau 56 : Fréquence de quantification et moyenne des concentrations pour les azoles quantifiés dans les plumes de cigognes blanches 2019 .....	330
Tableau 57 : Fréquence de quantification et moyenne des concentrations pour les azoles quantifiés dans les plumes de goélands bruns et argentés.....	332
Tableau 58 : Fréquences de quantification et moyennes des concentrations pour les néonicotinoïdes et leurs métabolites quantifiés dans les plumes de merles noirs 2016, 2017 et 2019.....	338
Tableau 59 : Fréquence de quantification et moyenne des concentrations pour les néonicotinoïdes et leurs métabolites quantifiés dans les plumes de cigognes blanches 2019	341
Tableau 60 : Fréquence de quantification et moyenne des concentrations pour les néonicotinoïdes et leurs métabolites quantifiés dans les plumes de goélands bruns et argentés .....	342
Tableau 61 : Quantités vendues, concentrations maximales en matrices plasma et plume, propriétés physico-chimiques et réactivité des azoles et néonicotinoïdes d'après le Tableau 14 pour les azoles et Tableau 17 néonicotinoïdes issus du chapitre 2 .....	354

## Liste des équations

Équation 1 : Calcul du coefficient de réponse $K_i$ par étalonnage interne .....	133
Équation 2 : Calcul pour obtenir la masse de molécule par étalonnage interne.....	133

## Liste des annexes

Annexe 1 : Légende des tableaux de propriétés physico-chimiques des molécules .....	368
Annexe 2 : Carte de contrôle LQ injection directe machine, LQ extrapolée en pg injectés suite à l'injection 2xLQ pour les azoles (a), les néonicotinoïdes (b) et les métabolites des néonicotinoïdes (c) .....	369
Annexe 3 : Carte de contrôle $K_i$ et rendement $C_i$ (%) en injection directe suite à l'injection 2xLQ.....	372
Annexe 4 : Données brutes des concentrations pour les trois sites où les mousses PUF ont été appliquées : (a) pour le site n°4 forestier, (b) pour le site n°6 viticole puis (c) pour le site n°7 viticole en azoles (i), néonicotinoïdes (ii) .....	373
Annexe 5 : Données brutes des concentrations dans le plasma de merles noirs en 2016 (a) et 2019 (b) pour les azoles (i), néonicotinoïdes et leurs métabolites (ii) .....	379
Annexe 6 : Données brutes des concentrations dans le plasma de mésanges charbonnières en azoles de l'année 2019 .....	384
Annexe 7 : Données brutes des concentrations dans le plasma de cigognes blanches en azoles (i), néonicotinoïdes et leurs métabolites (ii) de l'année 2019 .....	385
Annexe 8 : Données brutes des concentrations dans le plasma de goélands (argentés, bruns et marins) en azoles (i), néonicotinoïdes et leurs métabolites (ii) des années 2016 à 2020.....	387
Annexe 9 : Données brutes des concentrations dans le plasma de crapauds épineux en azoles (i), néonicotinoïdes (ii) des années 2018 et 2019 .....	391
Annexe 10 : Données brutes des concentrations dans les plumes de merles noirs pour les années 2016 (a), 2017 (b) et 2019 (c) en azoles (i), néonicotinoïdes et leurs métabolites (ii).....	393
Annexe 11 : Données brutes des concentrations dans les plumes en azoles (i), néonicotinoïdes et leurs métabolites (ii) chez les cigognes blanches 2019 .....	399
Annexe 12 : Données brutes des concentrations dans les plumes en azoles (i), néonicotinoïdes et leurs métabolites (ii) chez les goélands .....	401
Annexe 13 : Valeurs des p-value pour les tests statistiques sur les plumes de merles noirs en azoles avec (a) la comparaison entre les habitats, (b) la comparaison entre les années.....	403
Annexe 14 : Valeurs des p-value pour les corrélations entre concentrations dans les plumes de goélands et les valeurs isotopiques pour les azoles (a) et les néonicotinoïdes (b) .....	406
Annexe 15 : Valeurs des p-value pour les tests statistiques sur les plumes de merles noirs en néonicotinoïdes avec (a) la comparaison entre les habitats pour l'année 2016 et (b) la comparaison entre les années .....	407





## Introduction générale

Au cours du dernier siècle, la consommation de produits phytosanitaires a augmenté de façon à contrôler la propagation des bio-agresseurs. Les rendements et la production alimentaire ont été intensifiés afin de nourrir la population mondiale qui ne cesse de croître (Lanz et al., 2018; Tilman et al., 2002). L'agriculture mondiale représente aujourd'hui 90 % de l'utilisation totale des produits phytosanitaires (DRAAF Nouvelle Aquitaine, 2016) également appelés pesticides par généralisation. Cependant leurs potentiels impacts sur l'environnement, toxicités sur l'Homme et les espèces sauvages ont généré une prise de conscience sociétale. De nombreux plans politiques visent désormais à réduire les usages de ces pesticides ainsi que les risques associés.

La France se place en 6<sup>ème</sup> position mondiale en quantité de pesticides employés pour un usage agricole et est le premier consommateur à l'échelle européenne en 2018 ([www.fao.org/faostat/](http://www.fao.org/faostat/)). Selon les régions et départements français, cette utilisation n'est pas homogène ("Agriculture Française, chiffres clé," 2015). En région Nouvelle-Aquitaine, région concernée par le projet MULTISTRESS à la base de ces travaux, les paysages sont fortement contrastés. En effet, des zones urbaines, des forêts, des zones viticoles, des plaines céréalières ainsi que des zones littorales ou humides sont présentes dans cette région. Ce sont les vignes qui représentent le premier secteur de production agricole suivies des grandes cultures (DRAAF Nouvelle Aquitaine, 2016). La Gironde, Charente et Charente-Maritime sont trois départements à prédominance viticole qui consomment le plus de substances actives dans cette région (Chevrier, 2018). De par ces activités agricoles, cette région et ses départements sont particulièrement concernés par la problématique de l'usage des pesticides.

Parmi ces pesticides, trois classes majeures selon leurs usages sont référencées : les insecticides, les fongicides et les herbicides. Cette dernière classe ne sera pas étudiée dans le cadre de ces travaux de thèse étant les traitements les moins appliqués en zone viticole de la région Nouvelle-Aquitaine (Agreste Nouvelle-Aquitaine, 2019).

Pour les fongicides, la famille chimique des azoles est concernée par ces travaux de thèse puisque certaines de ces molécules ont vu leur utilisation augmenter au fil des années et sont majoritairement appliquées (Toda et al., 2021). Certains azoles peuvent être considérés comme des perturbateurs endocriniens (Goetz et al., 2007) (Roelofs et al., 2014).

La famille des néonicotinoïdes sera également étudiée, parmi la classe des insecticides, notamment au vu de l'actualité houleuse associée. En effet, leur mode d'action envers les insectes engendre des impacts sur les espèces non-cibles les abeilles (Whitehorn et al., 2012) (Wood et al., 2018). De plus, bien que la sélectivité de ces molécules envers les insectes est supérieure à celles des vertébrés (Tomizawa et Casida, 2005), leur toxicité envers ces derniers n'est pas inexistante (Gibbons et al., 2015). Connaissant ces problématiques en tant que perturbateurs endocriniens et depuis le 1<sup>er</sup> septembre 2018, les Etats membres de l'Union Européenne ont décidé d'interdire l'utilisation, sauf dérogations, de cinq néonicotinoïdes.

Les azoles et néonicotinoïdes peuvent se retrouver dans les différents compartiments de l'environnement tels que l'air (Coscollà et al., 2010; Raheison et al., 2019), l'eau (Cancapa et al., 2016) (Bonmatin et al., 2021) ou le sol (Pelosi et al., 2021). Leur présence dans certaines matrices alimentaires a également été relevée comme dans le miel (Codling et al., 2016) ou le vin (Berset et al., 2017). Les espèces non cibles peuvent alors être en contact avec ces molécules

sachant que le transfert au sein de leur organisme (Gross et al., 2020) (Kapoor et al., 2014) a été démontré selon différentes voies de contamination directes (Klaassen et al., 2013).

Les travaux de thèse se focaliseront sur les vertébrés pour plusieurs raisons. Tout d'abord, étant par définition espèces non-cibles des fongicides et des insecticides, il est très important d'étendre les études à une large gamme d'espèces, incluant le plus possible de variations dans les traits d'histoire de vie et l'écologie. Ces travaux sont indispensables, notamment au regard du déclin généralisé de la biodiversité dans les milieux agricoles en particulier. En effet, plusieurs espèces d'oiseaux sont en fort déclin (Ceballos et al., 2015) et les pesticides sont souvent avancés comme étant une cause potentielle (Reif et Hanzelka, 2020) (Van Lexmond et al., 2015) (Millot et al., 2017) (Mineau et Whiteside, 2013). L'état des lieux de la contamination des azoles n'a pas été encore étudié pour ces espèces et est peu fourni pour les néonicotinoïdes d'où leur intérêt pour ces travaux de thèse.

Les travaux de cette thèse portent sur la caractérisation de la contamination en pesticides azoles et néonicotinoïdes chez des vertébrés de la région Nouvelle-Aquitaine dans le cadre du projet MULTISTRESS, soutenus par la région Nouvelle-Aquitaine.

Le projet fédérateur MULTISTRESS réunit les expertises de trois unités de recherche régionales (CEBC-UMR 7372, CNRS-La Rochelle Université ; EPOC-UMR 5805, CNRS-Université Bordeaux ; LIENSs-UMR 7266, CNRS-La Rochelle Université). L'objectif de ce projet est de mesurer les effets combinés des contaminants environnementaux et de l'état des habitats sur la biodiversité de la région. Il s'agit pour les milieux visés (vignoble, plaine céréalière, bocage, zones humides, rivières, zones urbaines et littorales : 1) d'établir l'état des lieux sur les contaminants (métaux, pesticides, composés fluorés, halogénés et leurs métabolites) présents dans les réseaux trophiques (amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères) ; 2) d'interpréter les niveaux observés via la qualité des habitats et l'écologie trophique (télémétrie, isotopes stables) et 3) d'estimer les effets de ces perturbations sur la physiologie (perturbation endocrine, vieillissement), le comportement et la démographie des espèces, ainsi que sur l'activité économique liée aux pratiques agricoles (agriculture, rendements). Ce projet innovant permettra ainsi le lancement d'un réseau de « bio-surveillance » des contaminants environnementaux en région Nouvelle-Aquitaine.

Dans ce cadre, les espèces étudiées (principalement vertébrées : le merle noir, la mésange charbonnière, la cigogne blanche et trois espèces de goélands, et un amphibien : le crapaud épineux) couvrent une large gamme d'habitats (urbain, agricoles, forestiers, zones humides, littoral) et d'écologie trophiques (insectivores, piscivores, omnivores).

Pour des raisons éthiques, l'utilisation de matrices biologiques non destructives pour les espèces étudiées prend de l'ampleur dans les recherches (Espín et al., 2016) (Fair et al., 2010). Les analyses de deux matrices seront développées dans le cadre de ces travaux de thèse à savoir le plasma et les phanères (plumes pour les oiseaux). Le plasma est un fluide biologique dans lequel les azoles peuvent circuler et être analysés (Gross et al., 2020; Li et al., 2017) ainsi que les néonicotinoïdes (Hao et al., 2018, 2016; Humann-Guilleminot et al., 2021; Taliansky-Chamudis et al., 2017). Les néonicotinoïdes ont pu être analysés dans les plumes (Graves et al., 2019; Humann-Guilleminot et al., 2021, 2019) alors qu'aucune publication à ce jour ne recense l'analyse des azoles dans cette matrice. Cette dernière famille de molécules se transfère dans des matrices équivalentes en termes de structure telles que les cheveux (Peng et al., 2020; Polledri et al., 2020; Schummer et al., 2012) ou les poils (Polledri et al., 2018). En revanche la plupart des publications analysant les azoles sont des études de laboratoire avec applications à de fortes concentrations. Les données pour évaluer la contamination environnementale des vertébrés sauvages au travers de différents types d'habitats manquent dans la littérature.

Le défi méthodologique des travaux de thèse a été d'abaisser la prise d'essai (afin d'échantillonner des espèces de petites tailles et/ou des juvéniles) tout en ayant des limites de quantifications les plus basses possible. Pour l'analyse du plasma, une méthode automatisée a été mise au point en couplant une extraction sur phase solide en ligne (SPE on-line) avec une chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS). La méthode analytique a été adaptée de celle employée avec cette même technique pour l'analyse des perfluorés (PFAS) en matrice plasma (Munoz et al., 2017). En ce qui concerne les plumes, un développement analytique a été réalisé portant sur la préparation des échantillons. Les échantillons ont ensuite été extraits par énergie micro-ondes suivi d'une analyse par LC-MS/MS.

S'agissant de matrices biologiques, les pesticides étudiés peuvent soit se stocker soit se dégrader au sein de l'organisme. Il est alors important d'analyser non seulement les molécules parents mais également les métabolites. C'est pourquoi certains métabolites des néonicotinoïdes (Ford et Casida, 2006; Nomura et al., 2013; Van Lexmond et al., 2015) ont été ajoutés.

Le but général des travaux de thèse, une fois les méthodes analytiques développées, est d'établir l'état des lieux des contaminants azolés et néonicotinoïdes présents dans les vertébrés en région Nouvelle-Aquitaine. Les niveaux observés sont ensuite interprétés selon la qualité des habitats, les espèces et les années de capture. Les effets sur la physiologie des espèces sont ensuite estimés lorsque les données le permettent.

Ainsi, le manuscrit est organisé en cinq parties, débutant par un **chapitre 1** de synthèse bibliographique. Les différentes classifications des pesticides, les usages et toxicités des deux familles étudiées, leur occurrence dans les matrices biologiques ainsi que les méthodes analytiques employées sont développés dans ce premier chapitre.

Le **chapitre 2** présente le matériel et méthodes avec dans un premier temps les critères de sélection des molécules au sein des deux familles azoles et néonicotinoïdes. Le matériel utilisé, les méthodes analytiques employées et leurs contrôles qualités respectifs, les échantillons analysés selon la méthode analytique sont ensuite décrits.

Le **chapitre 3** concerne l'utilisation d'échantillonneurs passifs atmosphériques. Les concentrations retrouvées dans le compartiment aérien sont comparées avec celles mentionnées dans la littérature ainsi qu'avec les usages des molécules selon leur saisonnalité d'application. Ce chapitre permet de renseigner, dans les chapitres suivants, une partie de l'ambiance chimique comme une variable d'explication de la contamination des oiseaux.

La quatrième partie, **chapitre 4**, se focalise sur la matrice plasma avec dans un premier temps le développement analytique mené. Les données de concentrations obtenues chez les différentes espèces capturées sont discutées pour les azoles puis pour les néonicotinoïdes. La méthode est ensuite appliquée à des échantillons plasmas provenant de manipulations d'exposition en laboratoire qui permettent d'estimer les doses ingérées par les espèces sauvages. Cette partie a donné lieu à trois publications qui sont insérées à la fin de celle-ci.

Enfin, le **chapitre 5** porte sur la matrice plume. Le développement analytique entrepris est tout d'abord décrit pour ensuite appliquer le protocole retenu à des échantillons plumes provenant d'une expérience d'exposition en laboratoire. Les résultats obtenus pour les plumes à provenance environnementale sont ensuite développés pour les azoles puis pour les néonicotinoïdes. Une comparaison entre les matrices plasma et plume en fonction des propriétés physico-chimiques des molécules est ajoutée à ce chapitre.



## Chapitre 1 : Bibliographie

1. Les pesticides : classifications, utilisations .....	32
a. Généralités.....	32
i. Classification selon usage.....	33
ii. Classification selon la nature chimique.....	33
iii. Classification selon le mode d'action.....	34
b. Utilisation des pesticides .....	35
i. Dans le Monde et en France .....	35
ii. Dans la région Nouvelle-Aquitaine .....	36
2. Les pesticides étudiés dans le cadre de la thèse .....	37
a. Critères de sélection des familles de pesticides .....	37
b. Azoles, fongicides .....	38
i. Structure chimique .....	38
ii. Usages et autorisations .....	38
iii. Toxicité.....	41
c. Néonicotinoïdes, insecticides .....	43
i. Structure chimique .....	43
ii. Usages et autorisations .....	44
iii. Toxicité.....	47
3. Les pesticides : transferts et occurrence dans l'environnement .....	49
a. Mécanismes de transfert dans l'environnement .....	49
b. Paramètres physico-chimiques des molécules .....	50
c. Occurrence des pesticides étudiés dans les différents milieux.....	51
4. Les pesticides : transferts et occurrence dans les organismes vivants .....	54
a. Mécanismes de transfert vers les organismes.....	54
b. Métabolisation.....	55
i. Notions de la métabolisation .....	55
ii. Métabolites des pesticides étudiés.....	57
c. Informations sur les matrices biologiques.....	59
d. Dynamique et comparaison des matrices biologiques expérimentales .....	61
e. Occurrence des pesticides étudiés dans les matrices biologiques à provenance environnementale .....	64
f. Espèces vertébrées bio indicatrices présentes en région Nouvelle-Aquitaine .....	69
5. Echantillonnage jusqu'à l'analyse des pesticides.....	74

a.	Techniques d'échantillonnage.....	74
i.	Présentation des méthodes.....	74
ii.	Prélèvement du compartiment air.....	75
b.	Technique d'extraction et de purification des matrices solides et liquides.....	76
i.	Des matrices solides .....	76
ii.	Des matrices liquides.....	78
c.	Techniques d'analyse .....	79
6.	Protocoles d'extraction pour les molécules étudiées dans les matrices biologiques et conditions analytiques .....	82
a.	Bibliographie des azoles dans les matrices biologiques liquides (plasma).....	82
b.	Bibliographie des néonicotinoïdes dans les matrices biologiques liquides (plasma)	85
c.	Bibliographie des azoles et néonicotinoïdes dans les matrices biologiques solides (plumes) .....	89
7.	Objectifs des travaux de thèse et programmes de recherche associés.....	93





## 1. Les pesticides : classifications, utilisations

### a. Généralités

Les pesticides sont des substances actives ou des préparations de produits chimiques destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs des organismes cibles considérés comme nuisibles pour d'autres. La substance active peut être d'origine naturelle ou synthétique, minérale ou encore organique. Dans le langage courant, le terme pesticide est généralement associé à l'usage agricole. Néanmoins, ce terme générique réunit deux catégories comme introduit dans la Directive européenne 2009/128/CE.

Tout d'abord les biocides (Directive 98/8/CE) qui 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 ». L'annexe V de cette directive les classe en quatre groupes dont les produits : désinfectants et biocides destinés à l'usage humain ou vétérinaire, de protection (des matériaux par exemple), antiparasitaires et les autres produits biocides.

Puis, les produits phytopharmaceutiques ou produits phytosanitaires (Règlement CE n°1101/2009) visent à protéger les végétaux pour éviter leur anéantissement face aux maladies, ravageurs ou autres organismes nuisibles au développement de la plante.

Ces derniers ont été introduits dans le secteur agricole pour augmenter les rendements de production et ainsi subvenir aux besoins de la population humaine qui a connu une croissance sans précédent au cours du 20<sup>ème</sup> siècle (Tilman et al., 2002). En France, une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) doit être délivrée pour chaque produit phytosanitaire, sauf exception, afin de pouvoir être vendu ou même appliqué. Celle-ci repose sur deux évaluations réalisées par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) et la deuxième par l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail (ANSES) toutes deux s'appuyant sur des études environnementales, biologiques, toxicologiques et écologiques. Les substances actives autorisées pour une culture et un usage (cible, dose) associé sont répertoriées dans la base E-Phy gérée par le Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la forêt (<https://ephy.anses.fr/>). Ces autorisations et interdictions sont dynamiques et peuvent s'alterner au fur et à mesure de l'avancement des connaissances sur les substances.

Au total, plus de 1540 pesticides ont été recensés en 2020 dans le Monde d'après la base de données « Pesticides Properties DataBase » (PPDB). Ils peuvent être regroupés selon plusieurs classifications. La première qui va être décrite sera la classification selon le rôle fonctionnel puis la suivante selon la nature chimique du pesticide.

*i. Classification selon usage*

La répartition selon le rôle fonctionnel des pesticides repose sur la nature de la cible à contrôler. Il en existe trois principales à savoir les fongicides (contre les champignons), les herbicides (contre les végétaux) et les insecticides (contre les insectes) qui seront décrites en suivant. D'autres catégories ne seront pas développées par la suite telles que les acaricides (contre les acariens), les rodenticides (contre les rongeurs), les avicides (contre les oiseaux ravageurs), les molluscicides (contre les mollusques). Au sein d'une même famille, les molécules peuvent être variables tant par leur structure chimique, leur propriété physico-chimique que leur efficacité envers la cible. Différents mécanismes d'action pour lutter contre l'espèce nuisible sont donc également mis en jeu de par ces variabilités internes. Les pesticides peuvent soit être de contact en ne pénétrant uniquement l'enveloppe externe de la plante soit systémiques en se répandant par la sève.

Les fongicides :

Les fongicides permettent de repousser voire tuer les champignons qui peuvent se développer sur la plante. Parmi ces maladies, on peut notamment citer le mildiou pouvant prendre des proportions épidémiques sur les vignes tout comme l'oïdium (Simonovici, 2016), la septoriose du blé, le botrytis ou encore la rouille, ...

Les herbicides :

Les herbicides ont pour objectif de détruire les végétaux. Ils peuvent être spécifiques en visant certains adventices cibles tout en préservant la culture voire être totaux en détruisant toutes les espèces présentes. La croissance de la culture peut être ralentie puisque ces adventices peuvent entrer en concurrence nécessitant les mêmes ressources en eau et nutriments que la culture elle-même.

Les insecticides :

Comme son nom l'indique, les insecticides ont pour propriété de réguler les populations d'insectes qui peuvent être des ravageurs pour la plante à protéger. Ces insectes peuvent être responsables de pertes de rendement comme le doryphore ou la cicadelle pour les pommes de terre (Sanford et Webb, 1977). Sur la vigne, la tordeuse de la grappe est un de ses principaux ravageurs ou encore la cicadelle qui peut agir indirectement en étant le vecteur de la flavescence dorée (Alma et al., 2001). Les insecticides peuvent agir en repoussant voire en tuant les insectes (adultes, sous forme de larves ou d'œufs).

*ii. Classification selon la nature chimique*

Une autre possibilité est de classer les pesticides selon leurs similitudes structurales chimiques. Les premiers pesticides étaient principalement minéraux tels que le soufre, l'arsenic employés comme insecticides. Puis, avec l'arrivée de l'industrie chimique après la seconde guerre mondiale, les pesticides organiques de synthèse apparaissent. Ces évolutions successives donnent lieu à des pesticides avec des impacts de plus en plus ciblés.

Parmi les classes chimiques organiques, on peut citer de façon non exhaustive :

- les organochlorés comportant au moins un atome de chlore (par exemple le dichlorodiphényltrichloroéthane appelé DDT, HCB pour l'hexachlorobenzène, diéldrine, lindane, ...),
- les organophosphorés composés au minimum d'un atome de phosphore (dichlorvos, chlorpyrifos, ...),
- les triazines constituées d'un cycle aromatique avec trois carbones et trois azotes (atrazine, simazine, terbuthylazine, ...),
- les azoles ayant un cycle de cinq atomes incluant des atomes d'azote,
- et les néonicotinoïdes dérivés de la nicotine.

Les deux dernières classes chimiques seront plus amplement développées par la suite.

Il est important de noter que l'action de certaines classes de molécules ne se limite pas à un usage unique. C'est par exemple le cas de la famille des carbamates appelés également uréthanes et qui sont caractérisés par une fonction  $R-NH-(C=O)-O-R'$ . Certains carbamates sont en effet appliqués comme fongicides (iodocarb, prothiocarb, propamocarb), tandis que d'autres sont utilisés comme herbicides (barban, carbetamide, chlorpropham) ou encore comme insecticides (bendiocarb, carbosulfan, methiocarb, ...).

### *iii. Classification selon le mode d'action*

En recoupant les deux classifications précédentes, une troisième peut émerger selon le mode d'action généralement lié à la structure chimique.

Pour les fongicides, l'organisme FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) distingue, en 2020, 14 catégories de modes d'action. Parmi les principaux sites d'action des fongicides : la respiration, la signalisation ou division cellulaire, la biosynthèse des parois ou des acides nucléiques. Par exemple la catégorie G, selon la classification, réunit les molécules qui empêchent la biosynthèse des stérols (SBI) telles que l'ergostérol qui est un constituant essentiel de la membrane des cellules fongiques (Stromstedt et al., 1996). Lors de sa synthèse, une succession de transformations ont lieu sous l'influence d'enzymes. A chacune de ces étapes, l'activité d'une enzyme peut être inhibée ce qui induit une production moindre d'ergostérol ainsi qu'une accumulation des précurseurs en amont de l'inhibition. Ces deux effets conduisent à l'altération de la membrane. Les fongicides DMI (DeMethylation Inhibitors) de classes chimiques azolés tels que les imidazoles, triazoles, triazolinthiones inhibent l'enzyme  $14\alpha$ -déméthylase utile à la transformation du lanostérol en  $14$ -déméthyl lanostérol (Debeljak et al., 2000) (Vanden Bossche et al., 1987).

Pour les herbicides, l'HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) les classe, en 2020, en 25 modes d'action. Ils peuvent modifier soit la production des espèces réactives de l'oxygène activée par la lumière, soit le métabolisme cellulaire, soit la division cellulaire et son développement. Les carbamates en tant qu'herbicides interviennent dans cette dernière grande famille en inhibant l'organisation des micro-tubules qui sont des fibres constitutives du cytosquelette de la plante.

Pour les insecticides, l'IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) réalise une classification constituée de 37 catégories également en 2020. Certains attaquent le système nerveux ou les muscles, le développement, la respiration ou encore au système digestif en inhibant la faim des insectes (Sparks et Nauen, 2015). Parmi ceux qui déstabilisent le système nerveux, certaines familles de molécules ont pour cible le neurotransmetteur excitateur : acétylcholine (ACh) (Bodereau, 2011). Présent au sein du système nerveux central des insectes, il joue un rôle primordial dans la transmission synaptique neuronale. Il existe trois types de récepteurs : les muscariniques (mAChRs), les nicotiques (nAChRs) et les mixtes incluant les deux précédents. Les insecticides néonicotinoïdes sont des modulateurs compétitifs se liant au site acétylcholine sur les nAChRs. Les carbamates et les organophosphates, en tant qu'insecticides, agissent comme des inhibiteurs de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) sachant que cette dernière permet l'hydrolyse rapide de ACh en choline et acétate.

## b. Utilisation des pesticides

### i. Dans le Monde et en France

L'agriculture représente le plus gros consommateur de pesticides avec une part de 90 % de l'utilisation totale (Expertise scientifique collective, 2011). La France avec 85000 tonnes de pesticides employées pour une utilisation agricole se place en 6<sup>ème</sup> position en 2018 derrière la Chine, les Etats-Unis, le Brésil, l'Argentine puis le Canada et se place donc en première position parmi les pays européens d'après la FAO qui signifie Food and Agriculture Organization of the United Nations ([www.fao.org/faostat/](http://www.fao.org/faostat/)). Cet indicateur doit être nuancé par les hectares cultivés pour être plus exact, la France se situe finalement en dessous des autres pays européens soit en 9<sup>ème</sup> position (Baschet et Pingault, 2009). En effet, la France est dotée d'une superficie cultivable importante. Différents plans d'action se succèdent tels que le plan Ecophyto qui, depuis 2008, vise à réduire l'utilisation des produits phytopharmaceutiques.

Selon les régions et départements français, la production agricole diffère (Figure 1) ce qui engendre une utilisation des produits phytosanitaires non homogène. La région Bretagne, le Massif central et l'est de la France sont plutôt orientés vers l'élevage tandis que le centre de la France, une partie du sud-ouest produisent plus des grandes cultures. Les régions du sud ainsi que la région Bordelaise sont focalisées vers des cultures permanentes telles que la viticulture ("Agriculture Française, chiffres clé," 2015).

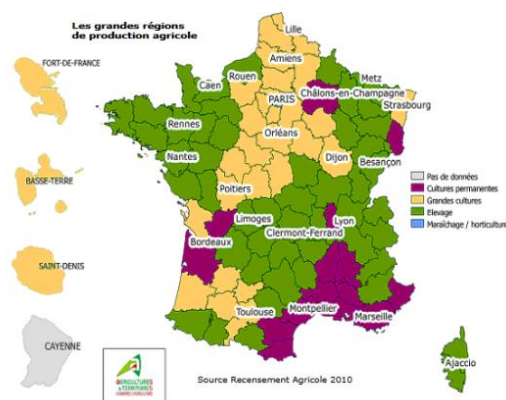


Figure 1 : Les grandes régions de production agricole, source recensement agricole 2010

*ii. Dans la région Nouvelle-Aquitaine*

C'est au sein de cette région bordelaise et plus largement la région Nouvelle-Aquitaine que la thèse se focalise. Dans cette zone, les paysages sont fortement contrastés (Figure 2). Les viticultures et grandes cultures dominent en nombre bien que 34 % du territoire soit occupé par la forêt (notamment avec le département des Landes).

Ce sont les vignes qui représentent le premier secteur avec 30 % de production essentiellement située en Gironde, Charente et Charente-Maritime (DRAAF Nouvelle Aquitaine, 2016). Le deuxième secteur concerne les céréales, oléagineux et protéagineux qui pèsent aussi significativement avec 21 % de production régionale mais avec une répartition plus homogène dans les départements.

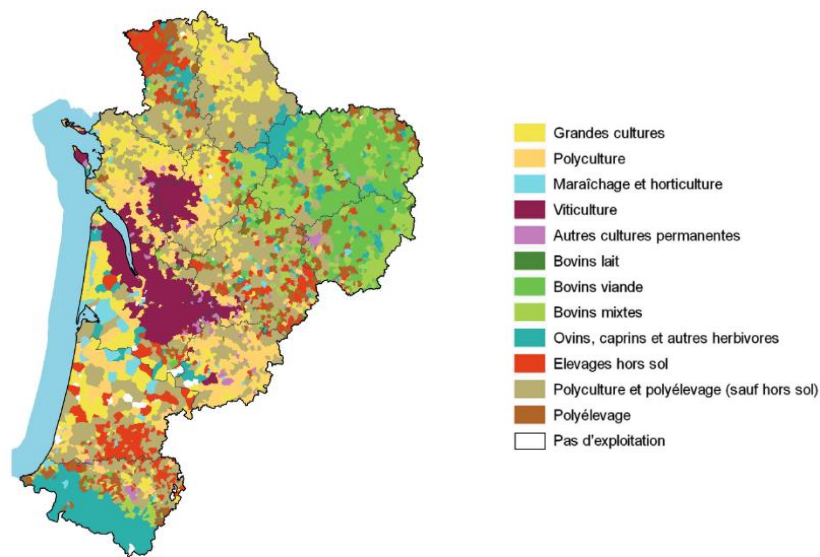


Figure 2 : Activités agricoles en région Nouvelle-Aquitaine / IGN GEOFLA et BdCarthage ; Source : Agreste - recensement agricole 2010

De par ces activités agricoles, cette région est particulièrement concernée par la problématique de l'usage des pesticides. On retrouve en tête des départements consommant le plus de substances actives, les trois mêmes départements à prédominance viticole (Figure 3).

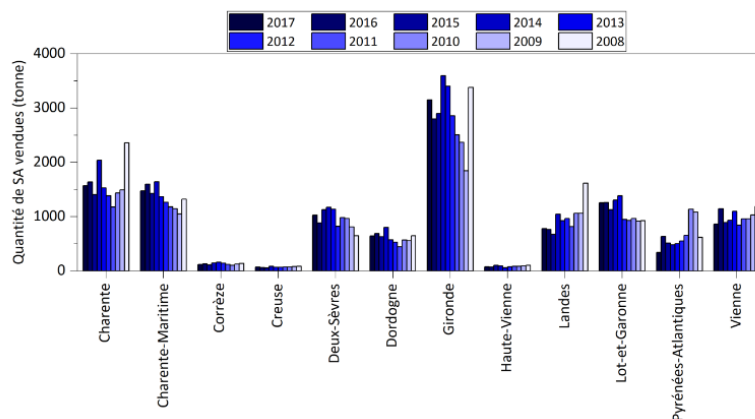


Figure 3 : Ventes de substances actives depuis 2008 en région Nouvelle-Aquitaine (Source des données : BNVd) (Source du graphique : Chevrier (2018))

Sur le bassin viticole en région Nouvelle-Aquitaine, et également sur l'ensemble des vignobles français, les traitements fongicides sont ceux les plus appliqués avec un Indicateur de Fréquence de Traitements phytosanitaires (IFT) supérieur à 12 (Figure 4) s'ensuit les insecticides puis les herbicides étant les moins appliqués. L'IFT comptabilise le nombre de doses de produits phytosanitaires utilisées par hectare au cours d'une campagne culturale.

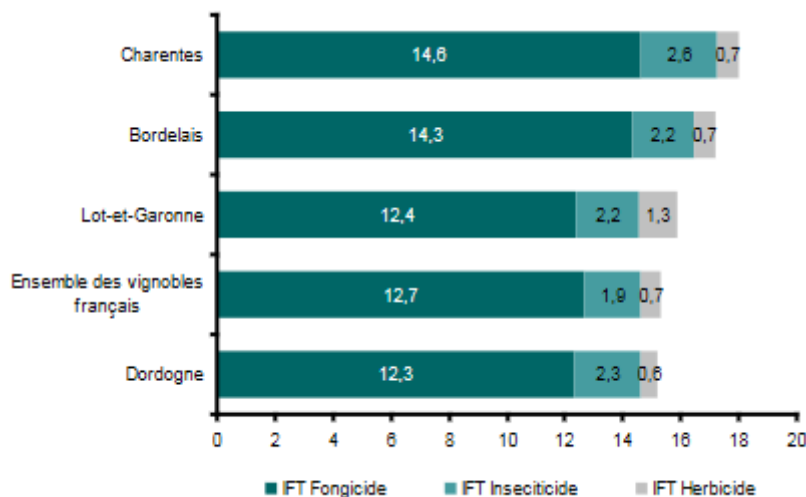


Figure 4 : IFT moyen par bassin viticole en région Nouvelle-Aquitaine en 2016 (Agreste Nouvelle-Aquitaine, 2019)

Sur les grandes cultures, en revanche, ce sont les herbicides qui sont les produits phytosanitaires les plus utilisés. Les fongicides se situent en deuxième place pour finir avec les insecticides qui sont les moins appliqués (Direction Régionale de l'Agriculture et de la Forêt Nouvelle-Aquitaine, 2017). La pratique de semence traitée est également commune. Celle-ci est traitée dans 90 % des cas par un traitement antifongique et/ou contre les insectes.

## 2. Les pesticides étudiés dans le cadre de la thèse

### a. Critères de sélection des familles de pesticides

Comme dit précédemment, la région Nouvelle-Aquitaine présente des territoires variés incluant des zones viticoles ainsi que des régions céréalières. Ces deux types de cultures utilisent des herbicides, insecticides et fongicides entre autres.

Les travaux de cette thèse vont se focaliser essentiellement sur une famille de molécule des fongicides ainsi que sur une autre de la famille des insecticides tous deux employés dans la région. Les herbicides étant les traitements les moins appliqués en zone viticole et également par manque de temps ne seront pas étudiés dans le cadre de cette thèse. Pour les fongicides, les azoles seront concernés. Certaines de ces molécules ont vu leur utilisation augmenter au fil des années et sont donc majoritairement appliquées (Toda et al., 2021). Et parmi les insecticides, la famille des néonicotinoïdes sera examinée. Cette classe de molécule a été sélectionnée de par son actualité houleuse étant au cœur des débats.

Ces deux familles ont été choisies au vu leurs toxicités. La dose létale 50 (DL50) est le principal indicateur. Elle mesure la dose de substance par rapport à son poids corporel (p.c.) causant la mort de 50 % d'une population animale donnée pendant un maximum de 14 jours. Plus la valeur de cette dose est faible plus la molécule sera donc qualifiée de toxique. A plus

faibles doses, ces familles ont prouvé avoir des effets sublétaux qui diminuent la capacité d'une population à se maintenir à l'équilibre. Ils peuvent affecter la reproduction ou le développement des vertébrés en tant que perturbateurs endocriniens. Ces conséquences, développées en plus de détails par la suite, peuvent être observées au travers d'études en laboratoire. A contrario de ces doses/concentrations qui génèrent des effets néfastes, une concentration de référence NOEC/NOEL qui signifie la « No Observe Effect Concentration/Level » est référencée. La NOAEL pour « No Observe Adversive Effect Level » nommée en français la Dose Sans Effet Indésirable Observé (DSEIO) ou Dose Sans Effet Nocif Observé (DSENO) sont généralement les valeurs référencées. Ces valeurs renseignent sur des effets mortels, sublétaux ou encore aucun effet seront à comparer avec les concentrations retrouvées dans l'environnement.

## b. Azoles, fongicides

### i. Structure chimique

La famille des azoles dont le cycle de cinq atomes est composé d'un arrangement totalisant entre un et cinq atomes d'azote. Elles regroupent trois sous-catégories principales (Figure 5) : les triazoles, les imidazoles et les triazolinthiones. D'après la nomenclature FRAC, ils sont tous des fongicides DMI comme le mode d'action a été décrit précédemment.

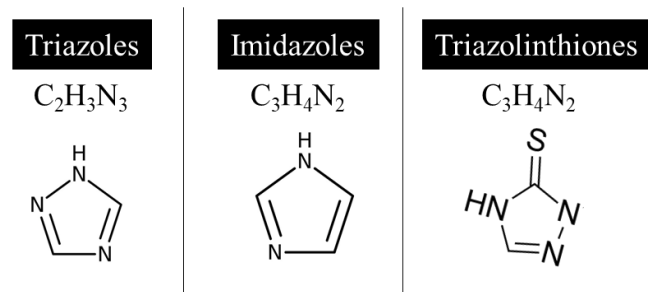


Figure 5 : Structure chimique des azoles

### ii. Usages et autorisations

Les azoles sont appliqués par pulvérisation, généralement en curatif, sur les maladies de taches foliaires telles que le Black Rot ou l'oïdium sur la vigne ou encore contre le septoriose du blé. Le contexte météorologique favorise le développement de ces champignons nuisibles lorsque les températures douces se combinent à des pluviométries importantes. Ces fongicides sont appliqués sur les grandes cultures lorsque les tiges s'allongent et avant que la floraison ou maturation ne se produise. En fonction des cultures (blé, orge, ...) cette période peut s'étendre de mi-mars jusqu'à fin juin. Pour la vigne, elle s'étend de mai à juillet.

Certains azoles ont également des utilisations en tant que biocide avec application sur certains matériaux tels que le bois (propiconazole, tébuconazole) et également à usage vétérinaire ou encore sur les humains (Tableau 1).

Tableau 1 : Usages des azoles

	Phytosanitaires (agricoles) <sup>1</sup>	Biocides	
		Tous	Vétérinaires <sup>2</sup> /Humains <sup>3</sup>
Azaconazole	Arbres, Fruits, Légumes	-	x
Bitertanol	Arbres, Grandes cultures, Fleurs, Fruits, Légumes	x	x
Bromuconazole	Grandes cultures	x	x
Clotrimazole	x	-	Chiens / humains
Cyproconazole	Arbres, Grandes cultures, Légumes, Vignes	-	x
Difénoconazole	Arbres, Grandes cultures, Fleurs, Fruits, Légumes, Vignes	-	x
Diniconazole	Grandes cultures, Vignes	-	x
Epoxiconazole	Grandes cultures	-	x
Etaconazole	x	-	x
Fenbuconazole	Arbres, Grandes cultures, Fruits, Légumes, Vignes	-	x
Fluconazole	x	-	Humains
Fluquinconazole	Grandes cultures	x	x
Flusilazole	Grandes cultures	-	x
Flutriafol	Grandes cultures, Légumes, Vignes	-	x
Hexaconazole	Grandes cultures, Vignes	-	x
Imazalil	Grandes cultures, Fruits, Légumes	-	x
Imibenconazole	x	-	x
Iponazole	Grandes cultures	x	x
Mefentrifluconazole	Grandes cultures	-	x
Metconazole	Grandes cultures	-	x
Miconazole	x	-	Chiens / chats / humains
Myclobutanil	Arbres, Fleurs, Fruits, Légumes, Vignes	x	x
Oxpoconazole	x	-	x
Pefurazoate	x	-	x
Penconazole	Fruits, Légumes, Vignes	-	x
Prochloraze	Grandes cultures	-	x
Propiconazole	Grandes cultures, Fleurs, Fruits	Produit protection pellicules, bois, caoutchouc, papier, cuir, textiles	x
Prothioconazole	Grandes cultures	-	x
Siméconazole	x	-	x
Tébuconazole	Arbres, Grandes cultures, Fruits, Vignes	Produit protection pellicules, bois, matériaux construction	x
Tétraconazole	Grandes cultures, Vignes	-	x
Triadiméfon	Grandes cultures, Vignes	-	x
Triadiménol	Grandes cultures, Légumes, Vignes	-	x
Triflumizole	-	-	x
Triticonazole	Abres, Grandes cultures, Fleurs	x	x

x : non utilisé, - : information manquante, <sup>1</sup> <https://ephy.anses.fr/>, <sup>2</sup> <https://www.lepointveterinaire.fr/dmv/univers.html>,

<sup>3</sup> <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/liste-a.html>

La frise développée Figure 6 permet de recenser les dates d'autorisation des azoles en France. Cette frise porte uniquement sur les utilisations en grandes cultures et viticoles, ces dernières étant les principales activités dans la région d'étude de la thèse. Les dates d'étude de la thèse étant après 2016, une barre verticale est ajoutée sur cette même frise.



Chapitre 1 : Bibliographie

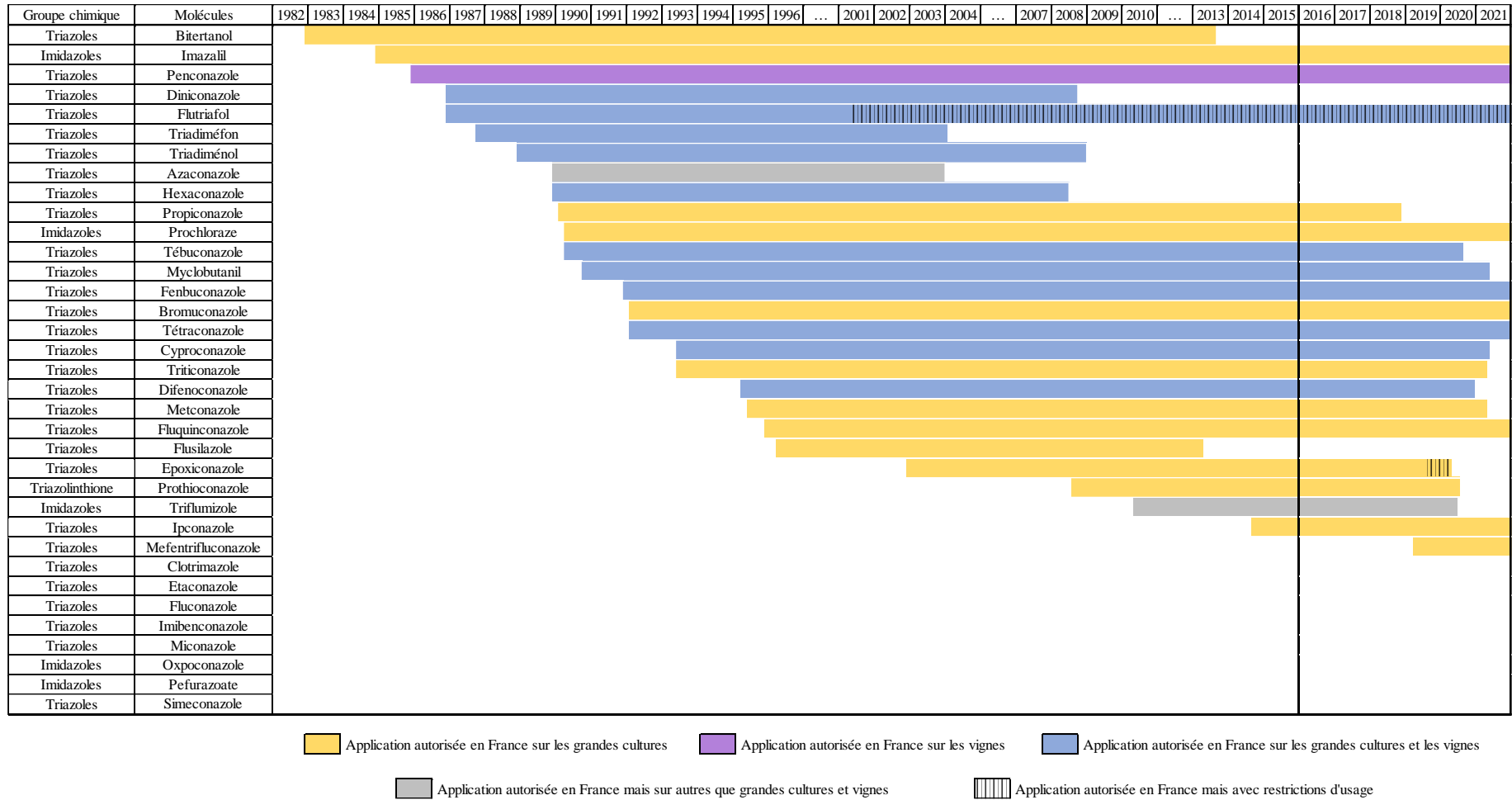


Figure 6 : Frise chronologique de l'autorisation d'application en France sur les grandes cultures et vignes des azoles (d'après la base E-Phy)

Les différents azoles ayant été énumérés se pose la question de ceux appliqués dans la région étudiée et en quelle quantité.

Si l'on considère les quantités d'azoles achetées en région Nouvelle-Aquitaine et vendues dans les départements de Charente et Charente-Maritime mises à disposition par la Banque Nationale des Ventes de produits phytopharmaceutiques par les Distributeurs agréés (BNVd), le Tableau 2 est obtenu.

Tableau 2 : Quantités de substances actives de la famille des azoles achetées dans la région Nouvelle-Aquitaine d'après les données de la BNVd

	Quantités de substances actives achetées en région Nouvelle-Aquitaine (kg)						
	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Azaconazole	0	0	0	0	0	0	0
Bitertanol	101	182	19	0,07	0,09	0	0
Bromuconazole	33	65	2360	4352	5589	10752	7856
Clotrimazole	0	0	0	0	0	0	0
Cyproconazole	3169	8823	10604	13665	10849	12302	3796
Difénoconazole	4485	8646	8345	10463	9533	11822	10005
Diniconazole	0	0	0	0	0	0	0
Époxiconazole	17613	39575	33247	32886	25269	26419	12211
Étaconazole	0	0	0	0	0	0	0
Fenbuconazole	943	2063	2091	2182	2180	3233	2573
Fluconazole	0	0	0	0	0	0	0
Fluquinconazole	0	0	0	0	0	0	0
Flusilazole	344	8	1	0	0	85	0
Flutriafol	43	49	37	18	8	0	0
Hexaconazole	0	0	0	0	0	0	0
Imazalil	0	0	0	12	6	8	14
Imibenconazole	0	0	0	0	0	0	0
Iponazole	0,7	20	24	34	43	42	21
Mefentrifluconazole	0	0	0	0	0	0	85
Metconazole	3100	7747	7437	9722	11629	14778	12506
Miconazole	0	0	0	0	0	0	0
Myclobutanil	1391	2616	1527	1176	799	553	222
Oxpoconazole	0	0	0	0	0	0	0
Pefurazoate	0	0	0	0	0	0	0
Penconazole	309	585	279	199	67	143	42
Prochloraze	32248	71310	67278	75774	57524	59469	25455
Propiconazole	3415	11088	14445	17069	15642	14976	2210
Prothioconazole	27102	56216	57225	58903	51292	58987	46739
Siméconazole	0	0	0	0	0	0	0
Tébuconazole	21555	59279	57452	70451	61076	67079	41143
Tétraconazole	308	1489	1683	1851	2370	4196	4025
Triadiméfon	0	0	0	0	0	0	0
Triadiménol	720	965	640	254	58	7	0,5
Triflumizole	0	0	0	0	0	0	0
Triticonazole	776	1529	1083	1227	1110	909	712

### iii. Toxicité

Les NOAEL et NOEL ainsi que les DL50 orales fournies par PPDB pour les azoles sont recensées dans le Tableau 3. Les concentrations NOAEL sont bien inférieures à celles des DL50. Les plus faibles valeurs sont obtenues pour l'époxiconazole chez les mammifères et le bromuconazole chez les oiseaux. Parmi les valeurs de DL50 présentes, l'imazalil semble être le plus toxique pour les mammifères avec une DL50 de 227 mg/kg p.c. et le prothioconazole le moins toxique avec une valeur supérieure à 5000 mg/kg p.c. Pour les oiseaux, l'hexaconazole

est le moins toxique contre que le cyproconazole qui a la valeur la plus faible de 94 mg/kg p.c. de DL50. Cette molécule a également été repérée par Hermsen et al. (2012) comme étant la plus toxique sur le poisson en comparaison des autres azoles étudiés.

Tableau 3 : Valeurs des NOAEL/NOEL (mg/kg p.c. jour) et DL50 orale (mg/kg p.c.) pour les azoles sur PPDB pour les mammifères et les oiseaux

	Chronique 21 jours NOAEL ou NOEL (mg/kg p.c. jour)		DL50 orale (mg/kg p.c.)	
	Mammifères NOAEL (Rat)	Oiseaux NOEL ( <i>Colinus virginianus</i> )	Mammifères (Rat)	Oiseaux ( <i>Colinus virginianus</i> )
Azaconazole	-	-	308	500
Bitertanol	10	-	> 5000	776
Bromuconazole	> 141	0,8	328	> 2150
Clotrimazole	-	26,1 ( <i>Coturnix japonica</i> )	-	-
Cyproconazole	8,3 (espèce inconnue)	1,4 ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	< 350	94
Difénoconazole	> 189	9,71	1453	> 2150 ( <i>Anas platyrhynchos</i> )
Diniconazole	-	-	474	1490
Epoxiconazole	2,3	0,91 (NOAEL)	3160	> 2000
Etaconazole	-	-	1343	-
Fenbuconazole	5	21 ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	> 2000	> 2150
Fluconazole	-	-	-	-
Fluquinconazole	6,8	-	112	> 2000 ( <i>Anas platyrhynchos</i> )
Flusilazole	-	1,9	674	> 1590 ( <i>Anas platyrhynchos</i> )
Flutriafol	13,5	35,8	> 1140	616 ( <i>Alectoris rufa</i> )
Hexaconazole	-	-	2189	> 4000 ( <i>Anas platyrhynchos</i> )
Imazalil	20 (espèce inconnue)	24 (espèce inconnue)	227	510 ( <i>Coturnix japonica</i> )
Imibenconazole	-	-	> 2800	-
Iponazole	> 22	4,3	888	> 962
Mefentrifluconazole	-	-	> 2000	816
Metconazole	10	6,19	595	787
Miconazole	-	-	-	-
Myclobutanil	> 100	24,2	1600	510
Oxpoconazole	-	-	-	-
Pefurazoate	-	-	-	-
Penconazole	30	28,6 ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	> 2000	> 1590 ( <i>Anas platyrhynchos</i> )
Prochloraze	14,89	-	1023	-
Propiconazole	43,7	25,5 ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	550	> 2510 ( <i>Anas platyrhynchos</i> )
Prothioconazole	95,6	78 ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	> 6200	> 2000
Siméconazole	-	-	611	-
Tébuconazole	72,3 (espèce inconnue)	5,8	1700	1988
Tétraconazole	> 0,8	-	1031	132
Triadiméfon	-	-	300	> 2000
Triadiméfol	6	7,5	721	> 2000
Triflumizole	-	-	1057	> 2510
Triticonazole	48,4	-	> 2000	> 2000

- : information manquante, DL50 : Dose létale 50 %, NOAEL : No Observe Adversive Effect Level, NOEL : No Observe Effect Level, p.c. : poids corporel

A de plus faibles doses, les azoles peuvent altérer la sécrétion des hormones thyroïdiennes (Liao et al., 2014) qui sont importantes pour le métabolisme et la croissance de nombreux vertébrés (Yu et al., 2013). Ces mêmes molécules peuvent également perturber l'axe hormonal du stress (van der Pas et al., 2012) (Magill et al., 2004). L'inhibition de la sécrétion de l'hormone de stress (corticotérostérone/cortisol) peut se produire chez les rongeurs (Robinson et al., 2012). Les azoles peuvent également affecter l'axe endocrine de la reproduction (Goetz et al., 2007) (Roelofs et al., 2014) en agissant sur la testostérone qui affecte les comportements sexuels, le développement de l'organisme et d'autres fonctions cruciales telles que l'immunité (Chambers et al., 2014).

Il semble donc avéré que certains azoles peuvent être considérés comme des perturbateurs endocriniens, même si les études sont souvent limitées à des modèles de laboratoire et à des molécules précises. Cependant, les données sont absentes ou quasi absentes pour certains azoles ce qui renforce l'intérêt de ces travaux de thèse.

### c. Néonicotinoïdes, insecticides

#### i. Structure chimique

Avant l'arrivée des néonicotinoïdes, le marché des insecticides était dominé historiquement par les pesticides organochlorés (exemple : le DDT) historiquement, puis par trois classes chimiques : les organophosphates, les carbamates et les pyréthriinoïdes synthétiques. Puis, le premier néonicotinoïde a été synthétisé : la nithiazine possédant un pouvoir insecticide important. En revanche, la nithiazine est photosensible et est donc inutilisable pour un usage agricole (Kleier et al., 1985) (Soloway et al., 1978). Ensuite, différentes molécules ont été synthétisées et dérivées de la nicotine (Figure 7). Les néonicotinoïdes peuvent être différenciés soit par leur formule chimique soit par leur mode d'action. Leur pouvoir leur confère une sélection plus élevée envers les insectes (Tomizawa et Casida, 2005) en agissant en tant qu'antagonistes des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine.

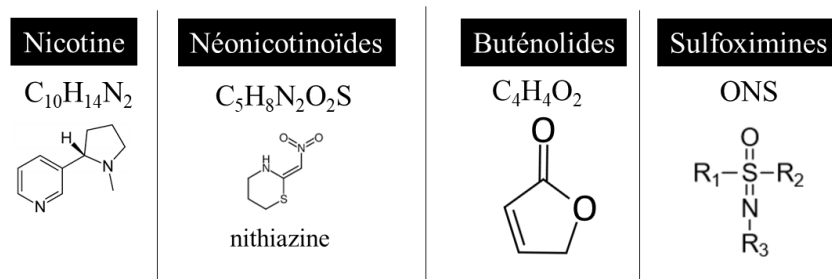


Figure 7 : Structures chimiques de la nicotine, des néonicotinoïdes, des buténolides et des sulfoximines

Les néonicotinoïdes de 1<sup>ère</sup> génération regroupent l'imidaclopride commercialisé par Bayer ©, l'acétamipride, le nitenpyrame ainsi que le thiaclopride (Simon-Delso et al., 2015). Les néonicotinoïdes de 2<sup>ème</sup> génération suivent ensuite avec : le thiaméthoxame (Maienfisch et al., 2001) et la clothianidine (un produit de dégradation du thiaméthoxame (Nauen et al., 2003) en plus d'être une molécule parent appliquée). Le dinotéfurane fait partie de la 3<sup>ème</sup> génération (Wakita et al., 2005). La suite des molécules a été synthétisée en Chine et elles ne sont pas autorisées en Union Européenne. Il s'agit des néonicotinoïdes de 4<sup>ème</sup> génération (Shao et al., 2013) à savoir les : guadipyr, huanyanglin, imidaclothiz et les cis-néonicotinoïdes : cycloxapride, paichongding (Shao et al., 2011).

Selon l'IRAC, quatre autres molécules peuvent être associées aux néonicotinoïdes de par leur mode d'action bien qu'ayant une structure chimique distincte : nicotine, sulfoxaflor (de la famille des sulfoximines qui est d'ailleurs inclus dans la catégorie de la 4<sup>ème</sup> génération des néonicotinoïdes), le flupyradifurone (buténolides) et triflumézopyrim (mésioionics).

## ii. Usages et autorisations

Ces néonicotinoïdes peuvent avoir aussi bien des usages agricoles que biocides (Tableau 4).

Tableau 4 : Usages des néonicotinoïdes

	Phytosanitaires (agricoles) <sup>1</sup>	Biocides	
		Tous	Vétérinaires <sup>2</sup> / Humains <sup>3</sup>
Acétamipride	Arbres, Fleurs, Fruits, Légumes	-	x
Clothianidine	Grandes cultures, Fruits, Légumes	-	x
Cycloxapride	x	-	x
Dinotéfurane	x	-	Chiens / chats
Flupyradifurone	x	-	x
Guadipyr	x	-	x
Huanyanglin	x	-	x
Imidaclopride	Arbres, Grandes cultures, Légumes	Insecticides, acaricides	Chiens / chats / lapins / furets
Imidaclothiz	x	-	x
Nitenpyrame	x	-	Chiens / chats
Nithiazine	x	-	x
Paichongding	x	-	x
Sulfoxaflor	Grandes cultures	-	x
Thiaclopride	Arbres, Grandes cultures, Fruits, Légumes	-	x
Thiaméthoxame	Arbres, Grandes cultures, Fleurs, Fruits, Légumes, Vignes	Produits de protection du bois, insecticides, acaricides	x

x : non utilisé, - : information manquante, <sup>1</sup> <https://ephy.anses.fr/>, <sup>2</sup> <https://www.lepointveterinaire.fr/dmv/univers.html>,

<sup>3</sup> <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/liste-a.html>

La Figure 8 permet de recenser les autorisations d'application en France que ce soit sur les grandes cultures ou sur la vigne. Une droite verticale à partir de l'année 2016 a été ajoutée pour représenter le début d'acquisition des données de la thèse. L'application peut se réaliser par pulvérisation ou alors dès le départ par enrobage des graines. A noter que la réglementation concernant cette famille ne cesse d'évoluer à travers des projets de loi et multiples dérogations en fonction des cultures. Il est alors compliqué d'avoir accès aux dates réelles d'autorisation.

Suite à la loi pour la reconquête de la biodiversité, de la nature et des paysages de 2016, des mesures européennes ont été prises. En effet, depuis le 1<sup>er</sup> septembre 2018, les Etats membres de l'Union Européenne ont décidé d'interdire la fabrication des produits phytosanitaires et dans le traitement des semences pour 5 néonicotinoïdes : l'acétamipride, la clothianidine, l'imidaclopride, le thiaclopride et le thiaméthoxame. Cependant, cette loi a prévu l'accord de dérogations jusqu'au 1<sup>er</sup> juillet 2020 notamment sur des applications de cultures

sous serre permanente. L'arrêté autorise, jusqu'au 1<sup>er</sup> juillet 2020, l'utilisation de produits phytopharmaceutiques à base d'acétamipride sur certaines cultures sauf pendant la période de floraison de celles-ci. La loi du 14 décembre 2020 autorise l'utilisation de l'imidaclopride et du thiaméthoxame pour traiter les semences de betteraves sucrières jusqu'en 2023. La France a également interdit par décret l'usage de deux autres substances présentant un mode d'action identique à ceux de la famille des néonicotinoïdes : le sulfoxaflor et le flupyradifurone.

Certains de ces néonicotinoïdes ont été utilisés sur la vigne contre les cicadelles vertes, qui est un insecte suceur qui se nourrit de la sève des végétaux, pouvant être porteuses et vectrices de l'agent pathogène de la flavescence dorée. Ils ont été appliqués pendant les mois de juin à août. Pour lutter contre les insectes ravageurs des grandes cultures tels que les coléoptères phytophages (se nourrissant de matières végétales) ou les pucerons (se nourrissant de la sève des plantes), les insecticides sont appliqués à deux périodes de l'année : septembre/novembre lors des premiers stades de pousse de la plante ainsi qu'aux mois de mai/juin au début de la floraison.

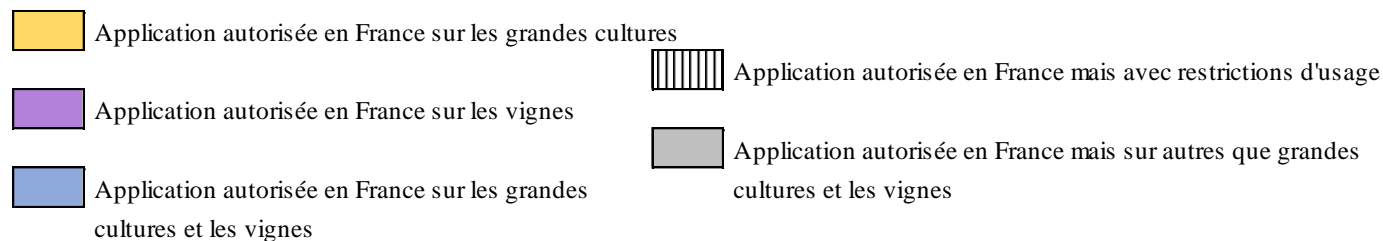
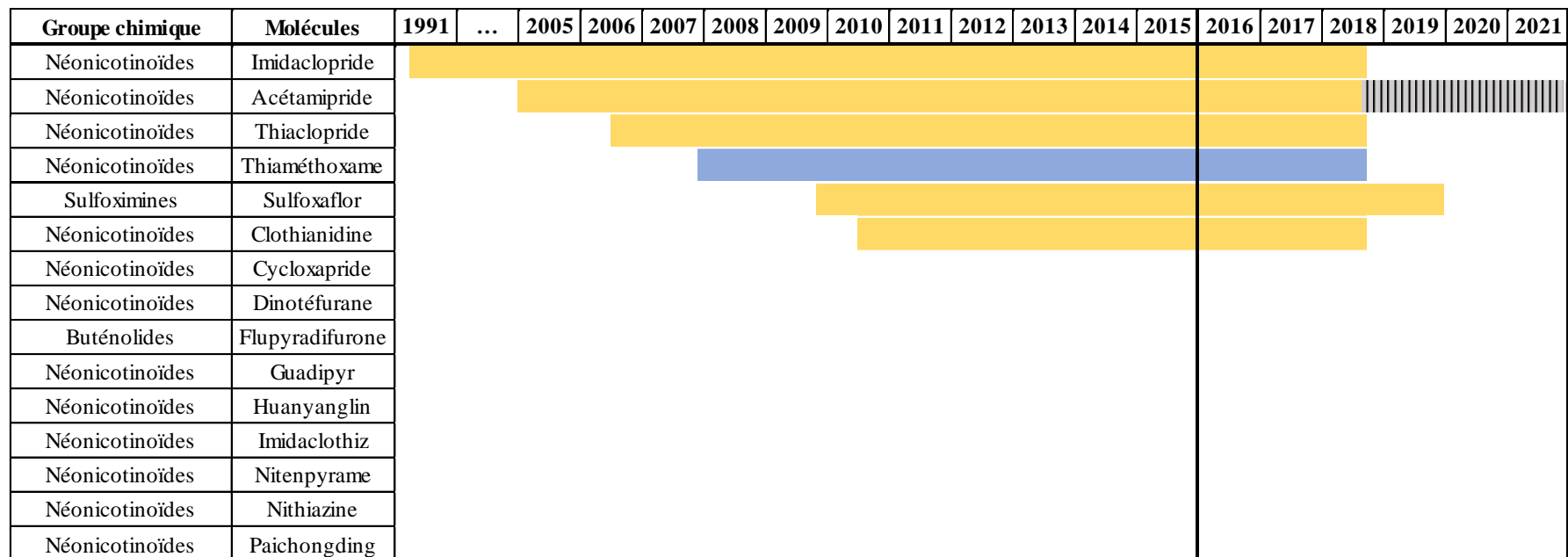


Figure 8 : Frise chronologique de l'autorisation d'applications en France des néonicotinoïdes, du sulfoxaflor et du flupyradifurone sur les grandes cultures et les vignes (d'après la base E-Phy)

A l'aide des données BNVD, les quantités de substances actives vendues dans la région de l'étude en région Nouvelle-Aquitaine peuvent être connues (Tableau 5). Certains ont été achetés en grandes quantités avant 2018 puis leur utilisation s'est réduite au vu de leur interdiction.

Tableau 5 : Quantités de substances actives de la famille des néonicotinoïdes achetées dans la région Nouvelle-Aquitaine d'après les données de la BNVD

	Quantités de substances actives achetées en région Nouvelle-Aquitaine (kg)						
	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Acétamipride	581	940	973	1019	1274	1318	597
Clothianidine	56	26	10	25	16	15	0
Cycloxapride	0	0	0	0	0	0	0
Dinotéfurane	0	0	0	0	0	0	0
Flupyradifurone	0	0	0	0	0	0	0
Guadipyr	0	0	0	0	0	0	0
Huanyanglin	0	0	0	0	0	0	0
Imidaclopride	11306	28361	26212	21026	26865	383	36
Imidaclothiz	0	0	0	0	0	0	0
Nitenpyrame	0	0	0	0	0	0	0
Nithiazine	0	0	0	0	0	0	0
Paichongding	0	0	0	0	0	0	0
Sulfoxaflor	0	0	0	0	0	0	0
Thiaclopride	2252	20660	20996	20079	22679	13271	68
Thiaméthoxame	5519	3120	3333	3790	3788	3115	25

### iii. Toxicité

Le Tableau 6 recense les valeurs de NOAEL ou NOEL et DL50 orale pour les néonicotinoïdes. Toutes les valeurs de NOAEL ou NOEL sont plus faibles que celles des LD50 ce qui est logique. L'acétamipride, l'imidaclopride ainsi que le thiaclopride ont des niveaux de concentrations qui n'engendrent pas ainsi que doses létales plus faibles que les autres molécules aussi bien chez les mammifères que chez les oiseaux. Ces trois néonicotinoïdes sont donc les plus toxiques. Les valeurs sont à nuancer en fonction de l'espèce étudiée. Ces molécules étant d'intérêt majeur, de nombreuses recherches de valeurs de DL50 ont été entreprises sur diverses espèces. Elles peuvent varier pour l'imidaclopride d'une valeur minimale de 31 mg/kg p.c. pour la caille du Japon (*Coturnix japonica*) à une dose de 283 mg/kg p.c. chez le canard colvert (*Anas platyrhynchos*) (Goulson, 2013). Pour la clothianidine, des valeurs de 200 à 1333 mg/kg p.c. sont obtenues respectivement pour le colin de Virginie (*Colinus virginianus*) et le canard colvert (Goulson, 2013).



Tableau 6 : Valeurs des NOAEL/NOEL et DL50 orale pour les néonicotinoïdes sur PPDB pour les mammifères et les oiseaux

	Chronique 21 jours NOAEL/NOEL (mg/kg p.c. jour)		DL50 orale (mg/kg p.c.)	
	Mammifères NOAEL (Rat)	Oiseaux NOEL ( <i>Colinus virgianus</i> )	Mammifères (Rat)	Oiseaux ( <i>Colinus virgianus</i> )
Acétamipride	15	9,5 NOAEL ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	146	98 ( <i>Anas platyrhynchos</i> )
Clothianidine	32,7 (espèce inconnue)	56,8	> 500	430
Cycloxapride	-	-	-	-
Dinotéfurane	-	-	> 2000	> 2000 ( <i>Coturnix japonica</i> )
Flupyradifurone	-	-	> 300	232
Guadipyr	-	-	-	1000 ( <i>Coturnix japonica</i> )
Huanyanglin	-	-	-	-
Imidaclopride	> 50	9,3	131	31 ( <i>Coturnix japonica</i> )
Imidaclothiz	-	-	-	-
Nitenpyrame	-	-	1575	1124 ( <i>Anas platyrhynchos</i> )
Nithiazine	-	-	-	-
Paichongding	-	-	-	-
Sulfoxaflor	-	-	1000	676
Thiaclopride	2,7	3,73 ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	177	35 ( <i>Serinus canaria</i> )
Thiaméthoxame	62	29,4 ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	> 1563	576 ( <i>Anas platyrhynchos</i> )

- : information manquante, DL50 : Dose létale 50 %, NOAEL : No Observe Adversive Effect Level, NOEL : No Observe Effect Level, p.c. : poids corporel

Bien que la sélectivité des néonicotinoïdes envers les insectes est supérieure à celles des vertébrés (Tomizawa et Casida, 2005), leur toxicité envers ces derniers n'est pas inexistante (Gibbons et al., 2015). En effet, à plus faibles concentrations, de nombreuses publications ont étudiés leurs effets sur différents niveaux expliqués plus en détails en suivant (hépatotoxiques, neurotoxiques, reprotoxiques, génotoxiques, ...) (Han et al., 2018) essentiellement chez la souris voire chez l'Homme. Au vu de leur mode d'action sur les insectes, les abeilles ont également été impactées en réduisant la production de reines (Whitehorn et al., 2012) ou de miel (Wood et al., 2018) par l'application de ces pesticides dans l'environnement d'où leur interdiction.

Chez la souris, des changements induits par certains néonicotinoïdes ont été observés au niveau du foie et sont donc qualifiés d'hépatotoxiques (Kapoor et al., 2014) (Arfat et al., 2014) (Vohra et al., 2014). A l'échelle neurotoxique, ces composés entraînent de nombreuses altérations comme une diminution des fonctions cognitives (Özdemir et al., 2014), une diminution du seuil de la douleur (Lonare et al., 2014) ou encore une augmentation de l'anxiété (Rodrigues et al., 2010). Quant à la reproduction, les néonicotinoïdes sont nocifs aussi bien pour la fertilité des spermatozoïdes que pour le développement de l'embryon. A noter que les effets sur la reproduction peuvent être d'autant plus sévères en condition de stress (Hirano et al., 2015). Des mutations peuvent être produites également au niveau du patrimoine génétique (Feng et al., 2005) en affectant la division cellulaire par exemple (Stivaktakis et al., 2016). Tous ces effets sublétaux sont encore débattus d'où l'intérêt de la sélection de cette famille de molécule dans notre étude. Leurs concentrations dans les organismes de l'environnement pourront être connues et reliées avec celles de ces doses.

### 3. Les pesticides : transferts et occurrence dans l'environnement

#### a. Mécanismes de transfert dans l'environnement

Les pesticides sont généralement appliqués en milieu agricole par pulvérisation sur les plantes ou le sol. D'autres molécules peuvent être insérées à l'enrobage des graines pour agir au plus tôt dans le cycle du végétal. En fonction de différents facteurs, la proportion de pesticides « non efficace » peut se retrouver dans l'environnement (air, eau, sol). Les pesticides sont alors qualifiés de contaminants puisqu'ils ne sont pas présents naturellement dans ces milieux à ces concentrations. La contamination de ces différents milieux de l'environnement dépend essentiellement de quatre catégories qui sont plus ou moins prises en compte pour les modélisations (Neitsch et al., 2005) (Woodrow et al., 1997) :

- Les pratiques culturales (calendrier, méthode d'application, dose),
- Les propriétés physico-chimiques de la molécule (temps de demi-vie, solubilité, volatilité, adsorption, ...) (Jury et al., 1984),
- Les caractéristiques du milieu (composition, température, humidité, pente, ...),
- Les conditions météorologiques avant, pendant et après traitement.

Une fois appliquée, la molécule peut être transportée via plusieurs mécanismes de transfert. Elle peut se volatiliser pendant, après l'application puis être transportée dans le compartiment air. La part restante (non volatilisée et non efficace à la plante) peut être dégradée ou atteindre le sol. L'adsorption (puis minéralisation, dégradation ou stabilisation) est le mécanisme qui conduit à la contamination des sols. Le ruissellement sur les parcelles traitées ainsi que les précipitations après transport peuvent contaminer les eaux de surface voire les eaux souterraines par lessivage (Cohen et Steinmetz, 1986). La Figure 9 résume ces différents transferts et a été réalisée à partir des travaux de Chataing (2016) et Bedos et al. (2002).

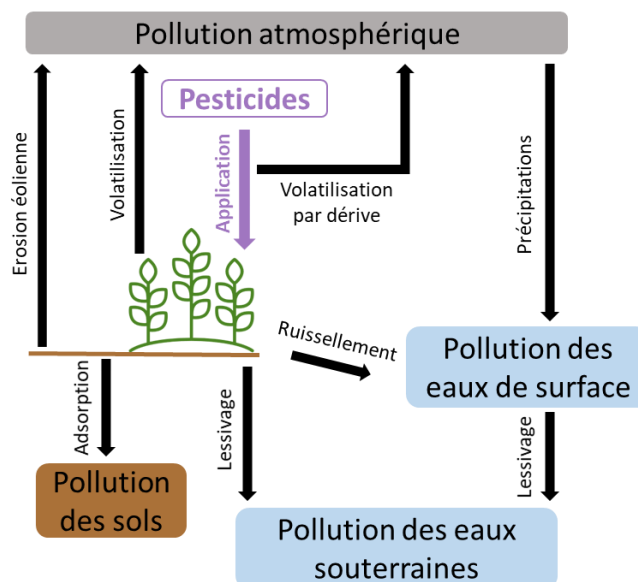


Figure 9 : Transferts des pesticides vers les différents compartiments de l'environnement figure adaptée de Chataing (2016) et Bedos et al. (2002)

## b. Paramètres physico-chimiques des molécules

Il est important de prendre en compte certains paramètres physico-chimiques (Paap, 2010) pertinents pour les pesticides afin de mieux appréhender leur devenir dans l'environnement.

### Tout d'abord pour le compartiment gazeux :

- Constante de Henry

La constante de Henry caractérise la capacité d'une substance à se partager entre les deux phases d'un système binaire air/eau. Une substance est considérée comme volatile si sa constante de Henry est nettement supérieure à  $1 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ .

- Pression de vapeur

La pression de vapeur d'une substance est définie comme la pression de saturation au-dessus de laquelle une substance est solide ou liquide. Elle traduit donc l'aptitude d'une molécule à se volatiliser à une température donnée, généralement  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Une substance est considérée comme volatile si sa pression de vapeur est supérieure à  $100 \text{ Pa}$ .

- Coefficient de partage octanol/air ( $K_{oa}$ )

Le coefficient de partage octanol/air définit la répartition d'une substance entre air et l'octanol. Il peut être calculé en divisant  $K_{ow}$  (décrit par la suite) avec la constante de Henry. Il représente l'aptitude d'une substance présente dans l'atmosphère à l'absorption sur les aérosols organiques (Hart et al., 2012).

- Temps de demi-vie dans l'air DT50

Ce temps de demi-vie, exprimé généralement en jours ou en heures si les molécules sont peu persistantes, désigne le temps nécessaire pour que 50 % de la masse de la substance disparaisse dans l'air à la suite de différentes transformations (photochimiques par exemple).

### Puis pour le compartiment sol :

- Coefficient de partage carbone organique/eau ( $K_{oc}$ )

$K_{oc}$  est le coefficient de partage d'une molécule entre la fraction de carbone organique et l'eau dans un sol ou sédiment lorsque l'équilibre est atteint entre les deux phases. Il est par conséquent fonction de la teneur en carbone organique du milieu et donc de sa matière organique. Plus la valeur  $K_{oc}$  est élevée plus la molécule est adsorbable. A contrario, si la valeur est faible, la concentration du pesticide en solution sera élevée et donc plus susceptible de donner lieu à un ruissellement ou lessivage vers les eaux de surface ou souterraines. Pour les pesticides, cette affinité diffère et n'est pas universelle. Par exemple, pour les néonicotinoïdes, il a été prouvé que l'adsorption est plus importante dans les sols riches en matières organiques (Aseperi et al., 2020).

- Temps de demi-vie dans le sol DT50

Ce temps de demi-vie, exprimé généralement en jours, désigne le temps nécessaire pour que 50 % de la masse de la substance disparaisse dans le sol à la suite de différentes transformations biologiques ou physico-chimiques.

Et enfin, pour le compartiment aqueux :

- Constante de dissociation dans l'eau ( $K_a$ )

$K_a$ , plus communément converti en potentiel  $K_a$  ( $pK_a$  correspondant au  $-\log K_a$ ), traduit l'acidité d'une molécule. Elle exprime la capacité d'une molécule à se dissocier en ions. Cette valeur est indispensable pour maîtriser l'analyse des pesticides. Le pH peut être ajusté afin de favoriser l'espèce ionique ou neutre de la molécule.

- Coefficient de partage octanol/eau ( $K_{ow}$ )

Le coefficient de partage n-octanol/eau ( $K_{ow}$ ) est défini comme le rapport des concentrations à l'équilibre d'une substance dissoute dans deux solvants quasiment non miscibles (octanol/eau). Il exprime donc l'hydrophobie (liposolubilité) ou l'hydrophilie d'une molécule. Il est généralement exprimé sous la forme de son logarithme, base 10 ( $\log K_{ow}$  également appelé  $\log P$ ). Certains pesticides pouvant se dissocier dans l'eau en fonction de leur  $pK_a$  et pH du milieu, il peut être utile de considérer la valeur  $\log D$  qui prend en compte la variation du pH. Lorsque le composé est majoritairement présent sous forme neutre, alors le logarithme de  $D$  est égal au logarithme  $K_{ow}$ .

- Solubilité aqueuse

La solubilité dans l'eau traduit la quantité maximale de ce composé pouvant être mise en solution dans un volume et à une température donnée. Les composés ayant une forte solubilité sont plus présents en phase aqueuse et potentiellement plus lessivés dans les eaux souterraines.

- Photolyse aqueuse DT50

La photolyse est la dissociation d'un composant directement provoquée par son exposition au rayonnement (lumière ou autre). Elle est exprimée en jours. Cette photolyse est dite aqueuse lorsque la molécule est en solution. Il s'agit d'un paramètre renseignant sur la potentielle dégradation d'une molécule.

- Hydrolyse aqueuse DT50

Lors d'une hydrolyse, un composé est dissocié au contact de l'eau et subit une réaction chimique par laquelle une partie de la molécule de la substance réagissant est remplacée par un groupe alcool (OH). Ce processus dépend essentiellement de l'acidité du milieu (pH).

### c. Occurrence des pesticides étudiés dans les différents milieux

Les azoles et néonicotinoïdes se retrouvent-ils finalement dans les différents compartiments de l'environnement ?

Pour le milieu aérien (Tableau 7), c'est depuis les années 1970 que les Associations Agréées de Surveillance de la Qualité de l'Air (AASQA) ont été mises en place et ont permis l'installation de stations de mesures sur tout le territoire. Ces associations sont réunies au sein de la fédération Atmo France. Les données obtenues par Atmo France ont été compilées dans un fichier Excel et est à disposition de tous en ligne (téléchargement possible à l'adresse <https://atmo-france.org/mise-a-disposition-de-15-annees-de-mesures-de-pesticides/>).

Les données de deux publications (Schummer et al., 2010) (Raheison et al., 2019) ainsi que les données d'une thèse (Cruz, 2015) ont été insérées à ce même Tableau 7. Une unique publication a été insérée ne reportant pas des données obtenues sur le territoire français mais plutôt en Espagne (Coscollà et al., 2010). Les molécules précédemment présentées pour les deux familles qui ne sont pas analysées dans le compartiment air n'ont pas été mentionnées dans le tableau.

A noter que les néonicotinoïdes ne sont pas souvent dosés dans l'air puisqu'ils ne sont pas classés prioritaires selon divers critères (Hulin et al., 2021). Dans le cadre de la thèse, ces néonicotinoïdes vont être analysés dans le compartiment air et les concentrations obtenues permettront d'enrichir la littérature. Les azoles sont bien analysés et quantifiés dans ce compartiment ce qui prouve une ambiance chimique contaminée.

Tableau 7 : Azoles et néonicotinoïdes analysés dans l'air en France et en Espagne d'après la bibliographie

Molécules	Concentration maximale (ng/m <sup>3</sup> )	Médiane (ng/m <sup>3</sup> )	% détecté	Références	
Bitertanol	< 0,24	< 0,24	0%	i	
Bromuconazole	< 0,05	< 0,05	0%	i	
Cyproconazole	20,50	11,08 b	100%	iv	
	0,047	< 0,04	0,1%	i	
Difénoconazole	0,8	0,35 b	90%	iv	
	0,076	< 0,04	0,4%	i	
	0,08	0,03	60%	ii	
Epoxyconazole	0,09	< LD	8%	iii	
	0,41	< LD	5%	i	
	x	x	oui	v	
	3,99	0,44 b	17%	vii	
Fenbuconazole	0,181	< LD	1%	i	
Fluquinconazole	< LD	< LD	0%	i	
	3,9 a	3,4 a	40%	vi	
Flusilazole	0,14	< LD	14%	iii	
	0,318	< LD	8%	i	
	70,32	20,04 b	100%	iv	
Hexaconazole	0,09	< 0,05	1%	i	
	< 0,00025	< 0,00025	0%	iv	
Metconazole	< LD	< LD	0%	iii	
	< LD	< LD	0%	i	
Myclobutanil	1779,1 a	235,2 a	100%	vi	
	0,078	< 0,05	0,4%	i	
Penconazole	3,09	1,03 b	100%	iv	
	19,41	5,78 b	100%	iv	
Prochloraze	< 0,05	< 0,05	0%	i	
	64,01	39,32 b	100%	iv	
Propiconazole	< 0,04	< 0,04	0%	i	
	< LD	< LD	0%	iii	
	0,688	< 0,05	1%	i	
Tébuconazole	16,1 a	8 a	80%	vi	
	0,14	< LD	30%	ii	
	0,07	< LD	2%	iii	
	2,02	< 0,05	5%	i	
Tétraconazole	x	x	Oui	v	
	5,03	1,49 b	90%	iv	
	< LD	< LD	0%	iii	
Triadiménol	2,638	< 0,05	4%	i	
	0,29	0,14 b	100%	iv	
Triticonazole	0,46	< 0,04	2%	i	
Triticonazole	< 0,05	< 0,05	0%	i	
N	Acétamipride	< LD	< LD	0%	i
	Clothianidine	< 0,05	< 0,05	0%	i
	Imidaclopride	2,298	< LD	3%	i
	Thiaméthoxame	< 0,05	< 0,05	0%	i

A : Azoles, LD : Limite de détection, N : Néonicotinoïdes

i : Phyt-Atmo données pesticides 2002-2019 Nouvelle-Aquitaine \*, ii : Phyt-Atmo données pesticides 2002-2019 Nouvelle-Aquitaine (2002, Cognac, 5) \*, iii : Phyt-Atmo données pesticides 2002-2019 Nouvelle-Aquitaine (2002, 2003, 2013, Niort, 4) \*, iv : (Schummer et al., 2010) (1) \*, v : (Raheison et al., 2019) (5) \*, vi : (Cruz, 2015) (5) \*, vii : (Coscollà et al., 2010) (1, 2, 3, 4) \*\*

1 : urbain, 2 : rural, 3 : fruits, 4 : grandes cultures, 5 : vignes, \* : France, \*\* : Espagne

a : unité fournie en ng/PUF au lieu de ng/m<sup>3</sup>, b : moyenne au lieu de médiane

Quant au milieu aquatique qui concerne les eaux de surface (eaux circulant ou stockées à la surface des continents et donc en contact avec l'atmosphère) et les eaux souterraines (les eaux présentes sous la surface du sol), les concentrations en pesticides sont relevées par la DREAL (Directions Régionales de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement). A partir des agences et offices de l'eau, une compilation des données sous forme de concentrations totales en pesticides dans les eaux de surface a été réalisée et est disponible sur la plateforme CartOgraph' gérée par l'Office Français de la Biodiversité (OFB). En 2014 et dans la région Nouvelle-Aquitaine, c'est à Varès (47400) qu'une concentration maximale de 4,44 µg/L a été quantifiée. A Taillebourg (17350), au nord de la ville de Saintes, une concentration plus faible de 0,12 µg/L a été recueillie. Les publications dans ce compartiment sont nombreuses. Les néonicotinoïdes peuvent facilement ruisseler et être transportés par les eaux puisqu'ils sont fortement solubles dans l'eau (Bonmatin et al., 2015) (Gupta et al., 2008). Tant les azoles que les néonicotinoïdes sont retrouvés dans ce compartiment (Guarda et al., 2020) (Cruz, 2015) (Ccanccapa et al., 2016) (Peng et al., 2018) (Bonmatin et al., 2021). Plus précisément pour le tébuconazole, les concentrations peuvent être comprises entre : 0,020 et 0,185 µg/L dans une rivière brésilienne en 2018-2019 (Guarda et al., 2020), entre 0,001 et 0,100 µg/L dans les rivières du *delta* du Yangzi située à l'est de la Chine (Peng et al., 2018) ou encore entre 0,030 et 0,035 µg/L dans l'eau d'un bassin au sud-est de Buenos Aires en Argentine collectée en 2012 (De Gerónimo et al., 2014).

Aucune association publique régie par l'Etat ne réalise l'analyse des pesticides dans les sols. Cette absence de données s'explique par la non réglementation des concentrations en pesticides dans les sols sur le territoire français. Néanmoins, de nombreux travaux, de thèses par exemple, ont été réalisés afin d'avoir une idée de ces concentrations et persistance des pesticides dans cette matrice. Tout comme dans le compartiment eau, les deux familles de pesticides étudiées dans cette thèse ont été quantifiées dans les sols (Pierdet, 2020) (Guarda et al., 2020) (Bonmatin et al., 2021) comme par exemple le prochloraze avec une concentration de 485,2 ng/g. (Pelosi et al., 2021).

#### 4. Les pesticides : transferts et occurrence dans les organismes vivants

##### a. Mécanismes de transfert vers les organismes

Dans la partie précédente, uniquement les compartiments physiques ont été décrits. En revanche, l'environnement est également composé de compartiments biologiques avec tous les organismes vivants qui peuvent également être soumis à la contamination par différentes voies (Figure 10). Les pesticides peuvent également avoir des conséquences indirectes sur les populations animales. En effet, la nourriture peut se raréfier comme les insectes (sous l'action des insecticides) pour les oiseaux insectivores et donc conduire à une diminution de la population (Hallmann et al., 2014). Les différentes voies de contamination directes sont les suivantes (Klaassen et al., 2013) :

- Transtégumentaire (traverse la couche protectrice de l'organisme, voie cutanée) y compris par transfert de l'adulte au juvénile,
- Respiratoire par inhalation,
- Trophique (contamination via l'alimentation donc ingestion).

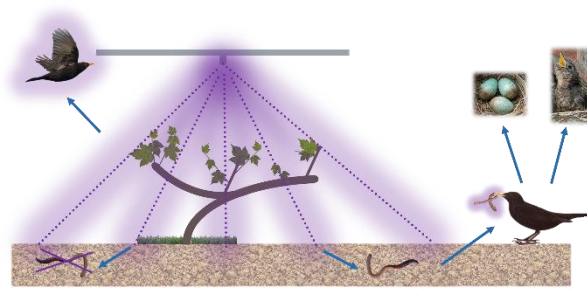


Figure 10 : Schéma des différentes voies de contamination d'un organisme vivant

Les animaux peuvent ingérer leur nourriture contaminée comme par exemple les granivores qui peuvent directement ingérer une graine enrobée (Lopez-Antia et al., 2018) (Prosser et Hart, 2005). Les vers de terre, une nourriture privilégiée de certains oiseaux, ont prouvé être contaminés au prochloraze avec des concentrations allant de 1,2 ng/g (Daniele et al., 2018) jusqu'à 1210 ng/g (Pelosi et al., 2021). Ensuite, ces molécules peuvent s'accumuler le long de la chaîne trophique (en fonction des propriétés physico-chimiques). C'est par exemple le cas du DDT, un pesticide organochloré (LeBlanc, 1995).

## b. Métabolisation

### i. Notions de la métabolisation

Si le pesticide entre au sein de l'organisme vivant, il devient une substance étrangère appelée xénobiotique. Son parcours est schématisé Figure 11, les différentes étapes de son parcours sont développées ci-dessous (Klaassen et al., 2013).

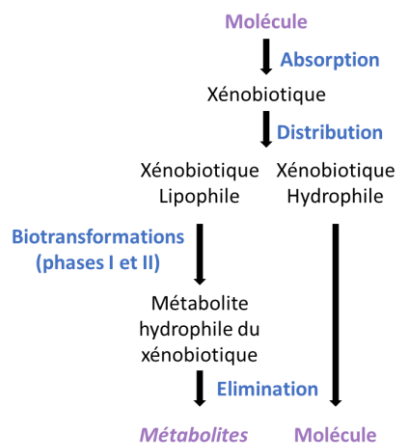


Figure 11 : Schéma du cheminement de l'absorption d'une molécule au sein d'un organisme

La première étape est celle de l'absorption du xénobiotique avec le passage du milieu extérieur vers le milieu intérieur. Des barrières physiques telles que la peau, les plumes, les poumons peuvent ralentir voire empêcher l'entrée de ces composés au sein de l'organisme.



La seconde étape correspond à sa distribution dans les différents compartiments de l'organisme. Le xénobiotique peut soit être stocké (par exemple dans les graisses si la molécule est lipophile), soit être transporté via différents fluides (le sang par exemple), soit atteindre des organes ou tissus cibles ou encore des sites pour subir des biotransformations (Wienkers et Heath, 2005).

Les biotransformations : il s'agit de la troisième étape du parcours. Par l'intermédiaire des enzymes du métabolisme et des transporteurs des xénobiotiques, les xénobiotiques peuvent être métabolisés avec des réactions chimiques. D'une manière générale, il s'agit d'une action de défense de l'organisme qui permet de transformer la molécule parente en métabolite éliminable ou moins toxique en les neutralisant. Deux types de biotransformations sont distingués et ont lieu au niveau des organes comme le rein ou le foie : celles de phase I concernant les réactions de fonctionnalisation puis celles de phase II qui sont des réactions de conjugaison. Certains xénobiotiques peuvent subir uniquement les réactions de phase I, directement les réactions de phase II ou encore la succession des deux phases.

Les réactions de phase I consistent à modifier les groupements fonctionnels de façon à rendre la molécule plus hydrophile (ajout : OH, NH<sub>2</sub>, COOH, SH) via des réactions généralement catalysées par les enzymes du cytochrome P 450 :

- hydroxylation,
- époxydation,
- réduction,
- désalkylation,
- hydrolyse,
- oxydation.

Les réactions de phase II sont principalement dues à des enzymes cytosoliques exprimées majoritairement dans le foie. Ces enzymes agissent sur les groupes fonctionnels alcool (OH), amine (NH<sub>2</sub>) ou acide carboxylique (COOH), soit déjà présents sur le xénobiotique, soit sur le métabolite issu de la phase I. Différentes molécules peuvent se greffer telles que l'acide glucuronique (glucuroconjugaison sur un atome d'oxygène, d'azote ou de soufre de la molécule), le glutathion (sur un atome électrophile), un acide aminé (comme la glycine : glycoconjugaison), l'acétate (acétylation), ou le sulfate (sulfoconjugaison).

De règle générale, le métabolite produit est moins actif que le xénobiotique initial mais des exceptions existent. S'il est plus toxique, on parle alors de bioactivation. Ces successions de biotransformations permettent de passer de composés lipophiles, difficilement éliminables, à des composés hydrophiles pouvant ensuite être excrétés via deux systèmes majeurs. L'élimination peut être rénale via l'urine ou encore intestinale via la bile se transformant en fèces.

C'est lors de la dernière étape de son chemin, l'élimination, que le xénobiotique initial ou modifié est rejeté dans le milieu extérieur. Au vu de ces nombreux mécanismes biologiques, le nombre de métabolites peut être très élevé et difficilement identifiable.

*ii. Métabolites des pesticides étudiés*

Azoles :

Certains métabolites des azoles peuvent être importants à analyser dans les matrices biologiques. Dans la bibliographie (European Food Safety Authority, 2013a), peu de métabolites sont listés mais parmi eux on note : le 1,2,4-triazole (T ou TRZ) qui est un métabolite commun à toute la famille des azoles. Cette molécule a également été synthétisée pour une utilisation pharmaceutique (Zhang et al., 2017) et inhibiteur de la nitrification en l'ajoutant aux engrais pour ralentir la nitrification naturelle des bactéries (Scheurer et al., 2016). Les études ont principalement été réalisées dans les matrices sol (Blondel et al., 2018) mais également dans les légumes et fruits (Kolberg et al., 2016) (Schermerhorn et al., 2005) (European Food Safety Authority, 2013b). Les différentes études ont permis de mettre en évidence trois autres métabolites : le 1,2,4 triazole alanine (TA), le 1,2,4-triazole acétique acide (TAA) et le 1,2,4-triazole lactique acide (TLA).

TA est formé par conjugaison de T avec l'acide aminé serine. TA peut également conduire à TAA via une oxydation (Kolberg et al., 2016). Cette liste est non exhaustive comme le montre les nombreuses publications recherchant les produits de transformation du tébuconazole dans le sol (Storck et al., 2016) (El Azhari et al., 2018) (Potter et al., 2005). Des métabolites énantiomères du fenbuconazole ont été analysés chez le lézard (Hao et al., 2021).

En revanche, par manque de temps, la recherche et l'analyse des métabolites des azoles ne seront pas développées dans le cadre de cette thèse. Les techniques d'analyses sont complètement différentes et s'apparentent à celles employées pour l'analyse des molécules polaires comme décrits ultérieurement.

Néonicotinoïdes :

Les propositions de réactions métaboliques sont nombreuses pour les néonicotinoïdes comme l'illustre la Figure 12. Certains métaboliques sont spécifiques à certains néonicotinoïdes et d'autres sont communs à plusieurs (Ford et Casida, 2006) (Van Lexmond et al., 2015). L'acétamipride, l'imidaclopride, le nitenpyrame et le thiaclopride partagent par exemple le 6-chloronicotinique acide (appelé CPM-3 sur la Figure 12) (Nomura et al., 2013) qui est très largement analysé simultanément avec les néonicotinoïdes dans différentes matrices biologiques telles que l'urine (Uroz et al., 2001) (Kavvalakis et al., 2013), le plasma (Hao et al., 2018) ou autres matrices environnementales comme le vin (Berset et al., 2017), l'eau (Hao et al., 2016) ou le miel (Codling et al., 2016). Au vu du nombre important de métabolites recensés, par exemple 74 pour Ford et Casida (2006), il sera impossible de tous les développer.

Les métabolites ainsi créés peuvent s'avérer plus ou moins toxiques que leur molécule parent. Par exemple, il a été prouvé que l'imidaclopride oléfine est deux fois plus toxiques pour les abeilles que l'imidaclopride (Severine Suchail et al., 2004)

Chapitre 1 : Bibliographie

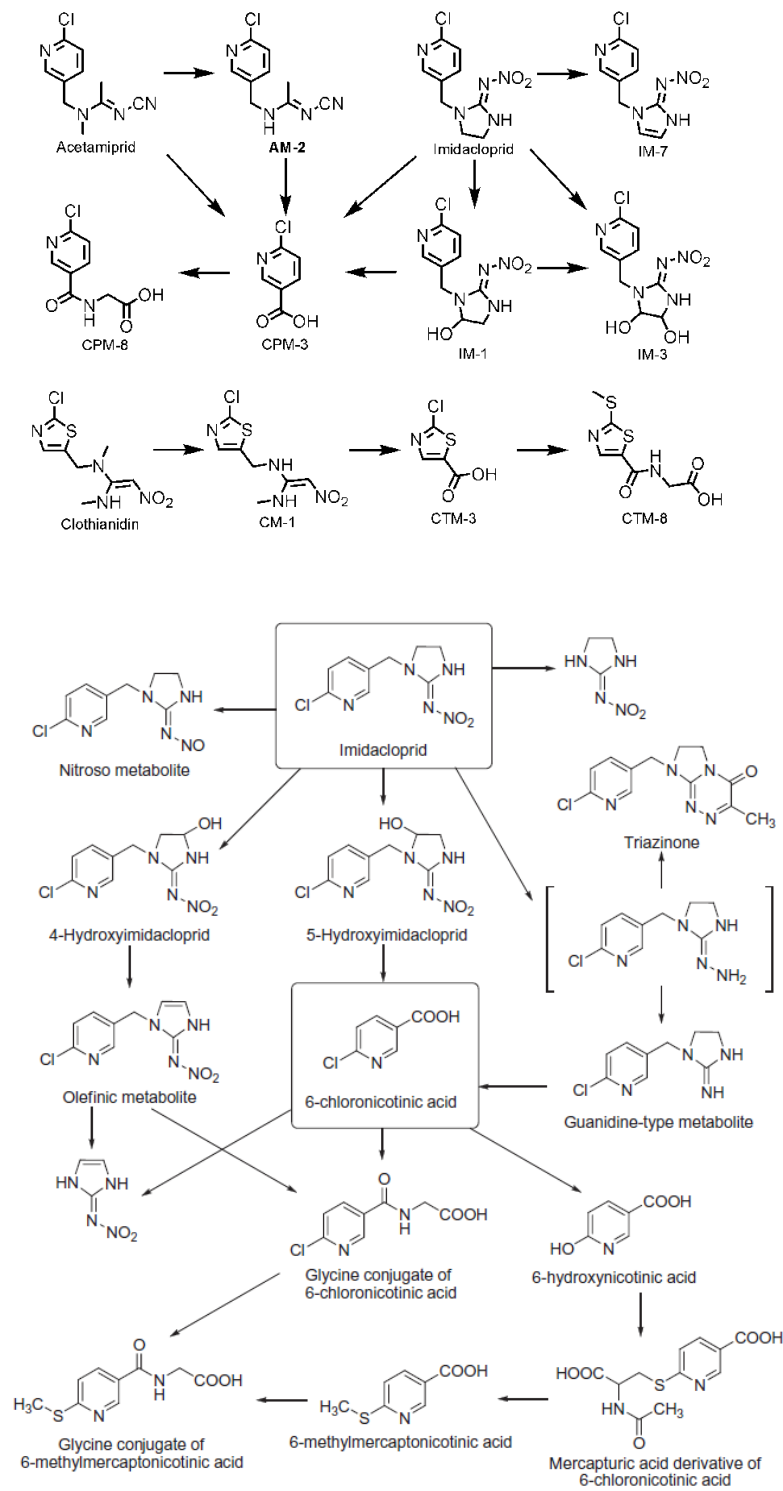


Figure 12 : Proposition de réactions de métabolisations de certains néonicotinoïdes (Taira et al., 2013) puis de métabolisation de l'imidaclopride chez le rat par Solecki, (2001)

### c. Informations sur les matrices biologiques

Pour des raisons éthiques, l'utilisation de matrices biologiques non destructives pour les espèces étudiées prend de l'ampleur dans les recherches. Différentes matrices non invasives peuvent soit être collectées avec un contact avant relâchement de l'espèce dans son milieu soit sans contact avec elle (Espín et al., 2016) (Fair et al., 2010). Des fluides biologiques peuvent être prélevés tels que le sang, la salive, l'urine ou encore des matrices solides comme les fèces, des mues pour les reptiles, les coquilles d'œufs, les pelotes de rejection ou les phanères. Chacune de ces matrices est détaillée ci-dessous.

#### Fluides internes :

Parmi les fluides internes, on peut énumérer par exemple le sang et la bile. Ce dernier peut être un fluide intéressant puisqu'il est produit par le foie pour aider à la digestion. Il est en revanche impossible à prélever de manière non invasive et non létale.

Le sang est un fluide biologique composé de plasma dans lequel circule trois types de cellules : les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes (Figure 13). Le plasma est la partie liquide du sang et est composé à 90 % d'eau salée. Il permet aux globules rouges et aux plaquettes de circuler dans le système vasculaire. Il apporte également les substances nutritives aux tissus, dont il recueille en retour les déchets pour les acheminer vers les organes d'élimination. Comme c'est un fluide en mouvement qui circule pour irriguer les tissus, les xénobiotiques pourront éventuellement s'y retrouver.

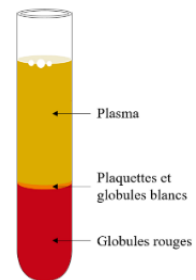


Figure 13 :  
Composants du sang

On peut différencier plusieurs termes : le sang, le plasma et le sérum (Sacchetto et al., 2014). C'est le sang total qui est prélevé sur l'espèce étudiée. Le sérum est obtenu par simple centrifugation de ce sang total. Le plasma, lui, est le surnageant obtenu après centrifugation du sang total dont la coagulabilité a été inhibée par l'ajout d'un anticoagulant dans le tube de prélèvement. Les contaminants sont soit analysés dans le sang total, soit dans le plasma mais très rarement dans le sérum.

La quantité maximale de sang prélevée doit être inférieure à 10 % la quantité totale de sang de l'animal (McGuill et Rowan, 1989). Pour les oiseaux, le sang représente environ 6 % de la masse total du corps. Ce pourcentage dépend de l'espèce mais également de la saison. On pourra prélever au maximum chez une mésange de poids moyen de 10 g : 60 µL de sang total (10 g x 6 % x 10 % = 0,06 g). Sachant que le plasma représente environ 55 % du sang total, un volume d'échantillon de 33 µL plasma peut être disponible. Le volume d'échantillon destiné à l'analyse peut donc s'avérer être très faible pour ces petites espèces et ceci représente l'une des contraintes majeures pour étudier la contamination des petits vertébrés.

### Fluides excrétés :

Quant aux fluides excrétés vers l'extérieur (à contrario du sang qui reste en interne), on trouve : l'urine, la salive et la sueur qui peuvent être prélevés. Ils peuvent être utilisés pour repérer la consommation de drogue chez l'humain (Wolff et al., 1999) (Toennes et al., 2005). Chez les animaux, l'urine sera difficilement prélevable bien que cette matrice a déjà été analysée en pesticides chez les humains (Mercadante et al., 2019) (Uroz et al., 2001) (Harada et al., 2016) et permet de faire un suivi de la contamination. En effet, l'urine est sécrétée par les reins après filtration du sang. Elle constitue la plus grande part des déchets liquides du métabolisme de l'organisme en éliminant les produits chimiques, soit sous forme native, soit sous forme de métabolites. Les molécules s'y trouvant doivent être solubles dans l'eau.

Les matières fécales sont un déchet de l'organisme tout comme l'urine. Elles sont constituées de substances non absorbées au niveau de l'estomac au moment de la digestion. Les selles sont pour l'essentiel constituées d'eau (75 %) et de déchets biologiques (25 %) tels que des bactéries mortes, des résidus alimentaires non absorbés, des cellules du tube digestif desquamées ou encore des sels biliaires. Certains pesticides persistants ainsi que les retardateurs de flamme ont pu être analysés dans les selles de primates (Wang et al., 2020). De manière non-invasive, cette matrice ne peut pas être prélevée systématiquement chez les individus capturés.

Chez la plupart des espèces d'oiseaux, un autre fluide peut être excrété grâce à l'organe de la glande uropygienne. Elle permet la sécrétion d'une huile permettant à l'oiseau de se toiletter les plumes et de les protéger. Certains polluants lipophiles organiques persistants ont été analysés dans cette glande (Jaspers et al., 2008).

### Matrices solides à l'abandon :

Des matrices solides peuvent être trouvées de manière aléatoire dans l'environnement sans capture de l'espèce. Il sera compliqué de conduire une étude représentative et homogène bien que leur analyse constituerait une sérieuse avancée scientifique. Il faudrait idéalement que les prélèvements soient réguliers comme par exemple tous les ans au sein d'une même localisation.

Parmi ces matrices solides, on peut inclure : la queue ou la mue (pour les reptiles), les coquilles d'œufs (Hidalgo et al., 2021) (Venugopal et al., 2020), les carcasses ou les organes de cadavres trouvés (Graves et al., 2019) (Filigenzi et al., 2019). Les pesticides organochlorés, polychlorobiphényles (PCB) et polybromodiphényléthers (PBDE) ont été quantifiés dans les coquilles d'œufs. Les pelotes de rejections peuvent également être étudiées et permettent de renseigner le régime alimentaire (Love et al., 2000) (Redpath et al., 2001).

### Matrices solides présentes sur l'espèce :

Ces matrices solides incluent les phanères. Il s'agit d'une production épidermique apparente qui peut avoir des fonctions différentes en fonction de l'espèce (protection, aide au déplacement, esthétique, ...). Les phanères sont composés en grande proportion de kératine qui est une protéine fibreuse. Dans cette catégorie, on peut inclure par exemple les ongles, les cheveux, les poils ou les plumes... Ces matrices ont l'avantage de pouvoir être conservées pendant plusieurs années et d'être collectées facilement en quantité supérieure aux autres matrices et de manière souvent peu invasive.

Une fois la fabrication de la plume terminée, l'approvisionnement en sang s'atrophie et la plume devient alors isolée du reste du corps. Il ne peut donc y avoir accumulation des contaminants présents dans le sang que lors de la fabrication. Une plume est composée d'un rachis qui porte les barbes et qui est implanté dans la peau au niveau du calamus (Figure 14). A noter que tous les oiseaux renouvellent tout ou partie de leur plumage une à deux fois par an en fonction des espèces.

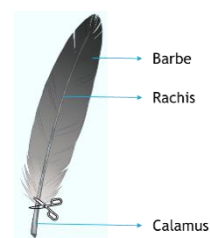


Figure 14 : Schéma des parties de la plume

Certains polluants organiques persistants (Dauwe et al., 2005) (Jaspers et al., 2007) et métaux (Scheifler et al., 2006) (Markowski et al., 2013) ont été analysés dans cette matrice. Il a été prouvé que les concentrations pour ces molécules organiques ne varient pas avec l'âge de la plume où l'apport majeur est donc en interne (Rutkowska et al., 2018). L'apport externe n'est pas à négliger en fonction des classes de molécules qu'il soit dû à l'environnement ou alors par dépôt de la glande uropygienne pour l'entretien du plumage des oiseaux (Jaspers et al., 2008) (Jaspers et al., 2019).

Quant aux cheveux, pour les êtres humains, ils ont une particularité d'avoir une phase de pousse pouvant varier de 1 à 10 ans. Il a été possible de quantifier des molécules dont les pesticides dans les cheveux (Barbounis et al., 2012) (Mercadante et al., 2018) (Schummer et al., 2012).

#### d. Dynamique et comparaison des matrices biologiques expérimentales

Au-delà de l'inventaire des matières biologiques, il est important de visualiser la dynamique des xénobiotiques dans chacune d'elles. Pour ce faire, des études expérimentales ont été réalisées et permettent d'informer sur la distribution dans les différents tissus ainsi que sur la cinétique de dégradation.

Cette distribution au sein de l'organisme dépend de la polarité des tissus organiques et de celle de la molécule. Cette hydrophobicité s'exprime par le coefficient  $K_{ow}$  préalablement décrit. Par exemple, une molécule hydrophile privilégiera le transport par l'eau ou le sang et au contraire une molécule hydrophobe s'accumulera dans les graisses. Cette préférence sera également reliée avec la solubilité aqueuse de la molécule. Ces deux propriétés physico-chimiques fournissent uniquement une tendance mais d'autres facteurs existent et sont plus justes pour décrire ces phénomènes.

Le facteur de bioconcentration (FBC ou BCF en anglais) qui équivaut au rapport de la concentration de la substance mesurée dans l'organisme et sa concentration dans l'eau à l'état d'équilibre lors de son exposition à cette solution aqueuse.

Le facteur de bioaccumulation (FBA ou BAF en anglais), quant à lui, prend en compte toutes les voies d'exposition possibles pour l'organisme y compris sa nourriture non plus seulement son milieu ambiant.

Le troisième et dernier facteur qui existe est celui de la bioamplification. Il désigne l'accumulation et le transfert des produits chimiques par la chaîne alimentaire. La concentration interne de la substance augmente au fur et à mesure que l'on atteint des niveaux élevés de la chaîne trophique.

Quant à la durée de détection dans les différentes matrices biologiques, elle dépend de nombreux facteurs tels que la dose, la voie d'administration, l'usage ponctuel ou chronique, la métabolisation de la molécule ciblée ou encore de la limite de détection de la technique analytique (Vandevenne et al., 2000). En général, les fenêtres de détection chez l'être humain d'une molécule ou d'un de ses métabolites sont les plus longues dans les cheveux, suivies des urines, de la sueur, de la salive et du sang (Verstraete, 2002).

Les azoles, employés en tant que médicament ou pesticides, sont des molécules lipophiles qui auront tendance à s'accumuler dans les organes (Heykants et al., 1989) (Bhagat et al., 2021). Deux publications relèvent l'absorption très rapide du tébuconazole dans le plasma après une administration orale puis une distribution dans les différents tissus (foie, cerveau, rein, muscle) chez la caille du Japon (*Coturnix japonica*) (Gross et al., 2020) et chez le lézard (*Eremis argus*) (Hao et al., 2021). Il en est de même pour Li et al. (2017) qui reportent une concentration maximale dans le plasma en triadiméfon deux heures après l'administration orale. Cette dernière montre également la plus forte concentration dans les autres tissus ayant des phases de dépuración plus tardives que celles du plasma (Figure 15). D'autres publications appuient ces résultats sur les azoles avec leur accumulation au sein du foie (Li et al., 2017) ou du rein (Burkina et al., 2016).

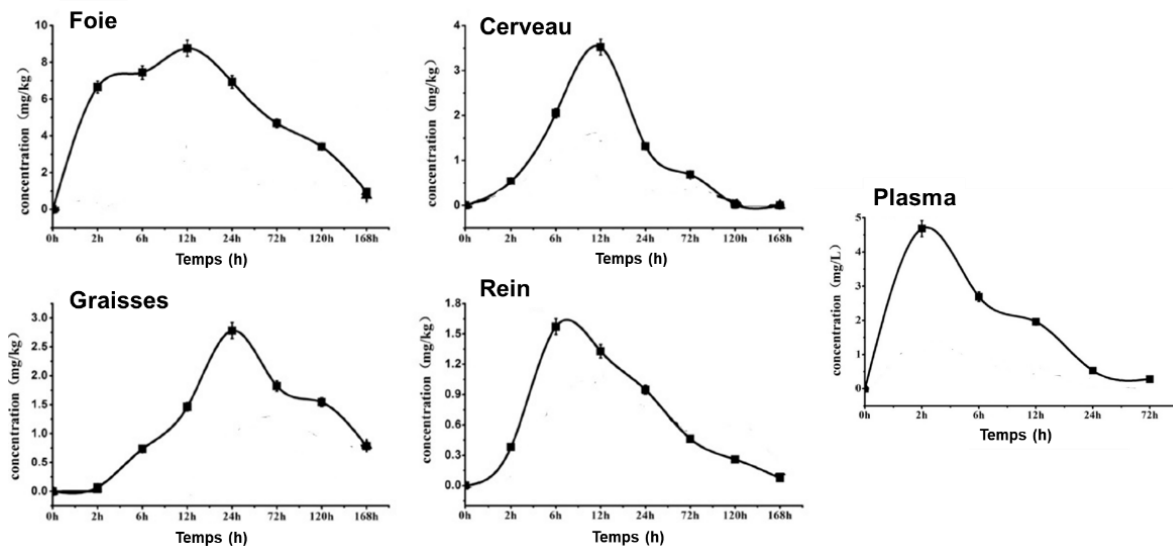


Figure 15 : Cinétique du triadiméfon après administration orale suivie dans le plasma et différents organes chez le lézard (*Eremis argus*) modifié à partir de Li et al. (2017)

Dans une étude sur le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Andreu-Sánchez et al., 2012), la phase d'accumulation du tébuconazole s'observe jusqu'à 30 jours après l'administration puis s'ensuit la phase de dépuraction. Bien qu'il y ait accumulation, la phase d'épuration suit rapidement dès 6 jours après administration. Cette famille de molécule sera donc difficilement bioamplifiable puisqu'excrétée de l'organisme. Une étude environnementale a permis de relever la présence du tébuconazole et de deux de ses métabolites dans l'urine de viticulteurs avant et après l'utilisation de ce produit phytosanitaire sur leurs vignes. Les concentrations sont plus élevées en métabolites dans les urines ce qui prouve la biotransformation de la molécule parente au sein de l'organisme avant d'en être éliminée (Fustinoni et al., 2014). En revanche, aucune étude n'a été réalisée sur la comparaison de distribution des azoles entre les deux matrices plasma et phanères.

Tout comme les azoles, les néonicotinoïdes ont un faible potentiel de bioaccumulation chez les mammifères (Kapoor et al., 2014) avec une dépuraction également de quelques jours pour l'imidaclopride. La concentration maximale plasmatique ou sanguine après administration orale est obtenue après 1 h pour l'imidaclopride (Eng et al., 2021), voire quelques heures pour le thiaméthoxame (Bednarska et al., 2013) et au maximum jusqu'à 12 h (Kapoor et al., 2014) pour l'imidaclopride. En 48 h, le taux d'imidaclopride dans le plasma est revenu à son état initial (Kapoor et al., 2014) (Roy et al., 2020). Les néonicotinoïdes vont être très rapidement excrétés de l'organisme après avoir été transportés dans les différents organes (Figure 16). Après ingestion d'une dose, les composés natifs ainsi que leurs métabolites ont été quantifiés dans différents tissus (plasma, foie, rein, muscle, cerveau, rate) (Roy et al., 2020) (Bean et al., 2019). Dans ces tissus, plus aucune trace d'imidaclopride n'a été quantifiée 24 h après l'exposition.

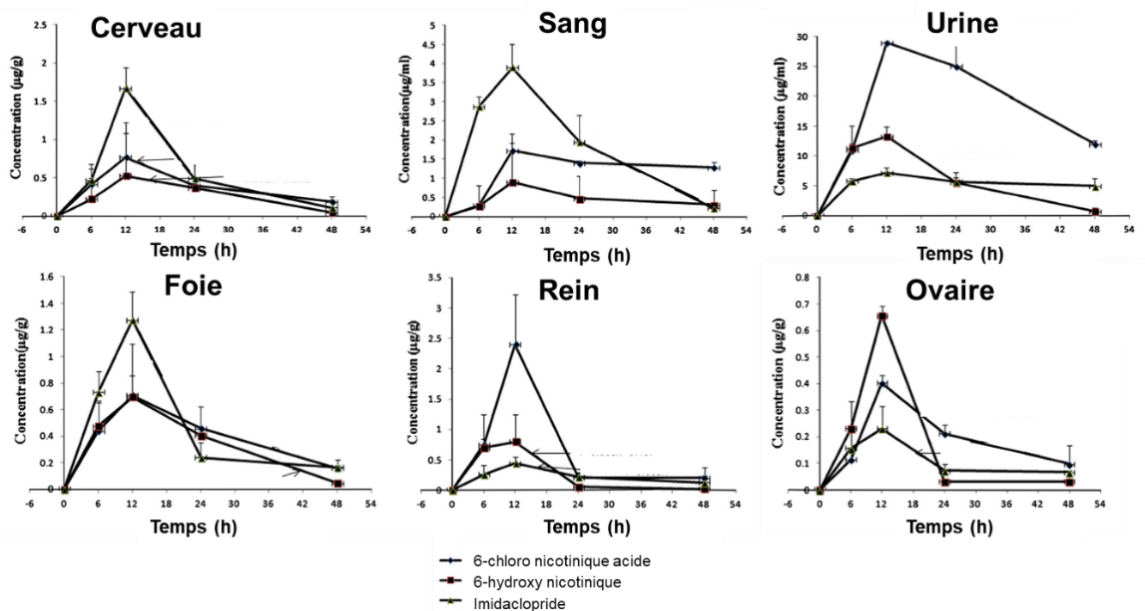


Figure 16 : Cinétique de l'imidaclopride et deux de ses métabolites après administration orale suivie dans le sang, l'urine et différents organes chez le rat femelle modifié à partir de Kapoor et al. (2014)



Les néonicotinoïdes peuvent être excrétés après biotransformation ou encore sans métabolisation en tant que composé parent. L'urine permet ce transfert vers l'extérieur de l'organisme (Ford et Casida, 2006) (Harada et al., 2016), tout comme les fèces où 90 % de la dose préalablement ingérée ont été excrétés dans les 48 heures (Tomizawa et Casida, 2005).

Les concentrations en imidaclopride ont été comparées dans l'urine et dans les poils de rat pendant 6 mois (Kavvalakis et al., 2013). En revanche, cette étude ne permet pas de comprendre la cinétique et l'éventuelle accumulation au sein des poils puisque l'exposition est répétée trois fois par semaine tout au long de l'étude. La concentration dans les poils augmente au cours de l'expérience, ce qui n'est pas le cas dans l'urine. Le parallèle ne peut pas être fait entre la cinétique des poils et des plumes puisque ces dernières n'ont pas une pousse constante comme décrit dans la partie précédente.

Pour conclure, de nombreuses études en laboratoire avec exposition volontaire des espèces aux molécules souhaitées existent. Au vu de la non bioaccumulation des azoles ainsi que des néonicotinoïdes, les méthodes d'analyse devront être sensibles pour les quantifier dans les matrices biologiques des espèces non-cibles sauvages. Il s'agira donc d'un défi majeur de réussir à développer des techniques d'analyse robustes et précises à ces faibles concentrations tout en ayant des quantités disponibles de matrices biologiques prélevées également faibles.

Il est important de retenir que la concentration plasmatique témoignera d'une exposition à très court terme. En revanche, aucune information de cinétique et de distribution n'existe pour ces molécules au sein des plumes bien qu'il s'agirait d'un bon tissu archive qui assurerait une exposition sur le plus long terme. Il semblerait que la concentration plasmatique et celle des plumes soient corrélées pour des pesticides organochlorés, certains PCB mais ne le soient pas pour nombre de substances perfluoroalkylées (PFAS) (Løseth et al., 2019). Il a été prouvé une proportionnalité entre les concentrations en pesticides persistants dans les matrices urine, poil et sang chez le rat avec les doses ingérées (Appenzeller et al., 2017). Mais ces familles de molécules ont des propriétés physico-chimiques bien différentes de celles étudiées dans le cadre de la thèse.

#### e. Occurrence des pesticides étudiés dans les matrices biologiques à provenance environnementale

En conclusion, deux matrices peuvent être retenues puisqu'elles peuvent être prélevées de façon systématique et non-invasive chez des vertébrés sentinelles qui permettront de comprendre l'exposition de l'environnement aux contaminants étudiés. Il s'agit du plasma et des phanères (plumes pour les oiseaux). Le Tableau 8 recense les molécules analysées dans la littérature et les concentrations recensées pour quelques espèces d'oiseaux dans ces deux matrices biologiques à provenance environnementale uniquement pour les néonicotinoïdes puisqu'aucun azole n'a été analysé dans ces matrices à ce jour. Cette recherche bibliographique a donc été élargie aux matrices biologiques : cheveux, qui sont également des phanères et urine chez les humains (Tableau 9). Dans ces deux nouvelles matrices, les azoles ont bien été analysés et détectés. Ces deux tableaux montrent la contamination des espèces non-cibles et appuient le besoin de compléter les concentrations retrouvées en plasma et plumes chez les espèces sentinelles.

Tableau 8 : Concentrations des néonicotinoïdes et leurs métabolites obtenues dans le plasma/sang et plumes de provenance environnementale dans la littérature

Molécules	Plasma/Sang				Plumes			
	Concentration maximale (pg/mL)	Médiane (pg/mL)	% détecté	Références	Concentration maximale (ng/g)	Médiane (ng/g)	% détecté	Références
Acétamipride	-	-	0%	i	1,1 ; 4,86 ; 29,91	< 0,025 ; < 0,025 ; 0,1	35% ; 28% ; 47% a	vi
	< 10 b	< 10 b	33%	ii'	6,17 ; 4,01 ; < 0,1	< 0,1	14,4% ; 35,7% ; 0%	ii''
	3,9	3,85	11%	iii	-	-	0%	vii
	-	-	0%	iv	-	-	-	-
Clothianidine	-	-	0%	i	14,05 ; 15,68 ; 131,41	0,5 ; 0,7 ; 2,37	65% ; 75% ; 86% a	vi
	340 b	< 50 b	60%	ii'	0,58 ; 0,14 ; < 0,3	< 0,3	4 % ; 22,8% ; 0%	ii''
	-	-	0%	iii	-	-	-	-
Dinotéfurane	69,3.10 <sup>6</sup>	-	50%	v	-	-	0%	vii
	-	-	0%	iii	-	-	4,7%	vii
N Imidaclopride	x ; 3280	x ; 3280	0% ; 5%	i	0,82 ; 1,04 ; 15,43	< 0,049 ; < 0,049 ; 0,2	19% ; 33% ; 69% a	vi
	< 50 b	< 50 b	7%	ii'	< 0,6	< 0,6	0%	ii''
	177	16,05	78%	iii	-	-	-	-
	8,9	8,9	10%	iv	-	-	42%	vii
Nitenpyrame	-	-	0%	iii	-	-	0%	vii
Sulfoxaflor	-	-	0%	i	-	-	0%	vii
Thiaclopride	-	-	0%	i	23,63 ; 7,73 ; 8,43	0,21 ; 0,23 ; 0,57	100% ; 95% ; 100% a	vi
	< 10 b	< 10 b	40%	ii'	3,13 ; 1,33 ; < 0,05	0,41 ; < 0,05 ; < 0,05	83,6% ; 100% ; 2%	ii''
	3,1	2,6	11%	iii	-	-	3,1%	vii
	31	23	50%	iv	-	-	-	-
Thiaméthoxame	-	-	0%	i	4,14 ; 15,36 ; 47,47	< 0,094 ; < 0,094 ; 0,15	9% ; 25% ; 41% a	vi
	< 30 b	< 30 b	0%	ii'	< 0,12 ; 0,22 ; < 0,12	< 0,12	0% ; 13,8% ; 0%	ii''
	33,7	10,6	22%	iii	-	-	0%	vii
M 6-Chlornicotinique acide	-	-	0%	iii	-	-	-	-

- : information non communiquée, a : Quantifié au lieu de détecté, b : Concentration massique (pg/g), M : Métabolites des néonicotinoïdes, N : Néonicotinoïdes  
i : (Taliensky-Chamudis et al., 2017) (3 ; 4) sang de Grand-duc d'Europe (*Bubo bubo*), ii' : (Humann-Guillemot et al., 2021) (2 ; 4) plasma de Martinet alpin (*Tachymarptis melba*), ii'' : (Humann-Guillemot et al., 2021) (2 ; 4) chouette effrai (*Tyto alba*), iii : (Hao et al., 2018, 2016) plasma de Bruant à couronne blanche (*Zonotrichia leucophrys*), iv : (Byholm et al., 2018) sang de Bondré apivore (*Pernis apivorus*), v : (Lennon et al., 2020b) (4) sang de différentes espèces d'oiseaux, vi : (Humann-Guillemot et al., 2019) (4) moineau domestique (*Passer domesticus*), vii : (Graves et al., 2019) Colibri à gorge noire (*Archilochus alexandri*) et Colibri d'Anna (*Calypte anna*)

1 : Urbain, 2 : Rural, 3 : Forêt, 4 : Grandes cultures, 5 : Vignes, 6 : Légumes, 7 : Riz, 8 : Fruits, 9 : Prairie, 10 : Haies \* : France

Tableau 9 : Concentrations des azoles, néonicotinoïdes et leurs métabolites obtenues dans les cheveux et urine de provenance environnementale dans la littérature

Molécules	Cheveux humains				Urine			
	Concentration maximale (ng/g)	Médiane (ng/g)	% détecté	Références	Concentration maximale (µg/L)	Médiane (µg/L)	% détecté	Références
Azaconazole					< 0,014	< 0,014	0%	ix
Bitertanol	< 0,113	< 0,113	24%	i				
	-	-	0%	ii				
Bromuconazole					< 0,257	< 0,257	0%	ix
Cyproconazole	15,6	15,6	3%	iii				
	0,3 ; 0,47	< 0,3	1% ; 2%	ii	< 0,011	< 0,011	0%	ix
Difénoconazole	2,90 ; 10,6	0,21 ; 0,26	92% ; 97%	ii				
	4,0 ; -	2,8 ; -	12% ; 0%	iv	< 0,252	< 0,252	0%	ix
Diniconazole					< 0,147	< 0,147	0%	ix
Epoxiconazole	110	19,9	18%	iii				
	-	-	0%	ii				
Fenbuconazole	1,48 ; 2,83	< 0,13	2% ; 10%	ii	< 0,043	< 0,043	0%	ix
Fluquinconazole					< 0,044	< 0,044	0%	ix
Flusilazole	< LD	-	5%	iii				
	0,66 ; 5,9	< 0,02	12% ; 33%	ii	< 0,031	< 0,031	0%	ix
Flutriafol								
Hexaconazole					< 0,1	< 0,1	0%	ix
	-	< 0,486	26%	i				
Imazalil	1,48 ; 10,2	< 0,41	1% ; 11%	ii	< 0,461	< 0,461	0%	ix
	102,8 ; 15	7,6 ; 8,6	31% ; 40%	v				
Iponazole								
Metconazole								
Myclobutanil	-	< 0,015	26%	i				
	< 0,08 ; 1,33	< 0,08	0% ; 11%	ii				
	5,12	2,56	15%	iii				
	-	29,5	100%	iv				
Penconazole					< 0,316	< 0,316	0%	ix
	83,7 ; 3,1	23,7 ; 2,6	100%	v				

Chapitre 1 : Bibliographie

	-	-	0%	ii				
Prochloraze	-	< 0,028	16%	i	< 0,058	< 0,058	0%	ix
	2,10 ; 2,58	0,1 ; 0,23	61% ; 80%	ii				
Propiconazole	x	0,67	71%	i	< 0,092	< 0,092	0%	ix
	4,04 ; 5,74	< 0,22	22% ; 29%	ii				
Prothioconazole	-	144	100%	iv				
	2,22	-	15%	iii	13,5	-	-	x
Tébuconazole	245,2 ; 4,5	141,3 ; 1,4	90% ; 100%	v				
	-	< 0,086	47%	i	< 0,018	< 0,018	0%	ix
	5,55 ; 22,8	< 0,14 ; 0,87	29% ; 83%	ii				
Tétraconazole	-	-	0%	ii	< 0,08	< 0,08	0%	ix
Triadiméfon					< 0,334	< 0,334	0%	ix
Triadiménol	3 ; 18,3	< 0,91	1% ; 5%	ii	< 0,084	< 0,084	0%	ix
Triticonazole								
Triflumizole					< 0,244	< 0,244	0%	ix
	236,5 ; 69	25,2 ; 7,8	61% ; 38%	vi				
Acétamipride	31,8 ; 19,6	0,11 ; 0,10	75% ; 76%	ii	< 0,30	< 0,30	0%	xi
	0,069 ; 0,055 ; 0,07	0,025 ; 0,019 ; 0,023 b	13% ; 13% ; 14%	vii				
	0,69 ; 0,84	< 0,38	2% ; 1%	ii				
Clothianidine	0,333 ; 0,532 ; 6,72	0,102 ; 0,088 ; 0,261 b	23% ; 48% ; 65%	vii				
					2,39	< 0,20	40%	xi
Dinotéfurane	-	-	0%	ii				
	637,6 ; 1133,6	36,5 ; 22,3	96% ; 80%	vi				
	270	30	65.60%	viii				
	-	< 15	0%	iv				
Imidaclopride	-	< 0,049	43%	i				
	13,8 ; 20,7	1,20 ; 1,43	99% ; 98%	ii				
	0,630 ; 0,242 ; 341,4	0,155 ; 0,134 ; 0,388 b	65% ; 26% ; 89%	vii	3,90	0,11	65%	xi
	37,2 ; -	37,2 ; -	6% ; 0%	v				
	0,01 ; 0,08	< 0,01	2% ; 8%	ii	< 0,03	< 0,03	0%	xi
Thiaclopride	0,011 ; 0,009 ; 0,02	0,011 ; 0,009 ; 0,011 b	7% ; 3% ; 32%	vii	< 0,036	< 0,036	0%	ix
	4,4 ; -	2,8 ; -	12% ; 0%	v				
Thiaméthoxame	4,61 ; 0,69	0,19 ; < 0,09	58% ; 23%	ii				
	0,247 ; 0,080 ; 129,28	0,102 ; 0,080 ; 0,705 b	13% ; 3% ; 70%	vii				
M	6-Chlornicotinique acide				7,2	1,8 b	100%	xii
	Acétamipride N desmethyl				1,56	< 0,20	5%	xi

2-chloro-1,3-thiazole-5-  
 carboxylique acide  
 Furoïque-3 acide

0,1	0,1	20%	xii
14,5	2,6 b	100%	xii

- : information non communiquée, A : Azoles, a : Quantifié au lieu de détecté, b - Moyenne au lieu de médiane, M : Métabolites des néonicotinoïdes, N : néonicotinoïdes

i : (Béranger et al., 2020) (1-5) \*, ii : (Peng et al., 2020) (1), iii : (Schummer et al., 2012) (4 ; 5), iv : (Polledri et al., 2020) (4 ; 2 ; 1), v : (Polledri et al., 2019) (Mercadante et al., 2018) (5 ; 1), vi : (Lehmann et al., 2018b) (4 ; 1), vii : (Bonmatin et al., 2021) (6 ; 7 ; 8), viii : (Kavvalakis et al., 2013) (1 ; 2 ; 4), ix : (Cazorla-Reyes et al., 2011) (4), x : (Fustinoni et al., 2014) (5), xi : (López-Gálvez et al., 2020) (5), xii : (Nomura et al., 2013) (8)

1 : Urbain, 2 : Rural, 3 : Forêt, 4 : Grandes cultures, 5 : Vignes, 6 : Légumes, 7 : Riz, 8 : Fruits, 9 : Prairie, 10 : Haies, \* : France

## f. Espèces vertébrées bio indicatrices présentes en région Nouvelle-Aquitaine

Les travaux de thèse se focaliseront sur les vertébrés pour plusieurs raisons. Tout d’abord, étant plus élevés dans la chaîne trophique, les contaminants pourraient éventuellement plus s’y accumuler. De plus, plusieurs espèces de vertébrés habitent en région Nouvelle-Aquitaine dans des milieux d’intérêt tels que des agroécosystèmes et peuvent être bio indicatrices du milieu. Enfin, plusieurs espèces de ces vertébrés dont les oiseaux sont en fort déclin (Ceballos et al., 2015) et les pesticides sont souvent avancés comme étant une cause potentielle (Reif et Hanzelka, 2020) (Van Lexmond et al., 2015) (Millot et al., 2017) (Mineau et Whiteside, 2013). L’état des lieux de la contamination des azoles n’a pas été encore étudié dans ces espèces et est peu fourni pour les néonicotinoïdes d’où leur intérêt pour ces travaux de thèse.

Ces espèces ont chacune des cycles de vie distincts qu’il est important de mentionner pour mieux appréhender les résultats par la suite.

Parmi les oiseaux (possédant un bec sans dents, des plumes, deux pattes et deux ailes et qui pondent des œufs : ovipare) vivant en région Nouvelle-Aquitaine : les goélands, les cigognes blanches et certaines espèces de passereaux (LPO, 2012) seront étudiés. Les oiseaux peuvent être des espèces sentinelles de certains milieux et présentent de nombreux avantages en tant que bio indicateurs (Fair et al., 2010) (Francis, 2017). Elles sont des espèces facilement observables dans l’environnement avec des occupations largement distribuées dans différents types d’habitat. De plus, étant près du sommet de la chaîne alimentaire, ils sont sensibles aux changements. Ces derniers peuvent être aisément observés puisque les connaissances de leur cycle de vie sont étoffées.

Trois espèces de goélands sont présentes en région Nouvelle-Aquitaine (Figure 17) et sont notamment capturables (adultes et poussins) dans la Réserve Nationale du Lilleau des Niges, sur l’Île de Ré pendant la saison de reproduction entre mai et juillet.

s



Figure 17 : Photographies des différentes espèces de goélands présentes en région Nouvelle-Aquitaine

Les données présentes dans cette thèse sur les goélands sont issues d'une collaboration entre le Centre d'Etude Biologiques de Chizé (CNRS - La Rochelle Université) et par la Ligue pour la Protection des Oiseaux (LPO), qui gère la réserve du Lilleau des Niges. Durant la reproduction, les zones de prospection alimentaires couvrent le littoral, la haute mer, les zones d'enfouissement de déchets et les zones agricoles. Ces informations ont été générées à l'aide de balises GPS (Global Positioning System) placées sur certains individus de cette colonie. Le goéland marin (*Larus marinus*) est un oiseau principalement piscivore (Buckley, 1990) et donc plus spécialistes de proies marines alors que le goéland brun (*Larus fuscus*) et argenté (*Larus argentatus*) sont plus des espèces opportunistes ayant des proies généralistes (Hobson, 1999). Les goélands marins, très prédateurs peuvent aussi s'alimenter de charognes, de mammifères, d'œufs, de poussins ou d'oiseaux adultes, y compris des deux autres goélands présents sur la réserve. Les goélands marins sont donc de plus haut niveau trophique que les deux autres espèces (Binkowski et al., 2021).

Les adultes reproducteurs sont capturés sur leur nid à l'aide d'une cage-piège placée sur le nid et dont la porte se referme lorsque l'oiseau vient couvrir ses œufs. Le dispositif de capture est observé à distance et l'oiseau est extrait rapidement de la cage-piège dès la fermeture de la porte. Les poussins qui sont non-volants au moment de l'étude sont capturés à la main. La procédure est légère et rapide où une seule prise de sang de 2,5 mL d'une durée de deux minutes maximum est réalisée. Quelques plumes sont également prélevées sachant qu'une mue a lieu avec un remplacement de l'ensemble des plumes à la fin de l'été et de l'automne (Harris, 1971). Pendant le prélèvement l'oiseau sera doté d'une cagoule sur la tête, ce qui est un moyen établi pour réduire le stress des oiseaux. Les oiseaux sont bagués, mesurés, pesés, puis relâchés (Sebastiano et al., 2021).

Ces oiseaux sont particulièrement sensibles à la pollution au vu de leur place en haut du réseau trophique. Ils sont déjà connus pour être des bio moniteurs pertinents pour évaluer l'exposition aux polluants organiques persistants (POP) (Shlosberg et al., 2011) les éléments traces certains métaux (Burger et Gochfeld, 2004) ou plus spécifiques aux PFAS, en région Nouvelle-Aquitaine, notamment (Sebastiano et al., 2021). Aucune donnée sur la présence des azoles et des néonicotinoïdes n'était disponible chez les goélands et les oiseaux marins en général avant cette thèse.

Les cigognes blanches (*Ciconia ciconia*) (Figure 18) sont capturables et peuvent être baguées durant la période de reproduction qui s'étend de mai à juin. La Figure 19 retrace les principales étapes de formation des plumes et les moments possibles de capture en fonction des périodes de ponte. Les poussins peuvent être directement capturés dans le nid mais il est plus difficile de le réaliser pour les adultes de par leur méfiance. Durant cette période de reproduction, la zone de prospection de nourriture s'étend dans un rayon maximal de 5 km autour du nid. Elles ont été étudiées par précédentes observations des individus bagués ainsi que le suivi de balises GPS. Quant au régime alimentaire des cigognes blanches, il a été identifié en regardant leurs pelotes de réjection (Barbraud et Barbraud, 1997) (Barbraud et al., 2002). Elles se nourrissent essentiellement d'invertébrés aquatiques à savoir des écrevisses rouges de Louisiane présentes en France, des larves et adultes de coléoptères aquatiques ou encore des orthoptères (tels que les criquets, les sauterelles ou les grillons). Le taux de mercure a été étudié dans les œufs de cigognes noires (*Ciconia negra*) (Kucharska et al., 2021). Aucune donnée sur la présence des azoles et des néonicotinoïdes n'était disponible chez les cigognes blanches avant cette thèse.

### Cigognes blanches *Ciconia ciconia*



© Remi Rufer

Figure 18 : Photographie de l'espèce cigogne blanche présente en région Nouvelle-Aquitaine

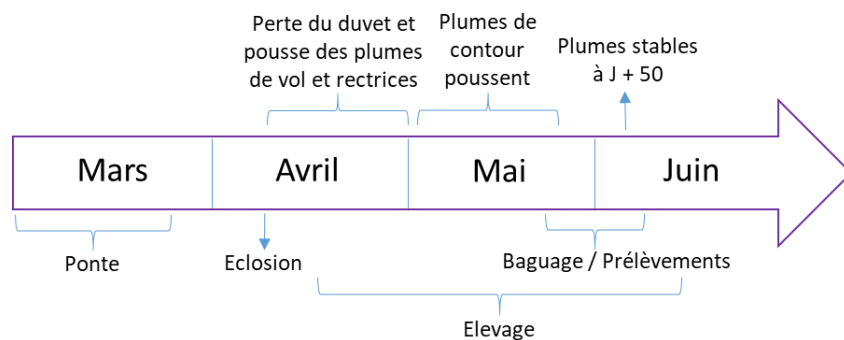


Figure 19 : Période de reproduction des cigognes blanches ainsi que le calendrier de pousse des plumes



Au sein des oiseaux, les passereaux/les passériformes généralement de petite taille dotés d'un syrinx très développé leur permettant de réaliser des vocalises sont également présents en région Nouvelle-Aquitaine avec notamment le merle noir et la mésange charbonnière (Figure 20). Ces espèces ont l'avantage d'être des espèces ubiquistes pouvant se trouver dans différents milieux d'où leur intérêt à être étudiées (Mohring et al., 2021).

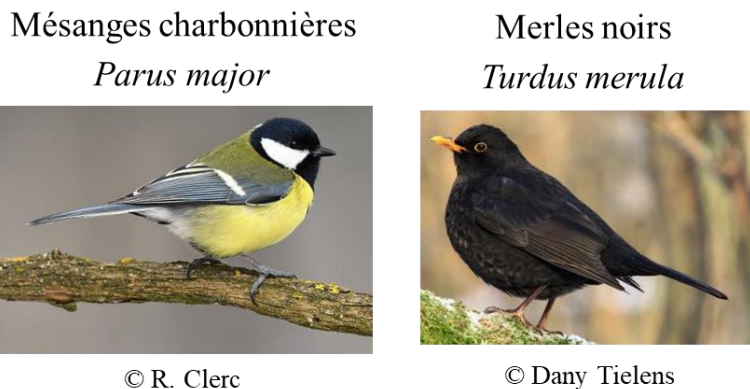


Figure 20 : Photographie de deux espèces de passereaux présentes en région Nouvelle-Aquitaine

Les merles noirs (*Turdus merula*) sont également capturables et bagués pendant leur période de reproduction au printemps. Les oiseaux sont capturés au filet. Les merleaux commencent à voler au bout de 15 jours et pourront donc être capturés aussi bien que les adultes à partir du mois de mai. Ils sont considérés juvéniles pendant l'année de leur éclosion. Ils possèdent un plumage moins foncé que celui des adultes qui pousse vers juin-juillet. C'est au cours des mois d'août et octobre qu'ils perdent leur plumage juvénile pour laisser place à un plumage plus noir pour les mâles et plus marron pour les femelles. Il est omnivore, pouvant se nourrir aussi bien d'insectes (Fritsch et al., 2012), de vers de terre que de graines ou de fruits. Ceci a été observé en analysant l'intérieur de l'estomac de carcasses de merles. La zone de prospection et d'habitat est de l'ordre du kilomètre. Cette espèce a été examinée pour l'accumulation des contaminants comme les métaux (Scheifler et al., 2006) (Fritsch et al., 2012).

La mésange charbonnière (*Parus major*) est un passereau plus petit que le merle noir. Les mois de reproduction sont identiques à ceux des merles noirs avec une deuxième couvée plus tardive ayant lieu aux mois de juin/juillet. Les mésanges sont également omnivores bien qu'insectivores plutôt au printemps et été, ainsi que végétariennes en automne et au printemps. Leur zone de prospection peut aller jusqu'au km. Les perfluoroalkyles acides (PFAA) inclus dans la famille des PFAS ont été analysés et quantifiés dans les œufs de mésanges (Lasters et al., 2019) (Lasters et al., 2021) ainsi que dans le sang et les plumes (Groffen et al., 2020). Les pesticides organochlorés ont été quantifiés dans leur graisse (Alleva et al., 2006) et les métaux lourds dans le sang (Bauerová et al., 2020). Dans le cadre de l'étude, les adultes sont capturés au filet et les poussins directement dans leur nichoir.

Pour ces deux passereaux, aucune donnée sur la présence des azoles et des néonicotinoïdes n'était disponible avant cette thèse.

Ensuite, parmi les amphibiens (animaux qui ont une vie aquatique puis terrestre après une étape de métamorphose) vivant en région Nouvelle-Aquitaine sont recensés les crapauds ou plus précisément l'espèce crapaud épineux (*Bufo spinosus*) (Figure 21).

Crapaud épineux  
*Bufo spinosus*



© Philippe Jourde

Figure 21 : Photographie du crapaud épineux

Son cycle de vie subit des changements de mécanismes en fonction de la température extérieure. Tout d'abord, vers les mois de février/mars, ils se reproduisent dans des pièces d'eau. C'est sur ces sites de ponte qu'ils seront plus facilement capturables et en grand nombre. Puis, pendant le reste de l'année, il rejoint les terres avec une zone d'habitation vers les lisières, forêts et fossés au printemps. Ils peuvent parcourir jusqu'à 2 à 5 km entre ces différents milieux. Puis, en raison de températures estivales trop élevées leur mécanisme ralentit puis redevient plus actif aux mois de septembre, d'octobre et de novembre avec l'arrivée de l'humidité. Les températures hivernales entraînent un deuxième ralentissement pour cette espèce. Le régime alimentaire des crapauds épineux est très proche de celui des merles noirs et des mésanges charbonnières avec néanmoins un mécanisme plus lent. Aucune littérature mentionne l'analyse des pesticides dans les tissus de cette espèce à l'échelle environnementale. En revanche, elle a déjà été étudiée à l'échelle d'expérience en laboratoire (Cheron et al. 2020).

De manière générale et de façon à ne pas bousculer leur habitude de vie, l'échantillonnage sur ces différentes espèces n'est pas possible en tout temps. En effet, les individus sont stables géographiquement et capturables plutôt lors de leur période de reproduction. Idéalement, la probabilité que chaque individu soit sélectionné dans la zone définie doit être la même. Le nombre d'individus doit alors être élevé ou alors équilibré (mâle, femelle) de façon à être représentatif de l'ensemble de la population sur ce même site ou en adéquation avec les objectifs de l'étude. Ensuite, pour une même espèce, des habitats pourront être comparés au sein de la région Nouvelle-Aquitaine.

## 5. Echantillonnage jusqu'à l'analyse des pesticides

Le défi est d'être capable d'analyser les pesticides présents le plus souvent à l'état de traces et dans des matrices complexes (biologiques ou environnementales). Le développement de méthodes analytiques performantes, justes et robustes s'inscrit dès les étapes d'échantillonnages. S'ensuit les étapes de préparation des échantillons qui sont également cruciales. Et pour finir, les techniques d'analyse employées dans la littérature seront exposées.

### a. Techniques d'échantillonnage

#### i. Présentation des méthodes

Il existe différentes méthodes d'échantillonnage suivies éventuellement de l'analyse in-situ :

- Discontinue (souvent manuelle),
- Semi continue,
- Continue et automatique,
- En temps réel.

L'idéal serait d'avoir une information en temps réel prenant en compte les diverses variations éventuelles. Dans le cadre d'analyses chimiques telles que l'analyse des pesticides, la technologie actuelle ne permet pas un suivi en temps réel. En effet, les temps de préparation d'échantillon et d'analyse sont chronophages. Il est alors important de planifier, structurer son plan d'échantillonnage tant sur les lieux que les dates de façon à avoir des données représentatives de ce qu'il se passe en temps réel sur le terrain (Figure 22). Il ne faudrait pas conduire à une image faussée de la contamination du milieu qu'elle soit sous ou sur estimée.

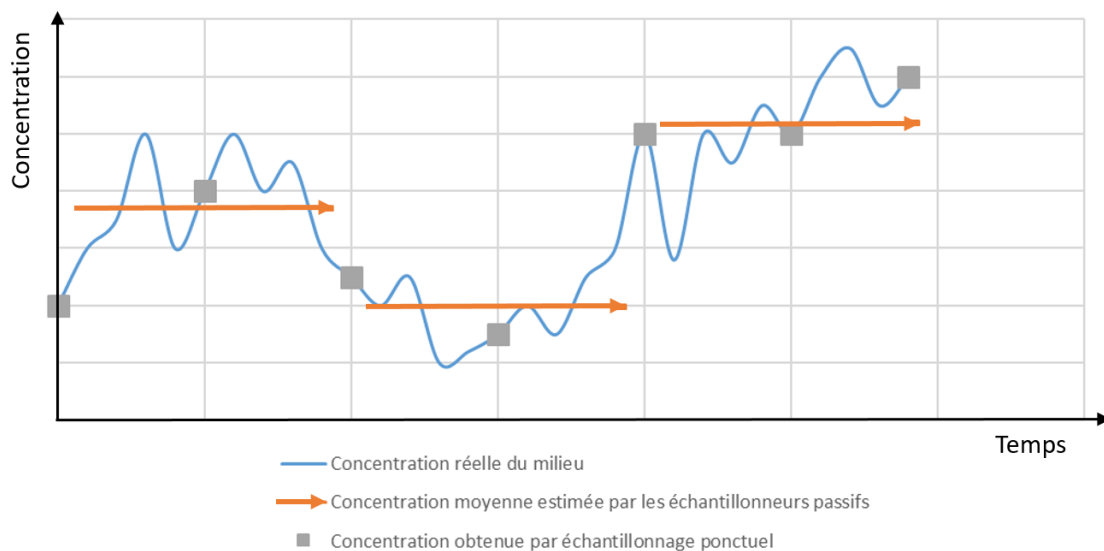


Figure 22 : Concentration réelle du milieu, échantillonnage passif, échantillonnage ponctuel

L'échantillonnage le plus classique et le plus employé actuellement est l'échantillonnage ponctuel dit actif. La matrice à analyser est prélevée à un instant T et l'analyse correspondante témoignera de la concentration à cette date précise en ce lieu précis.

L'échantillon peut également être concentré avec accumulation in-situ soit par phénomène adsorption ou absorption que l'on appelle alors échantillonnage passif. Dans ce cas-là, le temps où le matériau de piégeage est laissé dans le milieu à l'étude est une information importante. Une fois placé dans le milieu, les molécules sont accumulées jusqu'à ce que les concentrations entre le milieu et l'outil soient à l'équilibre selon les lois de diffusion de Fick. La vision obtenue sera alors plus globale sur la durée d'exposition à condition que la durée d'exposition soit suffisante (Mayer et al., 2003) (Figure 23).

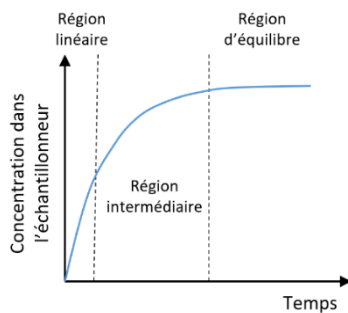


Figure 23 : Profil d'accumulation d'une molécule dans un échantillonneur passif

Ces outils ont été déployés dans les milieux aquatiques pour accumuler les composés organiques avec des membranes : SPMD (Semi-Permeable Membrane Devices) qui concernent plutôt les composés non polaires avec  $\log K_{ow}$  supérieurs à 3 (Karacik et al., 2013) (Verweij et al., 2004) ou encore les POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) pour les contaminants polaires avec un  $\log K_{ow}$  compris entre 0 et 3 (Vrana et al., 2005) (Alvarez et al., 2004).

### ii. Prélèvement du compartiment air

Pour le compartiment air, des matériaux adsorbants peuvent être installés dans le milieu étudié pour y accumuler les contaminants atmosphériques sous forme d'échantillonnage passif. Parmi eux, les mousses en polyuréthane (PUF pour PolyUrethane Foam) sont les plus employées (Chaemfa et al., 2008). Elles sont faciles à préparer, à prendre en main, à exposer et sont également peu coûteuses. Les disques PUF (14 cm diamètre et 1,35 cm d'épaisseur) sont installés entre deux soucoupes métalliques suspendues en hauteur maximale de 5 mètres (Tuduri et al., 2006) (Figure 24). Elles permettent de protéger du dépôt d'éventuelles particules, du rayonnement ultraviolet (lumière du soleil), des précipitations et de minimiser l'effet de la vitesse du vent sur l'adsorption tout en laissant passer un flux d'air dans la chambre (Seethapathy et al., 2008).

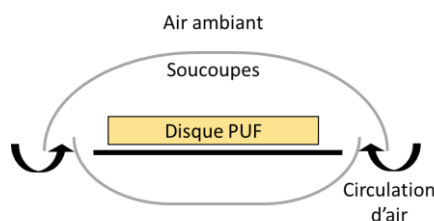


Figure 24 : Design d'un échantillonnage passif d'un disque à mousse PUF

L'exploitation des résultats est qualitative : absence ou présence de certains polluants atmosphériques. Elle peut être quantitative si l'on raisonne en concentration par mousses PUF ou encore en  $\text{m}^3$  d'air échantillonné.

Des composés PRC (Performance Reference Compounds) appelés également DC (Depuration Compounds) peuvent être ajoutés sur la mousse PUF avant le déploiement sur site à une concentration connue (Pozo et al., 2006). Ces substances, non présentes dans le milieu à échantillonner sont généralement des isotopes, doivent être de famille semblable aux composés cibles. Puis, au fur et à mesure de la capture des nouvelles molécules cibles sur la phase, les PRC se désorbent. A partir des constantes de désorption de ces PRC, des concentrations corrigées et plus fiables pour les molécules échantillonnées et analysées sont alors fournies prenant en compte les mêmes conditions environnementales (Tuduri et al., 2006).

Il est également possible de calculer un taux d'échantillonnage, appelé  $R_s$ , qui peut être soit déterminé dans des conditions contrôlées au sein de chambres atmosphériques soit directement sur le terrain. C'est cette deuxième option, plus facile à mettre en place qui a été sélectionnée par Chaemfa et al. (2008). Les  $R_s$  obtenus varient entre 2 et  $5 \text{ m}^3/\text{j}$  pour le suivi de PCB et pesticides organochlorés après exposition de 2 à 8 semaines. Ces résultats sont comparables avec la littérature :  $3,5 \text{ m}^3/\text{j}$  (Shoeib et Harner, 2002) pour les PCB,  $3,8$  à  $5,2 \text{ m}^3/\text{j}$  (Tuduri et al., 2006) pour les PCB également, pour le tébuconazole :  $5,82 \text{ m}^3/\text{j}$  (Lévy et al., 2020) ou encore essentiellement compris entre 1 et  $8 \text{ m}^3/\text{j}$  (Pozo et al., 2006) pour les polluants organiques de familles diverses.

## b. Technique d'extraction et de purification des matrices solides et liquides

La préparation de l'échantillon joue un rôle crucial dans la chaîne analytique. La plupart des matrices ne sont pas analysables directement par les machines analytiques. Il est alors important d'extraire, d'isoler les analytes cibles voire de purifier l'extrait pour obtenir une meilleure sensibilité. Les techniques varient en fonction de la forme de l'échantillon solide ou liquide.

### i. Des matrices solides

Pour les matrices solides (telles que le sol, les plumes ou les mousses PUF), diverses techniques d'extraction existent. Elles permettent de passer les molécules d'intérêt initialement adsorbées/absorbées dans cette phase solide en phase liquide. Différents mécanismes permettent de favoriser cette extraction en fonction du solvant choisi sous l'action de chauffage, d'une pression, d'ondes (micro-ondes, ultrasons) ou encore d'agitation. Les premières techniques de référence à apparaître étaient l'extraction liquide/solide sous agitation ainsi que l'extraction par Soxhlet (Ganzler et al., 1986). Il s'agit néanmoins de techniques consommatrices de temps et de solvant. Par conséquent, d'autres techniques ont été développées par la suite et vont être décrites ci-après.

Lors des étapes d'optimisation, le solvant doit être judicieusement sélectionné ainsi que son volume. Le temps et la température d'extraction peuvent également être optimisés (Sun et Lee, 2003) tout comme le nombre de cycles.

### Extraction Assistée par Micro-ondes (MAE) :

C'est en 1986 que cette technique a été employée pour la première fois pour l'extraction de composés organiques (Ganzler et al., 1986). Ce sont les micro-ondes, des ondes électromagnétiques, qui permettent l'agitation des molécules et donc une augmentation de la température. Le transfert de chaleur est alors inversé (intérieur du récipient vers l'extérieur) à celui du transfert classique (extérieur vers intérieur). Comme le transfert se fait par conduction, le solvant doit absolument être polaire. On cite parmi eux l'acétone, l'eau, le méthanol qui ont prouvé leur efficacité pour l'extraction des pesticides dans des matrices solides (Carvalho et al., 2008) (Zhang et al., 2012).

### Extraction accélérée par ultrasons (US) :

Il s'agit d'une onde mécanique de fréquence entre 16 et 10 000 kHz qui se propage aussi bien au travers de supports solides que des fluides liquides. La puissance de l'ultrason peut être optimisée (Musatadi et al., 2020). Ces ondes très énergétiques engendrent des cycles alternés de haute et basse pression et créent ensuite des phénomènes de cavitation acoustique. Ces bulles implosent à la surface des particules solides (échantillon) en raison des différences locales de pressions et températures et permettent le relargage vers le solvant d'extraction. Elle a été employée pour extraire l'imidaclopride des cheveux (Kavvalakis et al., 2013) ou encore les azoles dans des tissus de lézards (Li et al., 2017). Elle peut également être couplée à des techniques de purification décrites par la suite (Mitchell et al., 2017) (Kammoun et al., 2019).

### Extraction par Solvant Accélérée (ASE) :

L'ASE, également appelée Extraction par Liquide/Fluide Pressurisé (PLE ou PFE), repose sur l'extraction par un solvant placé à haute température et pression pour le maintenir à l'état liquide. L'échantillon solide est déposé dans la cellule en acier inoxydable (Richter et Raynie, 2012) ayant un volume pouvant aller de 1 à 100 mL. Cette extraction est automatisée par un robot. C'est cette technique d'extraction qui est généralement employée pour extraire les pesticides piégés dans les mousses PUF (Coscollà et al., 2010). D'autres matrices solides ont pu être extraites et analysées en pesticides comme les sols, les sédiments ou les boues (Masiá et al., 2015).

### Extraction Dispersive Energisée Guidée (EDGE) :

Il s'agit d'une technologie semblable à l'ASE qui utilise également un chauffage et une enceinte mise sous pression. Elle diffère néanmoins sur les matériaux et mécanismes déployés. La cellule, appelée Q-Cup, est en aluminium permettant de conduire la chaleur émise à l'extérieur. Le solvant est ajouté dans la cellule mais également à sa surface qui engendre une augmentation de la pression une fois chauffé. Cette technique a été appliquée pour l'extraction des pesticides dans : le cannabis (CEM, 2019a), les légumes (CEM, 2019b) et les épices (CEM, 2019c). Il s'agit uniquement de brochures publiées par le fabricant puisque cette technologie est récente avec peu de littérature la mentionnant.

*ii. Des matrices liquides*

Parmi les matrices liquides (Nasiri et al., 2020) sont également inclus les extraits préalablement préparés via les techniques d'extraction précédemment décrites. Les techniques ci-dessous peuvent aussi être des étapes de purification ou encore de changement de solvant.

L'extraction liquide-liquide (ELL) est la plus traditionnelle des techniques avec l'utilisation d'un solvant dans lequel les analytes d'intérêt ont une bonne affinité. Sous l'action d'agitation, les zones d'échanges peuvent être augmentées.

L'extraction sur phase solide (SPE ou Solid Phase Extraction en anglais) permet non seulement d'extraire les composés d'une matrice liquide, de purifier mais permet également de concentrer l'extrait dans un volume de reprise plus faible que le volume d'échantillon initialement prélevé. L'échantillon est déposé sur une cartouche qui va permettre de retenir les molécules d'intérêt. Puis, à l'aide d'un solvant organique, ces molécules accrochées vont être éluées. Le volume de chargement sur la cartouche, la chimie de la phase adsorbante ainsi que le solvant d'éluion sont des paramètres pouvant influencer l'efficacité de l'extraction. Plusieurs types d'adsorbants peuvent être employés tels que : les phases hydrophobes C18 qui vont retenir les composés hydrophobes dit apolaires ou alors les phases Oasis HLB (Hydrophobic Lipophilic Balance) qui sont plus largement employées pour les pesticides (Dujakovic et al., 2010) (Herrero-Hernández et al., 2013). En effet, ces dernières, étant composées d'un copolymère de divinylbenzène (lipophile) et vinylpyrrolidone (hydrophile), permettent une rétention de molécules à polarité variable.

On appelle SPE hors-ligne (« off line » en anglais) lorsque ces extractions sont réalisées manuellement par un opérateur ou en ligne (« on line » en anglais) lorsque l'extraction est automatisée avec un module placé en amont de l'appareil analytique.

Une autre technique récente a vu le jour : la méthode QuEChERS qui signifie Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe en anglais. Des matrices solides ou liquides voire des extraits peuvent être purifiés selon cette technique. Un solvant d'extraction ainsi que différents réactifs (sels, tampons, ...) sont ajoutés selon les besoins en enchaînant des étapes d'agitation et de centrifugation. Ces étapes d'ajout de réactifs sont appelées des dSPE pour dispersive Solid Phase Extraction en anglais. Cette technique QuEChERS a initialement été employée pour extraire les pesticides dans les aliments (Lehotay, 2011) puis a été appliquée à différentes matrices comme le sang (Taliensky-Chamudis et al., 2017), les plumes (Humann-Guillemot et al., 2019) ainsi que pour la purification d'extraits de cheveux (Lehmann et al., 2018b), de foies (Turaga et al., 2016).

D'autres techniques sont largement employées pour extraire les pesticides mais ne seront pas développées amplement ici telles que le Stir-Bar Sorptive Extraction (SBSE) appliquées sur les matrices eau (Pérez-Carrera et al., 2007) ou sédiment (Pinto et al., 2013), la Micro-Extraction sur Phase Solide (SPME) qui a été utilisée sur les matrices vin (Zambonin et al., 2002) ou cheveux (Schummer et al., 2012).

### c. Techniques d'analyse

Une fois les extraits préparés, ils peuvent être injectés dans l'appareil adéquat. Les différentes molécules doivent être séparées pour être ensuite détectées puis quantifiées. Lorsque l'extrait est injecté directement au sein de l'appareil analytique, sans passer par un module de purification installé en ligne en amont, il s'agit de l'injection directe (ID).

#### Séparation :

La chromatographie permet la séparation des constituants d'un mélange selon leurs propriétés physico-chimiques. Les molécules sont entraînées au moyen d'une phase mobile le long d'une phase stationnaire. Différentes interactions peuvent avoir lieu entre les trois entités : soluté, phase mobile et phase stationnaire. Plus le soluté aura d'affinités avec la phase stationnaire, plus il sera retenu et donc moins il sera entraîné par la phase mobile.

Si le transport de cette molécule est réalisé par un gaz vecteur qui constitue la phase mobile, il s'agit alors de la chromatographie en phase gazeuse (GC pour l'anglais Gas Chromatography). L'équilibre de partage peut être modifié par la température du four de la GC. En effet, plus la température sera élevée, plus les analytes seront entraînés par le gaz vecteur. D'une manière générale, les molécules analysables en GC doivent être volatiles pour pouvoir être vaporisées et entraînées. Des étapes de dérivation lors de la préparation des échantillons peuvent permettre de rendre une molécule initialement non-volatile en molécule volatile. Il s'agit néanmoins d'une étape consommatrice de temps.

En revanche, si les molécules ne sont pas volatiles, elles peuvent être entraînées par une phase mobile liquide, c'est alors la chromatographie en phase liquide (LC pour Liquid Chromatography en anglais) qui est mise en jeu. Plusieurs paramètres influent sur la rétention d'une molécule : sa charge électrique, son encombrement stérique, ses liaisons spécifiques ou encore sa polarité. Contenu des nombreux paramètres qui entrent en jeu, cette technique est complexe. Cette complexité en fait également un avantage permettant à la LC d'être aussi bien éligible pour à un grand nombre de molécules que spécifique à une classe de molécules particulières. Les azoles sont le plus souvent analysés en LC (Trösken et al., 2005) mais peuvent l'être également en GC (Navarro et al., 2000) puisque certains sont volatiles. Quant aux néonicotinoïdes qui sont des molécules non-volatiles, elles ne peuvent être analysables qu'en LC. De façon à pouvoir réunir les deux familles de molécules de l'étude, les travaux se concentreront sur la LC.

Les progrès technologiques en LC ont permis d'abaisser la granulométrie des colonnes chromatographiques permettant ainsi un gain considérable en efficacité. Ceci a également entraîné une augmentation de la perte de charge et nécessite alors des pompes à haute pression capables de pousser suffisamment les solvants. Cette technologie largement répandue se nomme chromatographie en phase liquide à haute pression : CLHP ou HPLC en anglais. En UHPLC, où U signifie ultra, la taille des particules est inférieure à 2 µm contre 5 µm en HPLC.

En LC, différents modes guident la séparation des composés dépendant de la combinaison des phases mobile et stationnaire de la colonne chromatographique. Le mode de chromatographie en phase normale repose sur l'interaction entre les groupes polaires fonctionnels de la phase stationnaire et une phase mobile apolaire. Des développements ont ensuite permis de greffer à ces groupes polaires, généralement de silice, des greffons apolaires. Ceci devient alors le mode phase inverse qui est celui le plus employé. Il se compose donc d'une phase stationnaire apolaire et d'une phase mobile polaire généralement de l'eau



additionnée d'un solvant polaire comme le méthanol ou l'acétonitrile. C'est cette technique de séparation chromatographique qui sera utilisée dans les travaux de thèse.

Les colonnes analytiques apolaires de silice greffées C18 sont les plus répandues pour la séparation chromatographique des pesticides. Cette chaîne alkylée composée de 18 atomes de carbone permet des interactions hydrophobes simples. Des greffons phényl-hexyl peuvent être également employés et permettent des interactions  $\pi$ - $\pi$  entre les doubles liaisons riches en électrons dans l'analyte et les fragments phényl de la phase stationnaire. Des molécules ayant des cycles aromatiques peuvent y alors être retenues.

Un autre mode adapté à la séparation chromatographique de petites molécules polaires telles que les métabolites existe (Hai et al., 2017). Il s'agit de la chromatographie d'interaction hydrophile appelée HILIC ou encore phase normale aqueuse. Les phases stationnaires sont polaires tout comme les phases mobiles. Ce mode ne sera pas plus explicité puisqu'il n'a pas été développé dans le cadre du projet.

### Détection :

Une fois que les molécules ont été séparées, elles doivent être identifiées puis détectées pour enfin être quantifiées. Les premiers détecteurs étaient optiques avec la technologie ultraviolet (UV). Puis, la spectrométrie de masse (MS) est apparue et est devenue incontournable pour l'analyse de traces (Richardson, 2010). En effet, elle permet une meilleure sensibilité grâce à la sélection des fragments créés en fonction de leur rapport de masse sur charge ( $m/z$ ). Un spectromètre de masse est composé d'une source d'ionisation permettant la production des ions, d'un analyseur qui va ensuite les séparer en fonction du rapport  $m/z$ , d'un détecteur qui convertit le courant ionique en courant électrique pour ensuite traduire ce courant en intensité et donc en quantité d'ions.

Différents modes d'ionisation existent et sont compatibles avec la LC. Seule l'ionisation électrospray (ESI) sera explicitée puisqu'il s'agit de la technologie employée lors de ces travaux. A pression atmosphérique, le liquide passe sous forme de gouttelettes à l'extrémité d'un fin capillaire sous l'action d'un fort courant électrique. Ces gouttelettes passent au travers un gaz inerte chauffé permettant d'éliminer les dernières molécules de solvant. Cette élimination induit une densité de charge trop importante : les gouttelettes explosent alors en libérant des microgouttelettes. Ce phénomène se poursuit jusqu'à l'obtention d'ions porteurs d'un nombre de charges variables. Il existe deux modes d'ionisation : le mode positif ESI+ et le mode négatif ESI-. En mode positif, des cations sont créés, généralement avec un adduit proton ( $H^+$ ) pour porteur de la charge mais peut aussi être, plus rarement, un adduit sodium ( $Na^+$ ) s'il est présent à l'état de trace au sein de la source. Si adduit sodium il y a, il est conseillé de travailler soit en milieu acide et donc donneur de protons ou soit en ajoutant de l'acétate d'ammonium afin de favoriser les adduits de type ammonium. Ces derniers seront ensuite vaporisés sous forme gazeuse  $NH_3$  laissant bien le proton  $H^+$  souhaité sur la même molécule parent. Les ions formés sont ensuite transportés vers l'analyseur fonctionnant à pression réduite.

Plusieurs analyseurs de masse sont utilisés couramment comme les analyseurs à temps de vol (Time Of Flight : TOF), à piège ionique (trappe ionique), à résonance cyclotronique (Orbitrap) ou encore à l'aide d'un quadripôle (Q) ou triple quadripôles (QQQ). Le principe du dernier analyseur sera décrit par la suite Figure 25.

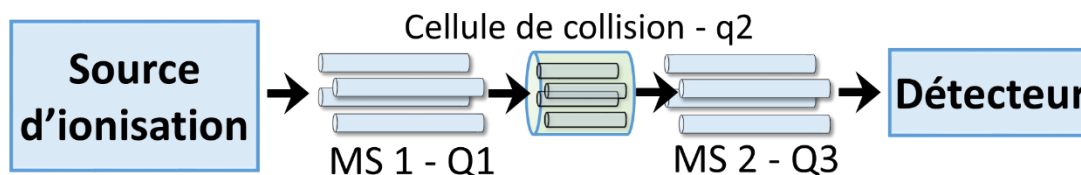


Figure 25 : Schéma d'un analyseur triple quadripôles

Il est muni de trois quadripôles dont ceux aux extrémités permettent de séparer les ions selon leur rapport  $m/z$  en appliquant un champ électrique. Celui du milieu est en réalité une cellule de collision remplie d'un gaz inerte afin de fragmenter de nouveau les ions sélectionnés dans le premier quadripôle. Pour chaque molécule, deux ions sont alors à sélectionner : l'ion parent sélectionné par le premier quadripôle et le deuxième ion fragmenté sélectionné par le dernier quadripôle. Ce mode se nomme MRM (Multiple Reaction Monitoring) et permet une bonne sélectivité d'une molécule ciblée. Ce même mode peut être décliné en mode dynamique (dMRM) à savoir que les transitions seront acquises seulement sur un espace-temps réduit coïncidant avec le temps de rétention de la molécule en sortie de la colonne chromatographique. Ceci permet donc d'accumuler l'intensité pour chaque transition plus longtemps et donc de gagner en sensibilité. Le temps est exprimé en ms et correspond à la valeur du temps de balayage nommé dwell time en anglais.

#### Quantification :

La quantification est réalisable uniquement en mode ciblé à savoir lorsque la liste des molécules est préalablement sélectionnée. Un étalonnage externe peut être réalisé au préalable pour calculer la concentration finale dans l'échantillon. L'étalonnage peut également être interne avec ajout d'un étalon interne directement dans l'échantillon. Les étalons ne sont généralement pas disponibles pour toutes les molécules y compris les métabolites recensés.

Afin d'identifier les molécules sans les quantifier, deux autres modes d'analyse existent : le suspect et le non-ciblé tous les deux employés à l'aide de la technique de détection par Spectrométrie de Masse à Haute Résolution (HRMS). Celle-ci permet un fort degré de précision sur la masse exacte de la molécule. Cette technique HRMS a d'ailleurs été employée pour détecter certains insecticides (Graves et al., 2019) ou plus spécifiques des néonicotinoïdes (Filigenzi et al., 2019) en matrice plume. Le criblage suspect permet de coupler les informations de structures et temps de rétention obtenues avec celles d'une base de données. En revanche, le criblage non-ciblé intervient lorsque le composé de référence n'est pas disponible.

## 6. Protocoles d'extraction pour les molécules étudiées dans les matrices biologiques et conditions analytiques

### a. Bibliographie des azoles dans les matrices biologiques liquides (plasma)

L'analyse des azoles en tant que pesticides dans les matrices biologiques est très peu documentée comme vu précédemment, particulièrement chez des organismes non conventionnels (animaux sauvages). La littérature sera alors complétée pour les azoles employés en tant que médicaments. Les matrices biologiques pour ces azoles en tant que pesticides ou médicaments sont analysées généralement lors d'expériences d'exposition en laboratoire (Beste et al., 2012; Gross et al., 2020; Li et al., 2017; Zhang et al., 2013). Une unique publication a été recensée permettant l'analyse de ces molécules dans le plasma de provenance environnementale (Luzardo et al., 2015). En revanche, d'autres publications recensent leur analyse dans les matrices liquides environnementales comme l'eau (Cotton et al., 2016; Schermerhorn et al., 2005) ou le vin (Navarro et al., 2000; Trösken et al., 2005; Zambonin et al., 2002).

Cette distinction expérimentale ou environnementale est à prendre en compte notamment pour les techniques d'analyses. En effet, les individus exposés volontairement à de fortes concentrations, afin d'observer les éventuels effets de la molécule sur l'organisme, pourront présenter des concentrations plus élevées avec une sensibilité qui n'a pas besoin d'être optimale.

Le Tableau 10 réunit les conditions d'extraction et d'analyse des azoles dans les matrices biologiques ainsi que les matrices liquides environnementales présentées dans la littérature.

A noter qu'aucun métabolite des azoles n'est analysé simultanément avec le même protocole analytique que les molécules parentes. Toutes les publications LC présentées analysent les azoles en phase inverse. On note néanmoins qu'aucune colonne chromatographique prédomine. Quand purification il y a, c'est généralement la cartouche Oasis HLB qui est sélectionnée.

Tableau 10 : Bilan des conditions d'extraction et d'analyse pour les azoles dans les matrices biologiques liquides à provenance environnementale ou expérimentale de la littérature

Matrice	Applications des azoles	Extraction		Purification		Analyse			Détection		Références	
		Prise d'essai (µL)	Type (Solvant)	Type (phase)	Type	Phase aqueuse	Phase organique	Colonne	Type (conditions)	LQ en matrice (*LD)		
Exp	Plasma humain	Médicament	100	ELL (MeOH/0,2 mol/L ZnSO <sub>4</sub> )	SPE en ligne (Oasis HLB)	HPLC	Eau + 2 mM Amm A	ACN	Allure PFP Propyl Restek (20 x 2,1 mm, 5 µm)	MS/MS (ESI +)	14 ng/mL	(Beste et al., 2012)
		Médicament	100	ELL (MeOH)	x	HPLC	Eau + tampon phosphate	ACN	Gemini C6-Phenyl Phenomenex (150 x 4,6 mm, 5 µm)	UV	0,05 mg/L	(Zhang et al., 2013)
	Plasma animal	Pesticides, Vétérinaire	-	ELL + US (ACN puis n-hexane)	x	HPLC	Eau MQ	ACN	Chiral column (Chiralpak IC)	MS/MS	0,5 mg/L	(Li et al., 2017)
		Pesticides	100	ELL (ACN)	SPE (Oasis prime HLB)	LC	Eau MQ + 5 mM Amm A + 5 mM AF	ACN	EVO C18 Kinetex (150 x 2,1 mm, 2,6 µm)	MS/MS (ESI +)	1 µg/L *	(Gross et al., 2020)
-	Plasma animal	Médicament	100	ELL (ACN)	x	HPLC	Eau MQ + 10 mM Amm A + AF	ACN	BDS hypersil 3 µm ODS column (Keystone)	MS	4,09 ng/mL	(Yao et al., 2001)
Env	Sang humain	Pesticides	2000	ELL (Eau/DCM/Ethyl Acétate/Acétone)	x	LC	Eau + 0,05 % AF + 7,5 mM Amm F	MeOH + 0,05 % AF	Synergi Hydro-RP (150 x 4,6 mm, 4 µm)	MS/MS (ESI+)	0,01 µg/mL	(Luzardo et al., 2015)
						GC	x	x	VF-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	MS/MS	0,011-0,334 µg/L	(Cazorla-Reyes et al., 2011)
	Urine humain	Pesticides	5000	x	SPE (C18 Sep-Pak 500 mg)	UHPLC	Eau + 0,01 % AF	MeOH	Acquity BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	MS/MS (ESI+)	0,031-0,461 µg/L	
						LC	Eau + 0,5 % AA	ACN	Hypersil Gold PFP C18 (50 x 2,1 mm, 5 µm)	MS/MS (ESI+)	0,3-1,5 µg/L	(Fustinoni et al., 2014)
	Vin	Pesticides	2500	SPME en ligne	x	GC	x	x	SPB-5 Supelco (30 m x 0,20 mm, 0,25 µm)	MS (IE+)	30-100 ng/kg	(Zambonin et al., 2002)
GC						x	x	HP 5 ms Hewlett-Packard (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	MS	9,0-50,2 µg/kg	(Navarro et al., 2000)	

Chapitre 1 : Bibliographie

	Pesticides	10	Centrifugation	x	LC	Eau + AF	ACN	Synergi Hydro RP Phenomenex (150 × 2 mm, 4 µm)	MS/MS (+)	0,25-7,5 ng/mL	(Trösken et al., 2005)
Eau	Pesticides	50 g	x	SPE (Oasis MCX)	LC	Eau + 0,2 % AF	MeOH + 0,2 % AF	Symmetry C18 Waters (250 x 4,6 mm, 5 µm)	MS/MS (ESI+)	10-300 pg/g	(Schermerhorn et al., 2005)
	Pesticides, Médicaments	6000	x	SPE en ligne (Oasis HLB)	UHPLC	Eau + 0,08 % AF	ACN + 0,08 % AF	HSS T3 Waters (150 x 2,1 mm, 1,8 µm)	MS/MS (ESI+ et -)	0,0001-0,005 µg/L *	(Cotton et al., 2016)

- : information non communiquée, x : étape non réalisée

AA : Acide acétique, ACN : Acétonitrile, AF : Acide formique, Amm A : Ammonium acétate, Amm F : Ammonium formate, APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique, DCM : Dichlorométhane, Eau MQ : Eau Milli-Q, ELL : Extraction Liquide-Liquide, ESI : Electrospray Ionization, Env : Environnemental, Exp : Expérimental, HLB : Hydrophobic Lipophilic Balance, IE : Impact Electronique, GC : Chromatographie en phase gazeuse, LC : Chromatographie en phase liquide, LD : Limite de Détection, LQ : Limite de Quantification, M : Métabolites des néonicotinoïdes, MCX : Mixed-mode Cation eXchange, MeOH : Méthanol, MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem, N : Néonicotinoïdes, NaCl : Chlorure de sodium, SPE : Extraction sur Phase Solide, SPME : Solide Phase MicroExtraction, UHPLC : Chromatographie en phase liquide à ultra haute pression, US : Ultrasons, UV : Ultraviolet

Les limites de quantifications (LQ) obtenues dans ces travaux sont compilées dans la Figure 26 où l'on visualise cette différence de sensibilité entre les analyses provenant de matrices expérimentales ou environnementales. Pour les applications environnementales, les LQ des azoles varient de l'ordre du pg/g plasma jusqu'à 50 ng/g plasma.

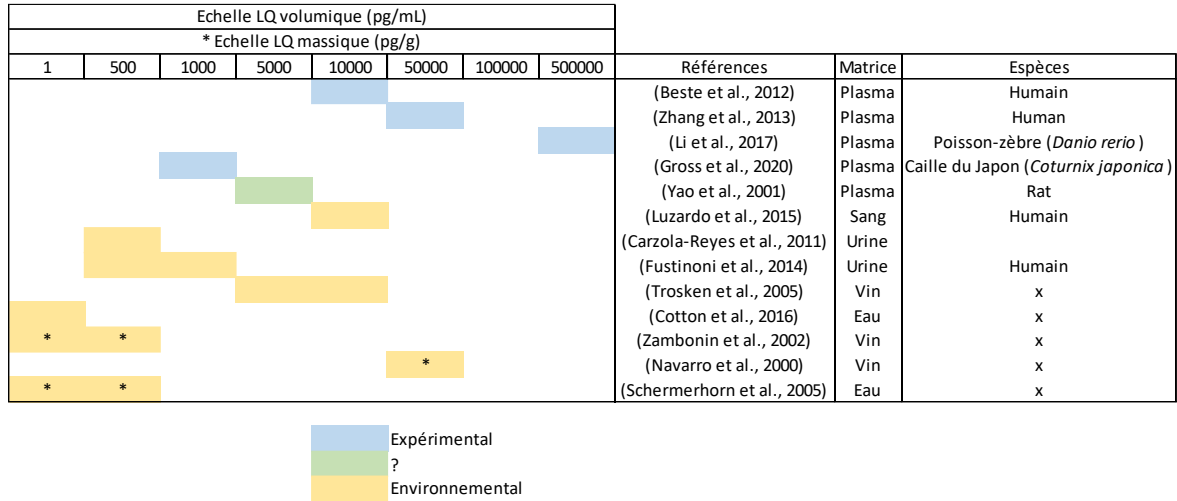


Figure 26 : Bilan des LQ en matrices biologiques liquides pour l'analyse des azoles présentes dans la littérature

Les travaux de thèse pourront alors compléter la littérature en mentionnant les conditions analytiques et limites de quantifications obtenues en matrice plasma à provenances expérimentale ou environnementale.

### b. Bibliographie des néonicotinoïdes dans les matrices biologiques liquides (plasma)

La littérature concernant l'analyse des néonicotinoïdes dans les matrices biologiques est plus fournie que celles des azoles. Le Tableau 11 énumère les conditions d'extraction et analytiques des néonicotinoïdes recensées dans la littérature. Les néonicotinoïdes sont analysés en LC sauf certains de leurs métabolites qui ont pu être dosés en GC. Les colonnes chromatographiques en LC sont généralement de type apolaires C18 bien que quelques exceptions existent. A noter que certains de leurs métabolites peuvent être analysés simultanément avec la même méthode analytique que leurs molécules parentes.

Tableau 11 : Bilan des conditions d'extraction et d'analyse pour les néonicotinoïdes dans les matrices biologiques liquides à provenance environnementale ou expérimentale de la littérature

Matrice	Molécules	Extraction		Purification		Analyse			Détection		Références		
		Prise d'essai (µL)	Type (Solvant)	Type (phase)	Type	Phase aqueuse	Phase organique	Colonne	Type (conditions)	LQ (*LD)			
Env	Plasma animal	N	500	QuEChERS (ACN acidifié)	x	HPLC	Eau + 0,1 % AF + 5 mM Amm F	ACN + 0,1 % AF	Sunfire C18 Waters (250 x 4,6 mm, 25 µm)	TOF (ESI +)	2-10 ng/mL	(Taliensky-Chamudis et al., 2017)	
		N	10	ELL (ACN/Eau) + US		SPE (Oasis HLB)	Eau + 0,05 % AF + 5 mM Amm F	ACN + 0,05 % AF	Cortecs UPLC C18 Waters (50 x 2,1 mm, 1,6 µm)	MS/MS (ESI +)	10-50 pg/g	(Humann-Guilleminot et al., 2021)	
		N	20-50	ELL (Eau/MeOH acidifiés)	x	LC	Eau + 0,1 % AF	ACN + 0,2 % AF	Acquity BEH C18 Waters (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	MS/MS (ESI +)	210 pg/mL	(Lennon et al., 2020b)	
	Sang humain	N	-	QuEChERS (Eau/ACN)	x	UHPLC	Eau + 5 mM Amm F + 0,1 % AF	ACN	Acquity BEH C18 Waters (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	MS/MS	0,6-39 pg/mL	(Byholm et al., 2018) (David et al., 2015)	
		N	2000	ELL (Eau/DCM/Ethyl Acétate/Acétone)	x	LC	Eau + 0,05 % AF + 7,5 mM Amm F	MeOH + 0,05 % AF	Synergi Hydro-RP (150 x 4,6 mm, 4 µm)	MS/MS (ESI +)	0,01 µg/mL	(Luzardo et al., 2015)	
-	Plasma	M	100	ELL (ACN)		Filtration (Impact)	HPLC	Eau + 0,1 % AF	MeOH	Gemini C18 (100 x 4,6 mm, 3 µm)	MS/MS (ESI +)	10 ng/mL	(Li et Pike, 2013)
Exp	Plasma animal	N + M	50-200	ELL (MeOH + AF)	x	HPLC	Eau + 0,1 % AF + 2 mM Amm A	MeOH	Kinetex Biphenyl Phenomenex (100 x 4,6 mm, 2,6 µm)	MS/MS Qtrap (ESI +)	2.3 - 177.7 pg/mL *	(Hao et al., 2016; Han et al., 2018)	
		N	-	US (DCM)	x	HPLC	Eau + 0,1 % AF	MeOH + 0,1 % AF	Waters Xterra phenyl (100 x 2,1 mm, 3,5 µm)	MS/MS Qtrap (ESI +)	0,4-0,6 ng/mL	(Roy et al., 2020)	
	Plasma animal	M	250	US (ACN)	x	HPLC	Eau + 0,1 % AF + 5 mM Amm A	Eau + 0,1 % AF	Kinetex EVO C18 (150 x 2,1 mm)	MS/MS (ESI)	0,6-0,8 ng/mL		
		N + M	25	ELL (MeOH + AF)	x	HPLC	Eau + 0,1 % AF + 2 mM Amm A	MeOH	Kinetex Biphenyl Phenomenex (100 x 4,6 mm, 2,6 µm)	MS/MS Qtrap (ESI +)	0,026-1,1 ng/mL	(Eng et al., 2021, 2017)	
		M	100	ELL (ACN)	x	LC	Eau + 0,1 % AF	ACN	Spherisorb CNRP Waters (150 x 4,6 mm, 5 µm)	MS/MS (ESI +)	10 ng/mL	(Szafarz et al., 2010)	

Chapitre 1 : Bibliographie

		N + M	500	ELL (Eau/DCM + acidifié HCl)	x	LC	Eau + 0,1 % AF	MeOH	Discovery C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	MS (APCI)	6-18 ng/mL	(Stivaktakis et al., 2016)
Env	Urine humaine	M	2000	Dérivation	SPE	GC	x	x	DB-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	MS	0,3 µg/L	(Nomura et al., 2013)
		N	5000	x	SPE (C18 Sep-Pak 500 mg)	UHPLC	Eau + 0,01 % AF	MeOH	Acquity BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	MS/MS (ESI +)	0,041- 0,0723 µg/L	(Cazorla-Reyes et al., 2011)
	Plasma + urine animale	N	1000	dSPE (MgSO <sub>4</sub> )	SPE (C18) + filtration	HPLC	Eau	ACN	C19 ODS (75 x 4,6 mm, 3,5 µm)	A barrette de diodes	-	(Kapoor et al., 2014)
Exp	Urine humaine	N + M	1000	Colonne diatomite (DCM)	SPE (Supelclean ENVI-Carb-II/PSA)	LC	Eau + 0,1 % AF + 10 mM Amm A	ACN	Atlantis T3 (100 x 2,1 mm, 3 µm)	Qtrap (ESI +)	0,005- 0,02 ng/mL *	(Harada et al., 2016)
		N + M	500	ELL (Eau/DCM + acidifié HCl)	x	LC	Eau + 0,1 % AF	MeOH	Discovery C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	MS (APCI)	6-20 ng/mL	(Kavvalakis et al., 2013)
Env	Eau	N + M	2000	x	SPE en ligne sur Thermo HyperSep Retain PEP (20 x 2,1 mm, 40-60 µm)		Eau + 0,1 % AF	MeOH + 0,1 % AF	Hypersil Gold C18 (50 x 2,1 mm, 1,9 µm)	MS/MS (ESI +)	0,5-5 ng/L *	(Montiel-León et al., 2018)
					UHPLC							
	Vin	N + M	250	x	x	HPLC	Eau/ACN	ACN + 0,1 % AF	Waters Xselec HSS T3 (100 x 4,6 mm, 3,5 µm)	MS/MS (ESI +)	1 µg/L	(Berset et al., 2017)

- : information non communiquée, x : étape non réalisée

ACN : Acétonitrile, AF : Acide formique, Amm A : Ammonium acétate, Amm F : Ammonium formate, APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique, DCM : Dichlorométhane, dSPE : Dispersive Solid Phase Extraction, HCl : Acide Chlorhydrique, ELL : Extraction Liquide-Liquide, ESI : Electrospray Ionization, Env : Environnemental, Exp : Expérimental, HCl : Acide chlorhydrique, HLB : Hydrophobic Lipophilic Balance, GC : Chromatographie en phase Gazeuse, LC : Chromatographie en phase liquide, LD : Limite de Détection, LQ : Limite de Quantification, M : Métabolites des néonicotinoïdes, MeOH : Méthanol, MgSO<sub>4</sub> : Sulfate de magnésium, MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem, N : Néonicotinoïdes, QuEChERS : Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, SPE : Extraction sur Phase Solide, TOF : Time of Flight, UHPLC : Chromatographie en phase liquide à ultra haute pression



La Figure 27 énumère les LQ obtenues en matrices biologiques liquides pour l'analyse des néonicotinoïdes. Elles oscillent du pg/g jusqu'à la dizaine de ng/g en équivalence de concentration massique. Que ce soit en application expérimentale ou environnementale, les sensibilités obtenues se confondent. Ceci témoigne d'une adaptation des travaux expérimentaux aux concentrations environnementales. Les sensibilités des néonicotinoïdes des cinq publications en matrices plasma à provenance environnementale seront à comparer avec celles obtenues dans le cadre de notre étude.

Les néonicotinoïdes sont également très largement analysés dans la matrice environnementale miel (Codling et al., 2016) (Kammoun et al., 2019) (Mitchell et al., 2017) (Gbylik-Sikorska et al., 2015) (Jones et Turnbull, 2016) au vu de la problématique « abeilles ». En revanche, les conditions analytiques et sensibilité obtenues ne seront pas exposées pour cette matrice. En effet, cette matrice est complexe et est bien différente de celles à l'étude dans cette thèse.

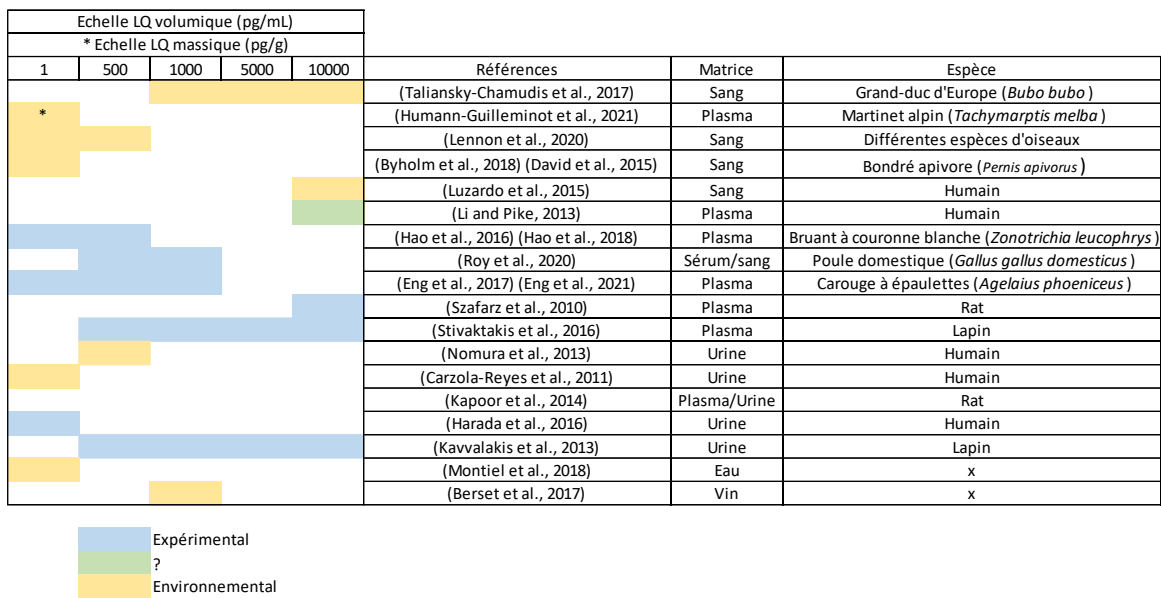


Figure 27 : Bilan des LQ en matrices biologiques liquides pour l'analyse des néonicotinoïdes présentes dans la littérature

### c. Bibliographie des azoles et néonicotinoïdes dans les matrices biologiques solides (plumes)

La bibliographie concernant l'analyse des azoles et néonicotinoïdes en matrices solides est séparée de celle des matrices liquides puisque, comme vu précédemment, les méthodes d'extraction diffèrent. Le but de cette bibliographie est de se focaliser sur les protocoles d'analyse des plumes. L'analyse des métaux (Fritsch et al., 2012) (Scheifler et al., 2006) et pesticides organiques persistants (POP) (Jaspers et al., 2007) (García-Fernández et al., 2013) (González-Gómez et al., 2020) dans les plumes est très répandue mais ne peut être regroupée avec celle de l'analyse des pesticides non persistants étudiés. En effet, les méthodes d'extraction employées telle que la digestion acide sont non compatibles avec les pesticides sélectionnés dans cette thèse.

A cette bibliographie sur l'analyse des azoles et néonicotinoïdes en matrice plume sont également ajoutées les matrices cheveu et poil afin de l'élargir (Tableau 12). Seules trois publications existent en matrice plume environnementale où seuls les néonicotinoïdes sont analysés. Comme les méthodes d'extraction des matrices solides sont fastidieuses, plusieurs familles de pesticides sont réunies pour une même préparation, comme vu dans le tableau pour les extractions en matrice cheveu. Les azoles et néonicotinoïdes pourront donc être extraits et analysés simultanément en LC.

Certaines études ne réalisent pas d'étape de prélavage et d'autres en effectuent une : soit à l'eau le plus souvent, soit à l'eau additionnée de Sodium Dodécyl Sulfate (un tensioactif généralement présent dans les shampoings d'abréviation SDS) soit au solvant. Cette étape de lavage est cruciale. Elle devra permettre un lavage externe de la plume sans en extraire les molécules présentes à l'intérieur. Par exemple, en comparant des plumes prélavées et non lavées, la contamination externe en plomb sur des plumes de merle noir représente entre 37 % et 60 % de la contamination totale (Scheifler et al., 2006). C'est un biais qu'il faudra vérifier pour les développements analytiques liés au projet de thèse.

Ensuite, toutes les études réalisent des étapes de séchage puis broyage bien que le pré-découpage s'est avéré suffisant pour certaines.

Puis, pour les étapes d'extraction de ces matrices phanères, les extractions liquide-liquide (ELL) avec comme solvant de l'acétonitrile sont les plus courantes et peuvent être additionnées d'une étape aux ultrasons pour favoriser les échanges. La méthode QuEChERS est également employée soit en méthode d'extraction, soit à la suite d'une ELL en tant que purification. Aucune publication mentionne l'extraction de ces matrices par les énergies micro-ondes.

Tableau 12 : Bilan des conditions de préparation d'échantillon, d'extraction et d'analyse pour les azoles et néonicotinoïdes dans les matrices biologiques solides (plumes et cheveux) à provenance environnementale ou expérimentale de la littérature

Matrice	Molécules	Préparation échantillon			Extraction		Purification		Analyse			Détection		Références	
		Pré-lavage	Séchage	Broyage	Prise d'essai (g)	Type (Solvant)	Type (phase)	Type	Phase aqueuse	Phase organique	Colonne	Type (conditions)	LQ en matrice (*LD)		
Env	Carcasse + Plume	N	x	x	Oui	1	QuEChERS + Filtration		UHPLC	Eau + 0,1 % AF	ACN + 0,1 % AF	Eclipse plus C-18 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	HRMS	0,75-3,6 ng/g	(Filigenzi et al., 2019)
		N	ACN ou Alconox	Oui	Oui	1	ELL (ACN /Eau)	QuEChERS	LC	-	-	Eclipse plus C-18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	HRMS (ESI +)	0,75-3,6 ng/g	(Graves et al., 2019)
	Plume	N	x	x	3 min à 25 Hz	0,015 - 0,025	ELL (ACN)	QuEChERS + Filtration	UPLC	Eau + 5 mM Amm F + 0,01 % AF	ACN + 0,1 % AF	Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	MS/MS	0,013-0,127 ng/g 0,05-0,6 ng/g	(Humann-Guillemint et al., 2019) (Humann-Guillemint et al., 2021)
Exp	Poil animal	A	Eau	1 h à 60 °C	2,5 min à 25 Hz	0,05	ELL (ACN)	non	LC	Eau + 0,5 % AA	MeOH + 0,5 % AA	Betasil C18 (150 x 2,1 mm, 5 µm)	MS/MS (ESI +)	1 pg/mg	(Polledri et al., 2018)
	Cheveu														
	Poil animal Cheveu	N + M	Eau puis MeOH	Four	Découpe : 2-3 mm	0,05	ELL + US (MeOH)	Filtration	LC	Eau + 0,1 % AF	MeOH	Discovery C18 HPLC (250 x 4,6 mm, 5 µm)	MS	0,04-0,06 ng/mg	(Kavvalakis et al., 2013)
Env	Cheveu	N	Eau MQ + 0,1 % SDS	x	Découpe : 1-3 mm	0,2	ELL (ACN /Eau)	QuEChERS + Filtration	UPLC	Eau + 0,1 % AF	MeOH + 0,1 % AF	Acquity UPLC HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	MS/MS (ESI +)	2,6-4,7 pg/mg	(Lehmann et al., 2018a)
		A	Incubation 1 min (Eau puis ACN)	60°C	Oui	0,05	ELL (ACN)	DI-SPME	GC	x	x	5 MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	MS/MS	1-10 pg/mg	(Schummer et al., 2012)
		A + N	Eau	1 h à 60°C	3 min à 25 Hz	0,05	ELL (ACN)	non	UPLC	Eau + 5 mM Amm F + 0,1 % AF	MeOH + 0,1 % AF	Acquity UPLC HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	MS/MS (ESI +)	0,04-0,08 pg/mg	(Polledri et al., 2020)

Chapitre 1 : Bibliographie

A	Eau	1 h à 60°C	2,5 min à 25 Hz	0,05	ELL (ACN)	non	LC	Eau + 0,5 % AF	MeOH	Betasil C18 (150 x 2,1 mm, 5 µm)	MS/MS (ESI +)	1 pg/mg	(Mercadante et al., 2018)
A + N	Eau MQ + 5 % SDS puis MeOH	x	Oui	0,05	ELL (ACN)	non	LC	Eau + 0,5 % AF	ACN + 0,5 % AF	Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	MS/MS (ESI +)	0,015-0,486 pg/mg *	(Béranger et al., 2020) (Duca et al., 2014a) (Duca et al., 2014b)
N	x	x	2 min à 25 Hz	0,025	ELL (ACN)	QuEChERS + Filtration	UHPLC	-	-	-	MS/MS	8-30 pg/g	(Bonmatin et al., 2021)

- : information non communiquée, x : étape non réalisée

A : Azoles, AA : Acide acétique, ACN : Acétonitrile, AF : Acide formique, Amm A : Ammonium acétate, Amm F : Ammonium formate, DI-SPME : Direct Immersion Solide Phase MicroExtraction, Eau MQ : Eau Milli-Q, ELL : Extraction Liquide-Liquide, ESI : Electrospray Ionization, Env : Environnemental, Exp : Expérimental, GC : Chromatographie en phase gazeuse, HRMS : Spectrométrie de Masse Haute Résolution, LC : Chromatographie en phase liquide, LD : Limite de Détection, LQ : Limite de Quantification, MeOH : Méthanol, MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem, N : Néonicotinoïdes, QuEChERS : Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, SDS : Sodium Dodécyl Sulfate, UHPLC : Chromatographie en phase liquide à ultra haute pression

Les sensibilités obtenues en matrice solide plumes ou cheveux dans ces différentes publications sont réunies dans la Figure 28. Les LQ sont très variables et s'étalent de 0,01 à 50 ng/g. Finalement, parmi les trois publications plumes, celle de Humman-Guillemot et al. (2019) présente une méthode plus sensible que celle présentée dans les deux précédentes publications. Ceci s'explique par une analyse ciblée en MS/MS, contrairement à une non ciblée en HRMS pour les deux autres. Cette même publication servira de base pour comparer nos futures sensibilités obtenues dans le cadre des travaux de thèse.

Echelle LQ massique (ng/g)								Références	Matrice	Espèce
0,01	0,05	0,1	0,5	1	5	10	50			
								(Filifenzi et al., 2019)	Carcasse/Plume	Poule ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )
								(Graves et al., 2019)	Carcasse/Plume	Colibri à gorge noire ( <i>Archilochus alexandri</i> ) et Colibri d'Anna ( <i>Calypte anna</i> )
								(Humman-Guillemot et al., 2019)	Plume	Moineau domestique ( <i>Passer domesticus</i> )
								(Humman-Guillemot et al., 2021)	Plume	Chouette effrai ( <i>Tyto alba</i> )
								(Polledri et al., 2018)	Poil/Cheveux	Rat/Humain
								(Kavalakis et al., 2013)	Poil/Cheveux	Lapin/Humain
								(Lehmann et al., 2018)	Cheveux	Humain
								(Schummer et al., 2012)	Cheveux	Humain
								(Polledri et al., 2020)	Cheveux	Humain
								(Mercadante et al., 2018)	Cheveux	Humain
								(Béranger et al., 2020)	Cheveux	Humain
								(Duca et al., 2014)	Cheveux	Humain
								(Peng et al., 2020)	Cheveux	Humain
								(Bonmatin et al., 2021)	Cheveux	Humain

Figure 28 : Bilan des LQ en matrices biologiques solides (plumes, cheveux) pour l'analyse des azoles et des néonicotinoïdes présentes dans la littérature

## 7. Objectifs des travaux de thèse et programmes de recherche associés

L'objectif principal de la thèse est de caractériser la contamination en pesticides, et plus particulièrement en azoles (fongicides) et néonicotinoïdes (insecticides), de différentes espèces bio indicatrices de leur environnement/habitat en région Nouvelle-Aquitaine. Ces deux classes de polluants organiques sont largement employées en agriculture et notamment en viticulture.

En ce qui concerne les azoles, fongicides très utilisés, leur présence dans les différents compartiments environnementaux est démontrée ainsi que leurs transferts vers les organismes via les réseaux trophiques. Néanmoins, il n'existe, à ma connaissance, quasiment aucune donnée concernant le degré de contamination des vertébrés sauvages vivant dans les agroécosystèmes. De plus, l'impact des azoles sur ces espèces non-cibles est encore très mal connu.

De nombreux insecticides commerciaux contiennent des néonicotinoïdes. Ces composés sont retrouvés dans les différents compartiments environnementaux et l'exposition de nombreux organismes est démontrée. Le taux de contamination des espèces de vertébrés sauvages reste cependant inconnu, notamment en ce qui concerne les espèces étudiées dans le cadre de cette thèse. De plus, il a été prouvé ces dernières années que les néonicotinoïdes provoquaient des effets néfastes sur les abeilles. Les connaissances des impacts sur d'autres espèces non cibles de vertébrés restent néanmoins encore très sporadiques pour le moment.

La présence et les effets de ces deux familles de polluants organiques seront étudiés sur différents modèles d'animaux sauvages. Ces espèces « sentinelles » proviennent de zones plus ou moins sensibles comprenant des zones viticoles, des bocages, des forêts ou encore des zones urbaines. L'ensemble des sites d'étude se situent dans la région Nouvelle-Aquitaine ou plus précisément dans les départements de Charente, Charente-Maritime et Deux-Sèvres.

Dans un premier temps, la question des molécules appliquées sur les sites d'étude de la thèse s'est posée. Pour ce faire, des bases de données nationales ont été compilées et couplées avec celles obtenues pour des échantillonneurs passifs atmosphériques placés dans certains lieux d'étude. Ces derniers ont permis de qualifier et de quantifier l'exposition des animaux aux pesticides (notion d'ambiance chimique) en relation avec les dates d'application de ces molécules.

De façon à quantifier ces polluants organiques, et ce dans une démarche non-destructive pour l'animal, du plasma et/ou des plumes ont été prélevés en ce qui concerne les oiseaux. Le défi méthodologique a été d'abaisser la prise d'essai (afin d'échantillonner des espèces de petites tailles et/ou des juvéniles) tout en ayant des limites de quantifications basses. C'est au sein du laboratoire EPOC, situé à Bordeaux, que ces méthodes analytiques ont été développées.

Pour l'analyse des molécules en matrice plasma, une méthode automatisée a été mise au point en couplant une extraction sur phase solide en ligne (SPE on-line en anglais) avec une chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS).

En ce qui concerne l'analyse en matrice plume, un développement analytique reposant sur la comparaison de méthodes d'extraction a été réalisé.

Les concentrations obtenues ont été finalement comparées en fonction des espèces, des sites d'étude et des années de prélèvement. Les concentrations finales au sein des deux matrices plasma et plume seront finalement comparées selon les propriétés physico-chimiques des molécules étudiées.

Ces travaux de thèse vont donc aborder et tenter de répondre aux axes synthétisés sur la Figure 29.

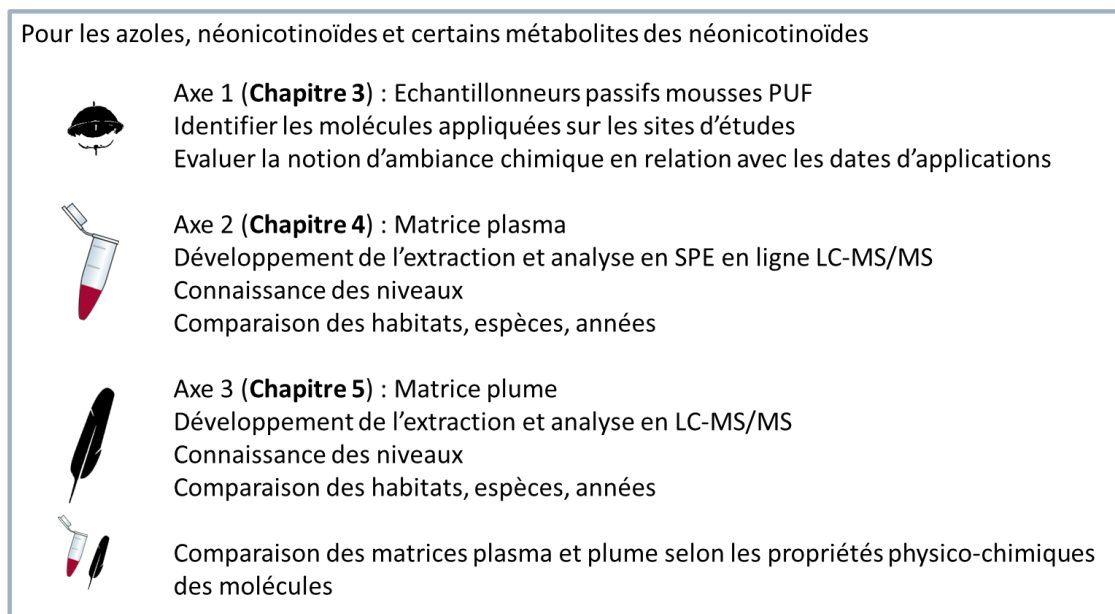


Figure 29 : Bilan des axes et chapitres du projet de thèse

Cette thèse a été réalisée dans le cadre du projet MULTISTRESS (avec Olivier CHASTEL comme porteur) incluant également le projet EC2CO (Ecosphère Continentale et Côtière avec Frédéric ANGELIER comme responsable). La coopération entre les deux laboratoires CEBC et EPOC Bordeaux, avec comme co-directrice de thèse Hélène BUDIZINSKI, a permis une approche pluridisciplinaire axée sur la chimie environnementale et l'écologie.





## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1.	Molécules étudiées : choix et propriétés .....	99
a.	Liste et propriétés physico-chimiques des azoles .....	99
b.	Liste et propriétés physico-chimiques des métabolites des azoles.....	105
c.	Liste et propriétés physico-chimiques des néonicotinoïdes .....	107
d.	Liste et propriétés physico-chimiques des métabolites des néonicotinoïdes .....	110
2.	Echantillonnages .....	113
a.	Sites d'étude des amphibiens : crapauds épineux .....	115
b.	Sites d'étude des oiseaux.....	115
i.	Merles noirs et mésanges charbonnières .....	115
ii.	Goélands .....	116
iii.	Cigognes blanches .....	117
c.	Sites d'étude des échantillonneurs passifs .....	117
d.	Expérimentations en laboratoire.....	118
i.	Moineaux domestiques – Tébuconazole .....	118
ii.	Diamant mandarin – Imidaclopride.....	119
3.	Liste des références du matériel utilisé .....	120
a.	Solvants et réactifs .....	120
b.	Standards analytiques .....	120
c.	Verrerie et petits appareils.....	122
4.	Protocoles de préparation, d'extraction et de purification des échantillons.....	122
a.	Protocole d'extraction plasma .....	122
b.	Protocoles de préparation et d'extraction des plumes .....	124
i.	Préparation des plumes.....	124
ii.	Extraction des plumes .....	125
1.	Protocole assisté par micro-ondes .....	125
2.	Protocole Edge.....	126
3.	Protocole ultrasons .....	127
c.	Protocole d'extraction des mousses PUF.....	127
d.	Protocole de purification sur phase solide SPE.....	128
5.	Analyse des extraits par LC-MS/MS .....	129
a.	Conditions LC .....	129
b.	Conditions de source .....	130
c.	Conditions SPE en ligne.....	130

d.	Transitions des molécules .....	131
e.	Quantification des composés et retraitement des données .....	133
6.	Critères qualités.....	135
a.	Vérification des performances instrumentales injection directe et SPE en ligne...	135
i.	Développement des molécules et critères pour leur identification.....	136
ii.	Linéarité et limites de quantification instrumentales.....	137
iii.	Cartes de contrôles instrumentales .....	139
b.	Vérifications d'une séquence d'échantillons.....	139
i.	Echantillons de plasma : sensibilité, linéarité et justesse .....	140
ii.	Echantillons de plumes : sensibilité, linéarité et justesse .....	144
iii.	Echantillons de mousses PUF : sensibilité, linéarité et justesse.....	147
7.	Bilan des échantillons extraits et analysés .....	148
a.	Echantillons de plasma.....	148
b.	Echantillons de plumes.....	150
c.	Echantillons de mousses PUF .....	151
d.	Données incluses dans les chapitres du manuscrit et les publications.....	151
i.	Echantillons et données brutes inclus.....	151
ii.	Données des tests statistiques .....	153



## 1. Molécules étudiées : choix et propriétés

Deux familles de pesticides sont étudiées, à savoir les azoles qui sont des fongicides et les néonicotinoïdes, des insecticides. Les fongicides et les insecticides sont les deux familles les plus employées sur application viticole. Les azoles ont été sélectionnés puisque leur utilisation s'est accrue au cours des dernières années (Toda et al., 2021) alors que la littérature reste peu documentée quant à leur occurrence dans les matrices biologiques à provenance environnementale. Les néonicotinoïdes ont été sélectionnés puisqu'ils sont au cœur de l'actualité. Les données environnementales après leur interdiction, de septembre 2018 en France, manquent dans la bibliographie. Ces deux familles de molécules peuvent avoir des effets sublétaux voire mortels sur les organismes. Certaines sont des molécules ayant une activité toxicologique notable et peuvent être catégorisées comme étant des perturbateurs endocriniens (pour les azoles (Goetz et al., 2007) (Roelofs et al., 2014) et pour les néonicotinoïdes (Gibbons et al., 2015) (Han et al., 2018)).

Une liste a été décrite dans la partie bibliographique et permet de recenser toutes les molécules appartenant aux deux familles. En revanche, toutes les molécules mentionnées n'ont pas pu être analysées. Le choix final a été affiné à partir de la liste initiale selon plusieurs critères : intérêt des molécules par rapport à leur autorisation en France ou application sur les sites d'étude, pertinence via leurs propriétés physico-chimiques et toxicologiques, bibliographie avec celles généralement analysées et quantifiées. De plus, un critère limitant concerne l'existence de l'étalon analytique commercialisé. La démarche de priorisation des molécules a été réalisée pour les azoles, leurs métabolites, les néonicotinoïdes ainsi que leurs métabolites.

L'analyse de certaines de ces molécules étaient déjà réalisées au laboratoire dans d'autres matrices que celles employées dans le cadre de la thèse. D'autres molécules ont été commandées spécialement pour la thèse et ont ensuite été développées.

### a. Liste et propriétés physico-chimiques des azoles

Les colonnes du tableau des quantités de substances actives vendues (Tableau 2 du chapitre 1 bibliographie) sont recoupées avec les quantités vendues sur l'année 2017 dans les départements plus spécifiques de l'étude à savoir Charente et Charente-Maritime. Pour chacune de ces substances actives achetées, le nom du produit phytosanitaire est également mentionné. Puis, grâce à la base de données E-Phy, on peut remonter à la culture autorisée pour chacun des produits phytosanitaires. Ce calcul est réalisé sur les quantités de substances actives vendues dans les deux départements. Ceci permet d'avoir une estimation des molécules plutôt employées sur les grandes cultures ou vignes dans ces départements. Cette relation n'est exacte que si le produit phytosanitaire est bien acheté puis appliqué sur la culture pour lequel il a été autorisé. Les indications d'usage explicités dans cette partie seront plus précises que celles mentionnées dans la frise chronologique (Figure 6) du chapitre bibliographie puisqu'il s'agit ici de l'utilisation d'un produit phytosanitaire et non de la molécule en général. Le Tableau 13 ci-dessous est ainsi obtenu.

Tableau 13 : Quantités de substances actives azoles achetées en région Nouvelle-Aquitaine de 2013 à 2019 et vendues dans les deux départements Charente et Charente-Maritime en 2017 par types de culture

	Quantités de substances actives achetées en région Nouvelle-Aquitaine (kg)							Quantités de substances actives vendues dans les départements Charente et Charente-Maritime (kg)		
	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2017	2017 usage grandes cultures	2017 usage vigne
Azaconazole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bitertanol	101	182	19	0,07	0,09	0	0	0	0	0
Bromuconazole	33	65	2360	4352	5589	10752	7856	1586	1586	0
Clotrimazole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cyproconazole	3169	8823	10604	13665	10849	12302	3796	4128	4128	0
Difénoconazole	4485	8646	8345	10463	9533	11822	10005	849	835	720
Diniconazole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Epoxiconazole	17613	39575	33247	32886	25269	26419	12211	10295	10295	0
Etaconazole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fenbuconazole	943	2063	2091	2182	2180	3233	2573	551	0	545
Fluconazole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fluquinconazole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flusilazole	344	8	1	0	0	85	0	0	0	0
Flutriafol	43	49	37	18	8	0	0	1	1	0
Hexaconazole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Imazalil	0	0	0	12	6	8	14	0	0	0
Imibenconazole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ipconazole	0,7	20	24	34	43	42	21	47	47	0
Mefentrifluconazole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metconazole	3100	7747	7437	9722	11629	14778	12506	4360	4360	0
Miconazole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Myclobutanil	1391	2616	1527	1176	799	553	222	477	0	477
Oxpoconazole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pefurazoate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Penconazole	309	585	279	199	67	143	42	16	0	13
Prochloraz	32248	71310	67278	75774	57524	59469	25455	23230	23229	0
Propiconazole	3415	11088	14445	17069	15642	14976	2210	4840	4833	0
Prothioconazole	27102	56216	57225	58903	51292	58987	46739	20746	20746	0
Siméconazole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tébuconazole	21555	59279	57452	70451	61076	67079	41143	22965	20563	5359
Tétraconazole	308	1489	1683	1851	2370	4196	4025	867	38	829
Triadiméfon	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Triadiménol	720	965	640	254	58	7	0,5	32	0	32
Triflumizole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Triticonazole	776	1529	1083	1227	1110	909	712	228	220	0

Produits phytosanitaires à usage sur grandes cultures (jaune), viticole (violet), les deux (bleu). Les molécules colorées sont celles qui ont été sélectionnées pour la liste des azoles.

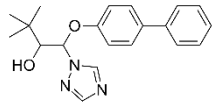
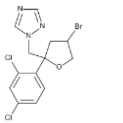
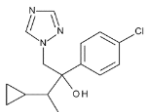
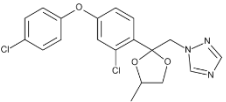
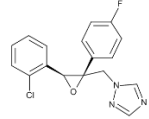
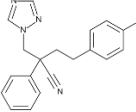
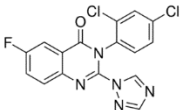
Certaines molécules n'ont jamais été autorisées, à l'échelle du pays pour des applications sur grandes cultures et vignes, ni achetées dans la région ainsi que dans les deux départements étudiés. Parmi ces molécules on compte les suivantes : azaconazole, clotrimazole, diniconazole, fluconazole, hexaconazole, imibenconazole, mefentrifluconazole, miconazole, oxpoconazole, pefurazoate, siméconazole et triflumizole. Toutes ces molécules ne seront pas sélectionnées dans la liste finale de priorisation. Pour les azoles, c'est essentiellement leur autorisation et utilisation qui ont été les critères principaux de choix. Le triadiméfon et le fluquinconazole, bien que non employés, seront quand même sélectionnés puisqu'ils étaient présents et déjà développés au laboratoire. De plus, le triadiménol est un métabolite du triadiméfon (Crowell et al., 2011).

Parmi les molécules restantes, des couleurs ont été attribuées pour chacune. Le jaune lorsqu'elles sont achetées pour un usage sur grandes cultures dans les deux départements. Le violet lorsqu'elles sont appliquées pour un usage viticole. Et enfin la couleur bleue lorsque les produits phytosanitaires achetés sont autorisés à être appliqués sur ces deux types de cultures.

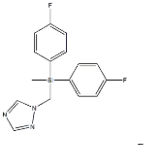
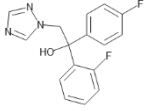
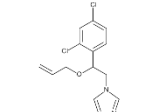
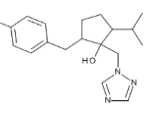
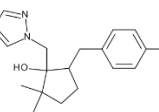
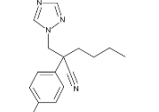
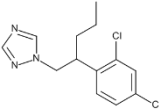
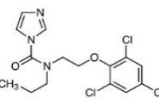
Certaines molécules, non vendues dans les deux départements, mais achetées en région Nouvelle-Aquitaine ont été retenues dans la liste à savoir : le bitertanol, le flusilazole et l'imazalil. Ces trois molécules sont autorisées pour un usage en grandes cultures entre autres mais pas un usage viticole. La couleur jaune leur a donc été attribuée. Le triadiméfon, lui, rassemble des produits phytosanitaires autorisés aussi bien sur les grandes cultures que pour un usage viticole mais n'a pas été acheté dans cette région. Le fluquinconazole est autorisé pour être appliqué sur les grandes cultures bien qu'il n'ait pas été acheté.

Les propriétés physico-chimiques de ces molécules sélectionnées sont décrites dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Propriétés physico-chimiques, réactivité et écotoxicologie des azoles étudiés dans le cadre de la thèse

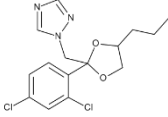
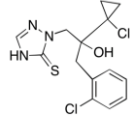
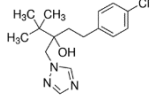
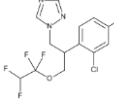
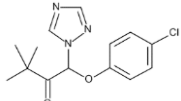
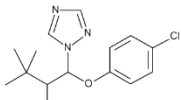
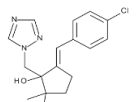
n° CAS	Formule brute	Base	Propriétés physico-chimiques <sup>4</sup>							Réactivité				Ecotoxicologie <sup>4</sup>		
		Formule chimique	Masse moléculaire (g/mol)	pKa à 25°C	log K <sub>ow</sub>	Solubilité aqueuse (mg/L)	Constante de Henry (Pa.m <sup>3</sup> /mol)	Pression de vapeur (mPa)	DT50 sol (jours) <sup>4</sup>	DT50 photolyse aqueuse (jours) <sup>4</sup>	DT50 hydrolyse aqueuse (jours) <sup>4</sup>	DT50 air (h)	BCF (L/kg)	NOEL oiseau (mg/kg p.c. jour)	DL50 orale oiseau (mg/kg)	
Bitertanol	55179-31-2	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>		337,42	-	4,10	3,8	2,6.10 <sup>-7</sup>	1,36.10 <sup>-6</sup>	23	18	> 365	2,5 <sup>1</sup> ; 2,9 <sup>3</sup>	170	-	776
Bromuconazole	116255-48-2	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> BrCl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O		377,06	2,75	3,24	48,3	1,31.10 <sup>-5</sup>	0,004	190	> 30	30	14,8 <sup>3</sup>	131	0,8	> 2150
Cyproconazole	94361-06-5	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O		291,78	2 / 13 <sup>5</sup>	3,09	93	5.10 <sup>-5</sup>	0,026	142	40	> 365	160 jours <sup>1</sup> ; 8,7 <sup>3</sup>	28	1,4	94
Difénoconazole	119446-68-3	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		406,26	1,07	4,36	15	8,22.10 <sup>-7</sup>	3,33.10 <sup>-5</sup>	130	> 30	> 365	5,95 <sup>3</sup>	330	9,71	> 2150
Epoxiconazole	135319-73-2	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClFN <sub>3</sub> O		329,76	2 <sup>5</sup>	3,30	7,1	1,649.10 <sup>-5</sup>	3,5.10 <sup>-4</sup>	353,5	53	> 365	14,6 <sup>3</sup>	70	0,91	> 2000
Fenbuconazole	114369-43-6	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub>		336,82	2 <sup>5</sup>	3,79	3,8	4,3.10 <sup>-4</sup>	3,4.10 <sup>-4</sup>	60	> 30	> 365	13,1 <sup>1</sup> ; 3 <sup>3</sup>	160	21	> 2150
Fluquinconazole	136426-54-5	C <sub>18</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>5</sub> O		376,17	0,9	3,24	1,15	2,9.10 <sup>-6</sup>	6,4.10 <sup>-6</sup>	350	> 30	21,9	56,1 <sup>3</sup>	87	-	> 2000

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Flusilazole	85509-19-9	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> Si		315,39	2,5	3,87	41,9	2,7.10 <sup>-4</sup>	0,0387	300	70	> 365	20,8 <sup>1</sup> <sub>3</sub>	250	1,9	> 1590
Flutriafol	76674-21-0	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O		301,29	2,3	2,30	95	1,27.10 <sup>-6</sup>	4.10 <sup>-4</sup>	1358	> 30	> 365	13,3 <sup>3</sup>	< 100	35,8	616
Imazalil	35554-44-0	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O		297,18	6,5	2,56	184	1,08.10 <sup>-4</sup>	0,158	76,3	6,1	30-100	1,8 <sup>2</sup> ; 1,5 <sup>3</sup>	56,3	24	510
Ipconazole	125225-28-7	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> ClN <sub>3</sub> O		333,90	- 5,4	4,30	9,34	3.10 <sup>-5</sup>	0,003	50	495	64	5,1 <sup>3</sup>	350	4,3	> 962
Metconazole	125116-23-6	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O		319,83	1,1 / 11,4	3,85	30,4	2,21.10 <sup>-7</sup>	2,1.10 <sup>-5</sup>	142,2	83	> 365	8,1 <sup>3</sup>	105,1	6,19	787
Myclobutanil	88671-89-0	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub>		288,78	2,3	2,89	132	4,33.10 <sup>-4</sup>	0,198	560	15	> 365	7,6 <sup>2</sup> ; 18,2 <sup>3</sup>	< 100	24,2	510
Penconazole	66246-88-6	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub>		284,18	1,51	3,72	73	6,6.10 <sup>-4</sup>	0,366	117	4	> 365	15,9 <sup>3</sup>	320	28,6	> 1590
Prochloraze	67747-09-05	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>		376,70	3,8	3,50	26,5	1,64.10 <sup>-3</sup>	0,15	120	1,5	> 365	1,6 <sup>3</sup>	371	-	662



Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Propiconazole	60207-90-1	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>		342,22	1,1	3,72	100	9,2.10 <sup>-5</sup>	5,6.10 <sup>-2</sup>	71,8	> 30	53,5	5,5 <sup>3</sup>	116	25,5	> 2510
Prothioconazole	178928-70-6	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> OS		344,26	6,9	2,00	22,5	1,1.10 <sup>-8</sup>	7,4.10 <sup>-6</sup>	14,1	2,1	> 365	1,1 <sup>3</sup>	43,9	78	> 2000
Tébuconazole	107534-96-3	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O		307,82	5	3,70	36	1.10 <sup>-5</sup>	1,3.10 <sup>-3</sup>	63	> 30	> 365	2,6 jours <sup>1</sup> ; 11,2 <sup>3</sup>	78	5,8	1988
Tétraconazole	112281-77-3	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O		372,15	0,65	3,56	156,6	3,6.10 <sup>-4</sup>	0,18	61	217	> 365	11,7 <sup>3</sup>	35,7	-	132
Triadiméfon	43121-43-3	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>		293,80	2	3,18	70	9.10 <sup>-5</sup>	2.10 <sup>-2</sup>	26	0,8	> 365	7,6 <sup>3</sup>	64	-	> 2000
Triadiménol	55219-65-3	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>		295,76	2 / 13 <sup>5</sup>	3,18	72	3,5.10 <sup>-6</sup>	5.10 <sup>-4</sup>	250	9	> 365	4,0 <sup>3</sup>	21	7,5	> 2000
Triticonazole	131983-72-7	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub> O		317,82	-	3,29	9,3	1,2.10 <sup>-6</sup>	9.10 <sup>-5</sup>	237	300	7,4	2,0 <sup>3</sup>	94	-	> 2000

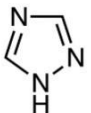
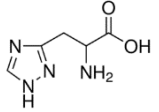
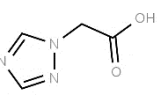
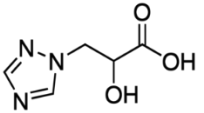
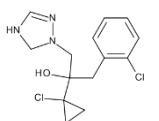
Légende des couleurs disponibles en Annexe 1, - : information non communiquée, BCF : Facteur de Bio-Concentration, CAS : Chemical Abstracts Service, DL50 : Dose Létale 50 %, DT50 : temps de demi-vie, K<sub>a</sub> : Constante de dissociation dans l'eau, K<sub>ow</sub> : Coefficient de partage octanol/eau, NOEL : No Observe Effect Level

<sup>1</sup> (Coscollà et al., 2013) déterminé par la méthode Atkinson, <sup>2</sup> Méthode de détermination non spécifiée (Coscollà et al., 2013), <sup>3</sup> A partir du logiciel AOPWIN développé par W. Meylan et P. Howard à partir du modèle d'Atkinson, <sup>4</sup> D'après la base de données PPDB, <sup>5</sup> D'après la modélisation Chemicalize

b. Liste et propriétés physico-chimiques des métabolites des azoles

La liste des métabolites des azoles est peu fournie et contient uniquement cinq molécules : le prothioconazole desthio, le 1,2,4-triazoles, le 1,2,4 triazole acétique acide, le triazole alanine et le 1,2,4 triazole lactique acide. Tous ces métabolites ont été mentionnés dans la littérature. Leur étalon commercial existe tout comme un étalon interne deutéré possible : le 1,2,4 triazole d3. Seulement quelques propriétés physico-chimiques sont décrites dans le Tableau 15 puisque de nombreuses données sont manquantes. Il s'agit d'une classe de molécules polaires de faibles masses moléculaires inférieures à 159 g/mol pour les métabolites communs aux azoles qui n'inclut donc pas le prothioconazole desthio. Ces molécules nécessitant une méthode analytique bien spécifique, par manque de temps, ce développement analytique bien qu'initié n'a pas pu être finalisé. Le prothioconazole desthio, ayant une masse moléculaire semblable aux autres molécules azolées, aurait pu être ajouté à la liste.

Tableau 15 : Propriétés physico-chimiques, réactivité et écotoxicologie des métabolites des azoles listés mais non analysés dans le cadre de la thèse

Base			Propriétés physico-chimiques <sup>4</sup>							Réactivité			Ecotoxicologie <sup>4</sup>		
n° CAS	Formule brute	Formule chimique	Masse moléculaire (g/mol)	pKa à 25°C	log K <sub>ow</sub>	Solubilité aqueuse (mg/L)	Constante de Henry (Pa.m <sup>3</sup> /mol)	Pression de vapeur (mPa)	DT50 sol (jours) <sup>4</sup>	DT50 photolyse aqueuse (jours) <sup>4</sup>	DT50 hydrolyse aqueuse (jours) <sup>4</sup>	DT50 air (h)	BCF (L/kg)	NOEL oiseau (mg/kg p.c. jour)	DL50 orale oiseau (mg/kg)
1,2,4-triazole (T)	288-88-0	<chem>C2H3N3</chem> 	69,03	2,2	-1	730000	0,155	2,2.10 <sup>-4</sup>	10	> 30	3,16 <sup>6</sup>	106,96 jours <sup>3</sup>	316	-	-
Triazole alanine (TA)	86362-20-1	<chem>C5H10N4O2</chem> 	158,16	2,47 / 9,48 <sub>5</sub>	- / 2,841 <sub>5</sub>	381343 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,2,4 -triazole acétique acide (TAA)	28711-29-7	<chem>C4H5N3O2</chem> 	127,10	1,96 / 3,2 <sub>5</sub>	- / 1,263 <sub>5</sub>	125289 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,2,4-triazole lactique acide (TLA)	1450828-63-3	<chem>C5H7N3O3</chem> 	157,13	2,03 / 3,14 / 13,69 <sub>5</sub>	- / 1,762 <sub>5</sub>	122327 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prothioconazole desthio	120983-64-4	<chem>C14H15Cl2N3O</chem> 	312,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Légende des couleurs disponibles en Annexe 1, - : information non communiquée, BCF : Facteur de Bio-Concentration, CAS : Chemical Abstracts Service, DL50 : Dose Létale 50 %, DT50 : temps de demi-vie, K<sub>a</sub> : Constante de dissociation dans l'eau, K<sub>ow</sub> : Coefficient de partage octanol/eau, NOEL : No Observe Effect Level

<sup>1</sup> (Coscollà et al., 2013) déterminé par la méthode Atkinson, <sup>2</sup> Méthode de détermination non spécifiée (Coscollà et al., 2013), <sup>3</sup> A partir du logiciel AOPWIN développé par W. Meylan et P. Howard à partir du modèle d'Atkinson, <sup>4</sup> D'après la base de données PPDB, <sup>5</sup> D'après la modélisation Chemicalize

## c. Liste et propriétés physico-chimiques des néonicotinoïdes

Tout comme le choix de la liste des azoles, celui des néonicotinoïdes s'est avant tout porté sur leur autorisation et substances vendues ou achetées sur les sites d'étude de la thèse. La même démarche est adoptée à partir du Tableau 5 du chapitre 1 bibliographique et permet d'obtenir le Tableau 16. Les cyclozapride, dinotéfurane, flupyradifurone, huanyanglin, guadipyr, imidaclothiz, nitenpyrame, nithiazine, paichongding ne sont pas autorisés pour un usage agricole et n'ont pas été achetés dans la région de l'étude. En revanche, les cyclozapride, dinotéfurane, flupyradifurone, nitenpyrame ont été ajoutés à la liste puisqu'ils étaient déjà présents et développés au laboratoire. Les métabolites de 4<sup>ème</sup> génération soit le guadipyr, le huanyanglin et le cis-néonicotinoïde paichongding n'ont pas leur étalon analytique disponible et ne pourront donc pas être développés.

L'acétamipride a été vendu pour un usage sur grandes cultures tout comme l'imidaclopride et le thiaclopride. Ils seront donc analysés ainsi que le thiaméthoxame qui a un usage partagé bien que plus conséquent sur les vignes. Il s'agit d'ailleurs du seul néonicotinoïde à avoir été autorisé pour être appliqué sur les vignes. La clothianidine a été vendue et sera donc ajoutée à la liste. La coloration jaune lui a été attribué puisque ce produit phytosanitaire est autorisé à être appliqué sur grandes cultures. Tout comme les azoles, la précision d'autorisation d'application sur grandes cultures ou viticoles est supérieure à celle mentionnée dans le chapitre 1 bibliographie (Figure 8).

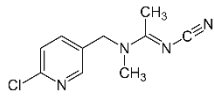
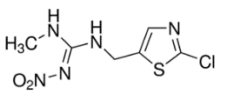
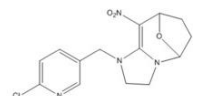
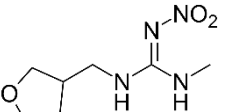
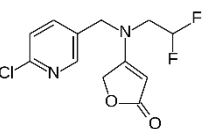
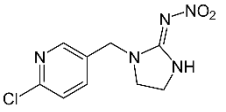
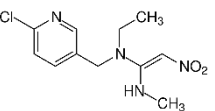
Tableau 16 : Quantités de substances actives néonicotinoïdes achetées en région Nouvelle-Aquitaine de 2013 à 2019 et vendues dans les deux départements Charente et Charente-Maritime en 2017 par types de culture

	Quantités de substances actives achetées en région Nouvelle-Aquitaine (kg)							Quantités de substances actives vendues dans les départements Charente et Charente-Maritime (kg)		
	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2017	2017 usage grandes cultures	2017 usage vigne
Acétamipride *	581	940	973	1019	1274	1318	597	100	14	0
Clothianidine *	56	26	10	25	16	15	0	0	0	0
Cyclozapride *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dinotéfurane *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flupyradifurone *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Guadipyr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Huanyanglin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Imidaclopride *	11306	28361	26212	21026	26865	383	36	16944	16918	0
Imidaclothiz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nitenpyrame *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nithiazine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paichongding	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sulfoxaflor *	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thiaclopride *	2252	20660	20996	20079	22679	13271	68	5688	5638	0
Thiaméthoxame *	5519	3120	3333	3790	3788	3115	25	1767	41	1723

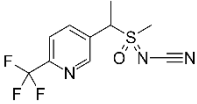
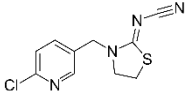
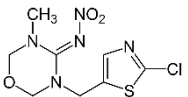
\*Molécules sélectionnées pour la liste des néonicotinoïdes. Produits phytosanitaires à usage sur grandes cultures (jaune), viticole (violet), les deux (bleu).

Les propriétés physico-chimiques de ces molécules sélectionnées sont décrites dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Propriétés physico-chimiques, réactivité et écotoxicologie des néonicotinoïdes étudiés dans le cadre de la thèse

Base			Propriétés physico-chimiques <sup>4</sup>					Réactivité			Ecotoxicologie <sup>4</sup>						
n° CAS	Formule brute	Formule chimique	Masse moléculaire (g/mol)	pKa à 25°C	log K <sub>ow</sub>	Solubilité aqueuse (mg/L)	Constante de Henry (Pa.m <sup>3</sup> /mol)	Pression de vapeur (mPa)	DT50 sol (jours) <sup>4</sup>	DT50 photolyse aqueuse (jours) <sup>4</sup>	DT50 hydrolyse aqueuse (jours) <sup>4</sup>	DT50 air (h)	BCF (L/kg)	NOEL oiseau (mg/kg p.c. jour)	DL50 orale oiseau (mg/kg)		
Acétamipride	135410-20-7	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>4</sub>		222,67	0,70	0,80	2950	5,3.10 <sup>-8</sup>	1,73.10 <sup>-4</sup>	1,6	34	> 365	3,36 <sup>1</sup> ; 1,7 <sub>2</sub>	22,25 <sub>5</sub>	9,5	98	
Clothianidine	210880-92-5	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S		249,70	11,1	0,905	340	2,9.10 <sup>-11</sup>	2,8.10 <sup>-8</sup>	545	0,1	> 365	0,9 <sup>2</sup>	0,78 <sup>5</sup>	56,8	430	
Cycloxapride	1203791-41-6	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>3</sub>		322,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dinotéfurane	165252-70-0	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>		202,21	12,6	-	0,549	39830	8,7.10 <sup>-9</sup>	1,7.10 <sup>-3</sup>	82	0,2	> 365	1,5 <sup>2</sup>	< 100	-	> 2000
Flupyradifurone	951659-40-8	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> ClF <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		288,68	-	1,2	3200	8,2.10 <sup>-8</sup>	9,1.10 <sup>-4</sup>	57,1	0,35	-	-	-	-	232	
Imidaclopride	138261-41-3	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>		255,66	-	0,57	610	1,7.10 <sup>-10</sup>	4.10 <sup>-7</sup>	191	0,2	> 365	0,85 <sub>2</sub> <sup>1</sup>	0,61	9,3	31	
Nitenpyrame	150824-47-8	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>		270,72	3,10	-0,66	590000	3,54.10 <sup>-13</sup>	0,0111	8	-	> 365	0,8 <sup>2</sup>	< 100	-	1124	

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Sulfoxaflor	946578-00-3	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> OS		277,27	-	0,802	568	5,77.10 <sup>-7</sup>	1,4.10 <sup>-3</sup>	2,2	-	-	-	< 100	-	676
Thiaclopride	111988-49-9	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> S		252,72	-	1,26	184	4,8.10 <sup>-10</sup>	3.10 <sup>-7</sup>	0,88	> 30	> 365	1,4 <sup>2</sup>	16,12 <sub>5</sub>	3,73	35
Thiaméthoxame	153719-23-4	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S		291,71	-	-0,13	4100	4,7.10 <sup>-10</sup>	6,6.10 <sup>-6</sup>	50	2,7	> 365	0,5 <sup>2</sup>	3,162 <sub>5</sub>	29,4	576

Légende des couleurs disponibles en Annexe 1, - : information non communiquée, BCF : Facteur de Bio-Concentration, CAS : Chemical Abstracts Service, DL50 : Dose Létale 50 %, DT50 : temps de demi-vie, K<sub>a</sub> : Constante de dissociation dans l'eau, K<sub>ow</sub> : Coefficient de partage octanol/eau, NOEL : No Observe Effect Level

<sup>1</sup> (Coscollà et al., 2013) déterminé par la méthode Atkinson, <sup>2</sup> Méthode de détermination non spécifiée (Coscollà et al., 2013), <sup>3</sup> A partir du logiciel AOPWIN développé par W. Meylan et P. Howard à partir du modèle d'Atkinson, <sup>4</sup> D'après la base de données PPDB, <sup>5</sup> D'après les informations fournies par l'INERIS

#### d. Liste et propriétés physico-chimiques des métabolites des néonicotinoïdes

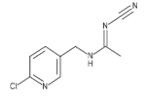
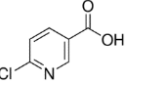
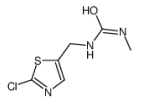
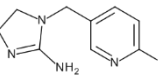
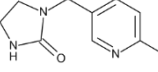
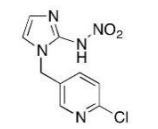
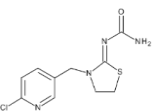
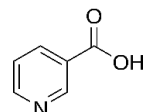
La liste des métabolites des néonicotinoïdes a été essentiellement réalisée à partir des molécules généralement analysées dans la bibliographie avec pour facteur limitant les étalons commerciaux disponibles.

De nombreux métabolites ont été référencés dans la littérature avec des étalons commerciaux disponibles. En revanche, le prix de ces standards a également été pris en compte pour le choix. Au vu d'un prix trop élevé pour ces molécules suivantes, elles n'ont pas été sélectionnées dans la liste finale : N-(6-chloronicotinoyl)-glycine, N-(2-(méthylsulfanyl)thiazole-5-carboxyl)-glycine, 4,5-dehydro-Imidaclopride, 4,5-dihydroxy-imidaclopride, 3-hydroxy-Imidaclopride (Taira et al., 2013).

Les propriétés physico-chimiques des métabolites retenus pour être analysés dans le cadre de la thèse sont présentées dans le Tableau 18. Pour ces molécules beaucoup d'informations sont manquantes.

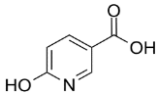
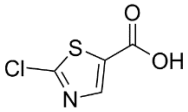
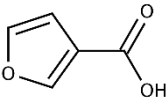
Il est important de noter que, certains de ces métabolites ont de faibles masses moléculaires et sont polaires. Ils nécessitent donc des conditions analytiques spécifiques.

Tableau 18 : Propriétés physico-chimiques, réactivité et écotoxicologie des métabolites néonicotinoïdes étudiés dans le cadre de la thèse

n° CAS	Base Formule chimique	Propriétés physico-chimiques <sup>4</sup>							Réactivité			Ecotoxicologie <sup>4</sup>		
		Masse moléculaire (g/mol)	pKa à 25°C	log K <sub>ow</sub>	Solubilité aqueuse (mg/L)	Constante de Henry (Pa.m <sup>3</sup> /mol)	Pression de vapeur (mPa)	DT50 sol (jours) <sup>4</sup>	DT50 photolyse aqueuse (jours) <sup>4</sup>	DT50 hydrolyse aqueuse (jours) <sup>4</sup>	DT50 air (h)	BCF (L/kg)	NOEL oiseau (mg/kg p.c. jour)	DL50 orale oiseau (mg/kg)
Acétamipride N-desmethyl	190604-92-3		208,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chloro-6-nicotinique acide (6-CNA)	5326-23-8		157,55	0,33 / 3,73 <sup>6</sup>	1,237 <sub>6</sub>	1430	-	1.10-10	4,7	-	-	17,35 jours <sup>2</sup>	-	-
Clothianidine urée	634192-72-6		205,67	0,41 / 13,27 <sub>6</sub>	0,513 <sub>6</sub>	1401 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Imidaclopride guanidine hypochloride	127202-53-3		247,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Imidaclopride urée	120868-66-8		211,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Imidaclopride oléfine	115086-54-9		253,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thiaclopride amide	676228-91-4		270,74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nicotinique acide	59-67-6		123,11	2,79 / 4,19 <sup>6</sup>	-2,34 <sub>5</sub>	15000 <sup>5</sup>	-	10000 <sup>5</sup>	-	-	-	16,28 jours <sup>2</sup>	-	-



Chapitre 2 : Matériel et méthodes

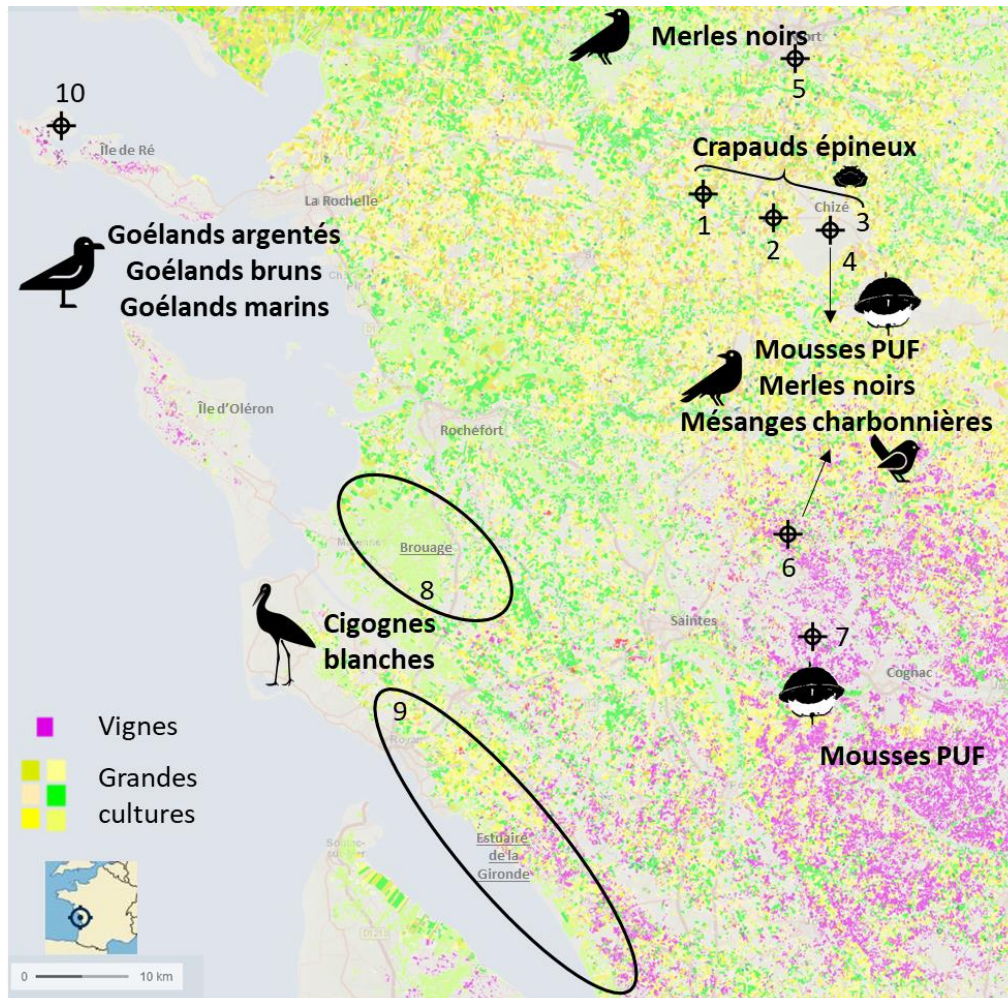
6-hydroxynicotinique acide (6-OHNA)	5006-66-6		139,11	3,13 / 11,31 <sup>6</sup>	- 0,548 <sup>6</sup>	15764 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	42,76 <sup>2</sup>	-	-	-
2-chloro(-1,3-)thiazole 5 carboxylique acide (2 CTCA)	101012-12-8		163,58	-1,32 / 3,2 <sup>6</sup>	1,336 <sup>6</sup>	985 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Furoïque-3 acide (3 FA)	488-93-7		112,08	4,31 <sup>6</sup>	0,771 <sup>6</sup>	32102 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	8,27 <sup>2</sup>	-	-	-

Légende des couleurs disponibles en Annexe 1, - : information non communiquée, BCF : Facteur de Bio-Concentration, CAS : Chemical Abstracts Service, DL50 : Dose Létale 50 %, DT50 : temps de demi-vie, K<sub>a</sub> : Constante de dissociation dans l'eau, K<sub>ow</sub> : Coefficient de partage octanol/eau, NOEL : No Observe Effect Level

<sup>1</sup> (Coscollà et al., 2013) déterminé par la méthode Atkinson, <sup>2</sup> Méthode de détermination non spécifiée (Coscollà et al., 2013), <sup>3</sup> A partir du logiciel AOPWIN développé par W. Meylan et P. Howard à partir du modèle d'Atkinson, <sup>4</sup> D'après la base de données PPDB, <sup>5</sup> D'après les informations fournies par l'INERIS, <sup>6</sup> D'après la modélisation Chemicalize

## 2. Echantillonnages

Les sites d'échantillonnage sont localisés en région Nouvelle-Aquitaine et plus précisément dans les départements Charente (17), Charente-Maritime (16) et Deux-Sèvres (79) (Figure 30).



- |   |   |
|---|---|
| 1 : Usseau (grandes cultures (GC))                        | 6 : Bercloux (vignes (V))   |
| 2 : Prissé-la-Charrière (grandes cultures (GC))           | 7 : Les Beguillères (vignes (V))                                    |
| 3 : Parc animalier Zoodyssé, Villiers-en-Bois (forêt (F)) | 8 : Brouage (B) (marais, élevages)                                  |
| 4 : CEBC, Villiers-en-Bois (forêt (F))                    | 9 : Estuaire de la Gironde (EG) (grandes cultures, vignes)          |
| 5 : Parc de Niort (urbain (U))                            | 10 : Réserve naturelle Lilleau des Niges, île de Ré (marin, côtier) |

Figure 30 : Registre parcellaire 2019 source Geoportail, accompagné des espèces dont leur sang et/ou plumes ont été échantillonnés ainsi que les échantillons de mousses PUF

Cette région a été définie dans le cadre d'un appel à projets de recherche (APR) menant au projet MULTISTRESS. Ce projet fédérateur réunit les expertises de trois unités de recherche régionales dont le laboratoire CEBC - UMR 7372 / CNRS – La Rochelle Université, le laboratoire EPOC - UMR 5805 / CNRS - Université Bordeaux et le laboratoire LIENSs - UMR 7266 / CNRS – La Rochelle Université. Son objectif est de mesurer les effets combinés des contaminants environnementaux et de l'état des habitats sur la biodiversité de la région. En effet, cette région et ces départements ont l'avantage de réunir une grande diversité d'habitats dont des zones urbaines, des forêts, des zones viticoles, des plaines céréalières ainsi que des zones littorales ou humides. Trois axes majeurs concernent ce projet avec pour premier d'établir l'état des lieux sur les contaminants (métaux, pesticides, composés fluorés, halogénés et leurs métabolites) présents dans les réseaux trophiques (amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères). Le deuxième axe porte sur l'interprétation de ces niveaux observés via la qualité des habitats et de l'écologie trophique. Le dernier axe repose sur l'estimation des effets de ces perturbations sur la physiologie, le comportement et la démographie des espèces ainsi que sur l'activité économique liée aux pratiques agricoles. Les résultats de cette thèse ne concernent pas tous ces axes pour toutes les molécules (seulement deux familles de pesticides concernées) mais pourront y contribuer à plus grande échelle.

Quelques échantillons d'une espèce d'amphibien, le crapaud épineux, ont été analysés bien que l'étude se soit focalisée sur les oiseaux dans une logique d'étude préliminaire. Les sites d'étude, les années de prélèvement, les espèces seront comparés. Plusieurs années d'échantillonnage pour une même espèce d'oiseau permettront la comparaison au fil du temps. Les résultats entre les espèces pourront également être observés dans le cas d'un échantillonnage sur un même site. Les abréviations suivantes seront employées pour caractériser le type de site d'étude : F pour Forêt, U pour Urbain, V pour Viticole, B pour Brouage et EG pour Estuaire de la Gironde. Sur l'échantillonnage d'une même espèce, différents sites de capture pourront être comparés.

Lors de leur capture, les caractéristiques telles que sexe, âge, lieu d'habitation, date de prélèvement sont notées. En ce qui concerne le sexe les abréviations suivantes seront mentionnées : M pour Mâle, F pour Femelle et J pour Juvénile lorsque le sexe n'a pas pu encore être déterminé. De plus, certains paramètres biométriques sont relevés : taille de l'individu, taille de son aile droite et gauche, masse. Les sang et plumes (pour les oiseaux) étant des matrices non destructrices sont prélevés avant de relâcher les individus. Tous les individus sont bagués pour pouvoir être identifiés pour, par exemple, étudier les liens entre la contamination et le devenir des individus échantillonnés. Ce baguage permet d'éviter également un double prélèvement dans un espace-temps proche. Si la quantité de sang le permet, des analyses physiologiques ont pu être réalisées au CEBC de déterminer le sexe par sexage molécule. La longueur des télomères ainsi que le taux de diverses hormones (hormones liées au stress, à la reproduction ou au métabolisme) ont pu être analysés si la quantité était suffisante. Une fois le sang prélevé sur le terrain, il est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 8000 g au laboratoire. Le plasma est ainsi obtenu et peut ensuite être conservé à -20 °C en attendant son analyse ultérieure au laboratoire EPOC.

Quant aux plumes, elles sont stockées à l'abri de la lumière soit au congélateur à -20 °C soit dans des enveloppes en papier.

a. Sites d'étude des amphibiens : crapauds épineux 

Au printemps 2018 et plus précisément au mois de mars, 11 crapauds épineux *Bufo spinosus* ont été capturés à Prissé-La-Charrière (site 2 de la Figure 30 : grandes cultures donc les individus peuvent normalement être exposés aux pesticides appliqués sur ces cultures) ainsi que 21 dans un site forestier (parc animalier Zoodyssé à Villiers-en-Bois situé au milieu du massif de la forêt de Chizé (site 3)).

En automne 2019, le sang de 24 individus a cette fois-ci été prélevé (octobre pour les mâles et novembre/décembre pour les femelles) sur des *Bufo spinosus* provenant de Usseau, site 1 (Figure 30) de grandes cultures où des pesticides sont normalement appliqués durant l'année. Ces mois de prélèvements sont les seuls possibles pour cette espèce car il s'agit de leur période de reproduction avec un accès facile pour les capturer autour des mares.

b. Sites d'étude des oiseaux

i. *Merles noirs*  et *mésanges charbonnières* 

D'avril à juillet de 2016, 2017 et 2019 des merles noirs (*Turdus merula*) et mésanges charbonnières (*Parus major*) ont été capturées dans des sites pré-sélectionnés grâce à un filet vertical japonais (Figure 31) dans le cadre des projets MULTISTRESS et VITIBIRD (ANR, F. ANGELIER). Il peut s'agir d'individus mâles ou femelles ainsi que d'adultes ou de juvéniles.



Figure 31 : Capture d'un merle noir dans le filet installé

Après la capture, une faible quantité de sang adaptée à la taille de l'espèce (1 % de sa masse maximale) est prélevée au niveau de la veine alaire à l'aide d'une aiguille et d'un tube capillaire. 150  $\mu$ L maximum de sang sont prélevés pour les mésanges, 600  $\mu$ L pour les merles.

Les deux plumes rectrices centrales (plumes centrales au niveau de la queue), et des plumes ventrales sont prélevées en tirant délicatement dessus. Pour les mésanges charbonnières, seules les plumes ventrales ont été prélevées.

En 2016 et pour un objectif de comparaison, ces captures ont eu lieu dans trois habitats d'intérêt : forêt de Chizé au CEBC (site n°4, Figure 30), parc urbain de Niort (site n°5, Figure 30) ainsi que viticole dans la région du Cognac dans la commune de Bercloux (site n°6, Figure 30). En 2019, seuls les sites n°4 et n°6 ont été collectés. En 2017, les captures ont été moins

fructueuses et plus difficiles à causes des conditions météorologiques. Les échantillons de sang et plumes de 2017 ont donc servi pour réaliser des tests méthodologiques.

L'objectif étant de comprendre la contamination des sites viticoles en considérant les problématiques d'impact toxique (perturbateurs endocriniens) : la priorité d'analyse s'est portée sur les azoles dû à leur usage important (fréquence et quantité). Le volume de plasma étant faible pour les mésanges, seuls les azoles ont été analysés avec le protocole 10  $\mu$ L. Tous les plasmas de merles noirs ont été analysés en azoles avec le protocole 25  $\mu$ L et seulement quelques échantillons sélectionnés ont été analysés en néonicotinoïdes et certains métabolites des néonicotinoïdes.

Quant aux plumes, celles des mésanges, en trop faible quantité n'ont pu être analysées avec le protocole sélectionné (notamment en raison des étapes préliminaires de nettoyage et de broyage). Certaines plumes merles ont été sélectionnées pour y analyser les azoles, néonicotinoïdes et certains métabolites avec le protocole 20 mg prise d'essai.

L'échantillonnage varié des merles noirs sur trois sites bien distincts permettra de les comparer. Les années pourront également être mises en parallèle pour un même site viticole. Sur ce même site et pour les mêmes années, les concentrations en azoles pour les deux espèces merles et mésanges pourront être confrontées.

## ii. Goélands

De 2016 à 2020, diverses espèces de goélands uniquement adultes : argentés (*Larus argentatus*), bruns (*Larus fuscus*), marins (*Larus marinus*) ont été bagués à la réserve naturelle Lilleau des Niges au Nord de l'Île de Ré (Site 10, Figure 30). Ils seront appelés par la suite GA, GB et GM respectivement. Ces captures puis relâches sont gérées par le CEBC en partenariat avec la Ligue pour la Protection des Oiseaux (LPO) et s'inscrivent dans le cadre du projet MULTISTRESS (Sebastiano et al., 2021). Elles sont possibles de fin mai à début juin lors de la période de reproduction où les adultes sont capturés grâce à un piège durant l'incubation des œufs. En 2017 (n = 10), 2018 (n = 10) et 2019 (n = 1), certains individus ont été munis d'une balise GPS permettant d'appréhender au mieux leurs déplacements et zones d'alimentation. Les goélands marins utilisent principalement la zone littorale, dans le Pertuis Charentais, tandis que les goélands argentés : une gamme étendue d'habitats, incluant le littoral, les villes (décharges) et des zones agricoles. Enfin, les goélands bruns sembleraient avoir deux stratégies alimentaires distinctes soit une prospection en mer, derrière les bateaux de pêche soit dans les champs, derrière les tracteurs.

2 mL de sang ont été prélevés pour chaque goéland adulte au niveau de la veine allaire à l'aide d'une aiguille de calibre 25 et d'une seringue.

Des plumes ventrales et dorsales ont été collectées pour les années 2016, 2019 et 2020. De façon à augmenter la masse d'échantillon disponible, ces deux types de plumes peuvent être réunis pour les extractions puisque leurs mues se produisent à la même période de l'année (Harris, 1971).

Les azoles, les néonicotinoïdes et certains métabolites de néonicotinoïdes ont été analysés dans ces échantillons de plasma (protocole 25  $\mu$ L) et de plumes (protocole 20 mg). Pour les goélands, la problématique portera sur la comparaison des trois espèces qui exploitent des habitats distincts.

### iii. Cigognes blanches

De fin mai à fin juin 2019, soit pendant la période de reproduction, 167 poussins de cigognes blanches (*Ciconia Ciconia*) âgés de 30 jours à 45 jours ont été bagués directement dans leur nid. Un seul adulte reproducteur a pu être bagué car ils sont très difficilement capturables. Deux zones de capture sont localisées dans la région Nouvelle-Aquitaine. Le premier site (n°8 de la Figure 30) représente une zone de marais de Brouage (environ 70 km<sup>2</sup>) composée de zones humides, prairies, marais d'eau douce, de petits plans d'eau et cours d'eau. Très peu d'agriculture est présente sur ce site (< 1 %). Le deuxième site (n°9 de la Figure 30) est situé au Nord de l'estuaire de la Gironde avec une surface d'environ 55 km<sup>2</sup>. Il est composé d'une mosaïque mixte de terres agricoles (dont des grandes cultures), de vignes, de prairies ainsi que de zones humides et de cours d'eau.

Un site internet a été créé afin de réunir l'historique des observations des cigognes blanches baguées et ainsi connaître leurs zones d'exploitation de l'habitat (<http://ciconiafrance.fr/index.php>). Pendant la période de reproduction, la zone de prospection pour la nourriture est dans un rayon maximum de 4/5 km autour du nid.

Avant d'être replacés dans le nid, les poussins de cigognes blanches sont mesurés puis 2 mL de leur sang sont prélevés sur la veine au niveau du tarse à l'aide d'une seringue de 2,5 mL munie d'une aiguille 23 G et enfin 6 plumes de contour sont sélectionnées. Ces dernières poussent dans les 15 à 20 jours après l'éclosion. Au mois de juin, date de prélèvement, la plume pousse toujours et est finalement stable à partir de 50 jours.

Un panel de ces échantillons de plasma et de plumes a été sélectionné de manière à balayer les deux sites d'étude et différents nids. Au total, 31 échantillons de plasma (11 pour Brouage et 20 pour l'estuaire de la Gironde) ont été analysés avec le protocole 25 µL. Le volume disponible pour cette espèce étant élevé, les trois méthodes plasma (azoles, néonicotinoïdes et leurs métabolites) ont pu être réalisées. Parmi ces mêmes individus, 20 plumes (10 pour le site n°8 Brouage et 10 pour de site n°9 de l'estuaire de la Gironde) ont été analysées avec le protocole 20 mg. Pour cette espèce, ces deux sites d'étude pourront être comparés.

### c. Sites d'étude des échantillonneurs passifs

Avoir accès aux listes des pesticides appliqués sur les sites étant compliqué, des échantillonneurs passifs de type mousse en PUF (Polyurethane Foam en anglais) ont été installés pour l'étude sur les merles noirs (comparaison des habitats viticoles, forestiers et urbains). Avant d'être placés dans l'environnement étudié, sous soucoupe en métal pour les protéger à 1,20 m de hauteur, ces échantillons ont préalablement été conditionnés par la méthode d'extraction par solvant accélérée (ASE) avec le dichlorométhane comme solvant. Trois sites ont été étudiés dont les deux premiers sont identiques à ceux de capture des merles noirs et mésanges charbonnières : site n°4 forestier, le site n°6 viticole et le site n°7 également viticole dont leur localisation sont sur la Figure 30. Du fait de la haute fréquentation publique et des risques associés, le site n°5 urbain n'a pas pu être équipé de mousses PUF. La Figure 32 illustre les cultures présentes aux alentours de ces trois sites d'échantillonnage de l'air.

Pour le site n°4 forestier, quelques rares cultures céréalières sont présentes au-delà d'un rayon d'un km. Le site n°6 est entouré de zones viticoles ainsi que de cultures céréalières alors que le site n°7 est quasi exclusivement viticole.

De septembre 2016 jusqu'à juillet 2017, des mousses PUF ont été exposées chaque mois. Le nombre de jours total d'application sur site a été relevé. Ainsi, 9 mousses PUF par site ont été exposées ainsi que 9 blancs mousses PUF non exposés. Les concentrations obtenues permettront de connaître les pesticides présents dans l'air et seront comparés à ce qui est retrouvé dans les matrices biologiques.



Figure 32 : Cultures présentes aux alentours des sites de prélèvement d'air mousses PUF – source géoportail 2019

#### d. Expérimentations en laboratoire

##### i. *Moineaux domestiques – Tébuconazole*

Les individus étudiés proviennent d'une colonie de moineaux domestiques (*Passer Domesticus*) vivant dans des volières situées en extérieurs au CEBC. Cette expérience a été réalisée par François BRISCHOUX et Frédéric ANGELIER avec pour but d'examiner l'impact du tébuconazole sur la physiologie des individus. Leur condition corporelle, la qualité de leur plumage et leur métabolisme ont été notamment observés.

Des moineaux sont abrités au sein d'une volière contrôle se désaltérant avec une eau de boisson sans tébuconazole et d'autres au sein d'une volière dite expérimentale dans laquelle les individus boivent de l'eau volontairement contaminée en tébuconazole. Cette eau de boisson a été changée une fois par semaine. Le sang de quatre individus par groupe a été prélevé en fin d'expérience sur la veine brachiale à l'aide d'aiguille de calibre 27 et d'un micro-capillaire.

Cette expérience a été menée en 2020 (Figure 33) avec une concentration unique de 1 mg/L en tébuconazole. Au bout de 6 mois d'expérience, le sang a été prélevé pour les deux groupes. Lors de cette expérience, 2 plumes rectrices pour tous les individus ont été collectées au bout de 5 mois d'expérience et également au bout de 6 mois. Les plumes post expérience se sont donc formées pendant l'exposition au tébuconazole.

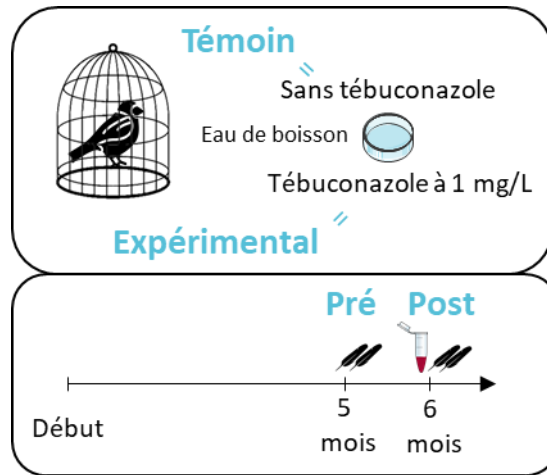


Figure 33 : Schéma de l'expérience d'exposition au tébuconazole des moineaux domestiques via l'eau de boisson

Que ce soit le plasma ou les plumes, les masses d'échantillons sont trop faibles pour les protocoles appliqués : les échantillons ont donc été réunis par groupe pour pouvoir être analysés en tébuconazole (protocole 25  $\mu$ L pour le plasma et protocole 10 mg pour les plumes). Les échantillons post expérience (plasma et plumes) ont été analysés en tébuconazole pour déterminer l'effet de la concentrations d'exposition sur les concentrations retrouvées dans ces matrices.

La procédure a été approuvée par les autorités françaises (autorisation fournie par le COMETHEA : R-45GRETA-F1-10).

## ii. *Diamant mandarin – Imidaclopride*

L'expérience d'exposition des diamants mandarins (*Taeniopygia guttata*) à l'imidaclopride a été réalisée par Thomas ZGIRSKI à l'aide des volières situées à l'Université de Québec à Rimouski (UQAR) de novembre 2016 à mars 2019. Son objectif était de comprendre l'interaction entre l'exposition à l'imidaclopride par une réduction de la ressource alimentaire sur la croissance et le métabolisme des jeunes en observant entre autres leur pourcentage de graisse (Zgirski et al., 2021).

Des diamants mandarins adultes se sont reproduits et l'expérience a été réalisée sur leur progéniture (10 individus « témoin » et 10 « traité »). Tous les oiseaux ont été nourris tous les jours avec de l'huile de maïs. La masse de nourriture a été calculée en fonction de la masse de chaque individu et a été administrée par voie orale, utilisant une micropipette munie d'un cône de 100  $\mu$ L. Le groupe traité a ingéré de l'huile de maïs dopée à 205 ng/g en imidaclopride à partir du jour 4 après éclosion jusqu'au jour 30. Cette dose correspond à 0,5 % DL50 du moineau domestique (DL50 = 50 mg/kg). L'imidaclopride a été fourni par Toronto Research Chemicals au Canada.

Des échantillons de sang sont collectés aux jours 15 et 30 post éclosion pour les deux groupes sur la veine brachiale à l'aide d'aiguille de calibre 27 et d'un micro-capillaire. Le volume de plasma J15 est plus faible puisque l'animal était plus petit et léger. En effet, le volume de sang à prélever ne doit pas excéder 1 % de la masse totale de l'individu.



Le volume restant après les diverses analyses biologiques étant trop faible pour pouvoir réaliser une analyse chimique, ces dernières analyses ont donc été réalisées sur seulement les échantillons de plasma prélevés à J30. Pour avoir un volume plus conséquent, plusieurs échantillons ont été regroupés et poolés de façon équitables (même volume prélevé pour chacun des échantillons). Comme cette expérience a été réalisée en doublon, deux lots de plasma ont été obtenus et ont été analysés en imidaclopride et certains métabolites avec le protocole 25  $\mu$ L de prise d'essai.

Toute la procédure expérimentale a été approuvée par UQAR Animal Care Committee (COA-67-16-180).

### 3. Liste des références du matériel utilisé

#### a. Solvants et réactifs

Au cours de ces travaux, différents réactifs et solvants ont été utilisés et sont listés dans le Tableau 19. Ils sont tous de haute pureté analytique.

Tableau 19 : Marque et fournisseur des différents réactifs et solvants utilisés

Type	Nom	Marque (fournisseur)
Réactif	Acétate d'ammonium	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
	Acide formique	LiChropur (Merck, Darmstadt, Allemagne)
	Acide acétique	Scharlau (ICS, Belin Belet, France)
	Acide chlorhydrique	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
	Formate d'ammonium	Agilent Technologies (Les Ulis, France)
Solvant	Eau ultra-pure = Eau MQ	Produite au laboratoire à l'aide d'un système Milli-Q Milipore muni d'un filtre EDS-Pak et d'un Q-Pod comme distributeur
	Acétonitrile (ACN)	Baker (Atlantic Labo, Eysines, France)
	Méthanol (MeOH)	Baker (Atlantic Labo, Eysines, France)
	Ethanol (EtOH)	Scharlau (ICS, Belin Belet, France)
	Dichlorométhane (DCM)	Scharlau (ICS, Belin Belet, France)
Gaz	Azote 4.5	Linde Gas (Saint Priest, France) et Messer (Carbon Blanc, France)

#### b. Standards analytiques

Les étalons analytiques ainsi que les étalons internes deutérés (Tableau 20) ont été principalement fournis par Cluzeau Info Labo (CIL) et ont tous des puretés supérieures à 97 % exceptés le cyclozapride, l'imidaclopride guanidine ainsi que le flutriafol.

Pour les composés conditionnés en cristaux, soit la plupart de ceux-ci, une solution stockée au congélateur a été réalisée à 100  $\mu$ g/g en méthanol. Pour ce faire, une microbalance a été utilisée et permet de peser à 0,1  $\mu$ g près. Seuls les trois étalons internes deutérés des azoles sont obtenus directement auprès du revendeur en solution à 1000 ng/ $\mu$ L en acétone. Parmi cette liste, certaines molécules ont déjà été développées au laboratoire et d'autres ont dû l'être.

Tableau 20 : Pureté et fournisseur des standards analytiques

	n° CAS	Pureté (%)	Fournisseur (Fabricant)	Cristaux/Solution	
A	Bitertanol	55179-31-2	98,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Bromuconazole	116255-48-2	99,9	Techlab (HPC)	Cristaux
	Cyproconazole	94361-06-5	98,2	Techlab (HPC)	Cristaux
	Difénoconazole	119446-68-3	99,5	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Epoxiconazole	106325-08-0	99,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Fenbuconazole	114369-43-6	99,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Fluquinconazole	136426-54-5	98,5	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Flusilazole	85509-19-9	99,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Flutriafol	76674-21-0	94,5	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Imazalil	35554-44-0	97,5	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Ipconazole	125225-28-7	99,8	Techlab (HPC)	Cristaux
	Metconazole	125116-23-6	99,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Myclobutanil	88671-89-0	99,5	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Penconazole	66246-88-6	99,2	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Prochloraze	67747-09-5	99,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Propiconazole	60207-90-1	97,5	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Prothioconazole	178928-70-6	98,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Tébuconazole	107534-96-3	98,5	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Tétraconazole	112281-77-3	98,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Triadiméfon	43121-43-3	99,5	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
Triadiménol	55219-65-3	98,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux	
Triticonazole	131983-72-7	99,9	Techlab (HPC)	Cristaux	
				Solution à 1000 ng/µL dans l'acétone	
A EI	Fenbuconazole d5	98,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)		
	Propiconazole d5	95,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)		
	Tébuconazole d6	96,5	CIL (Dr Ehrenstorfer)		
	Metconazole d6	97,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux	
	Penconazole d7	97,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux	
N	Acétamipride	135410-20-7	99,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Clothianidine	210880-92-5	99,3	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Cycloxapride	1203791-41-6	95,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Dinotéfurane	165252-70-0	99,9	Techlab (HPC)	Cristaux
	Flupyradifurone	951659-40-8	99,9	Techlab (HPC)	Cristaux
	Imidaclopride	105827-78-9	99,5	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
		138261-41-3			
	Nitenpyrame	150824-47-8	99,1	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Sulfoxaflor	946578-00-3	97,8	Techlab (HPC)	Cristaux
	Thiaclopride	111988-49-9	97,0	CIL (A2S)	Cristaux
Thiaméthoxame	153719-23-4	98,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux	
N EI	Acétamipride d3	99,0	CIL (CDN Isotopes)	Cristaux	
	Clothianidine d3	Chimique : 99 Deutérée : 99,7	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux	
	Imidaclopride d4	98,8	CIL (CDN Isotopes)	Cristaux	
	Thiaclopride d4	Chimique : 99 Deutérée : 99,8	CIL (CDN Isotopes)	Cristaux	
	Thiaméthoxame d3	99,0	CIL (CDN Isotopes)	Cristaux	
M	Acétamipride N desmethyl	190604-92-3	99,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Chloro-2-1,3-thiazole-5 carboxylique acide	101012-12-8	98,0	CIL (Toronto Research Chemicals)	Cristaux
	6-chloronicotinique acide	5326-23-8	99,6	CIL (A2S)	Cristaux
	Clothianidine urée	634192-72-6	98,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Furoïque-3 acide	488-93-7	98,0	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Imidaclopride guanidine	127202-53-3	83,9	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Imidaclopride oléfine	115086-54-9	98,7	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Imidaclopride urée	120868-66-8	99,7	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Nicotinique acide	59-67-6	99,9	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	6-hydroxy nicotinique acide	5006-66-6	99,8	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux
	Thiaclopride amide	676228-91-4	99,6	CIL (Dr Ehrenstorfer)	Cristaux

A : Azoles, A EI : Azoles Etalons Internes, CIL : Cluzeau Info Labo, M : Métabolites des néonicotinoïdes, N : Néonicotinoïdes

### c. Verrerie et petits appareils

La verrerie et les petits appareils similaires à tous les protocoles de préparation d'échantillons sont développés en suivant dans cette partie.

La verrerie provient essentiellement de Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Les flacons d'injection 1,5 mL proviennent de Chromoptic (Courtabœuf, France) tout comme les restricteurs de 300 et 500  $\mu$ L en verre. Les septa silicone ont été fournis par Agilent Technologies et ceux en téflon par Interchim (Montluçon, France). Les pipettes pasteurs en verre viennent de VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Gilson (Villiers Le Bel, France) est la marque des différentes pipettes utilisées avec leurs cônes appropriés.

Toutes les solutions avant utilisation ont été décongelées et homogénéisées en restant 10 minutes dans un bain à ultrason de chez VWR. Puis, ces solutions ainsi que les échantillons ont été vortexés avant prélèvement.

En fin de protocole, si le solvant doit être évaporé soit le Rapidvap de Labconco (Illkirch, France) soit le flux d'azote à l'aide d'un portoir thermostaté avec soufflerie Agitelec Toulemonde (Mery-Sur-Oise, France) ont pu être utilisés.

## 4. Protocoles de préparation, d'extraction et de purification des échantillons

### a. Protocole d'extraction plasma

La préparation et l'extraction des échantillons plasmatiques doivent être réalisées le jour J de l'analyse. Il est à noter que, les précautions à prendre pour l'analyse des azoles sont en plus grand nombre que pour l'analyse des néonicotinoïdes. Par exemple, les flacons d'injection doivent absolument être neufs et calcinés pour les azoles, alors que pour l'analyse des néonicotinoïdes ceux-ci peuvent être recyclés puis calcinés. Cette calcination est réalisée pendant 6 heures à une température consigne de 450 °C au sein d'une étuve (Carbolite, Angleterre).

#### Références des consommables :

Les eppendorfs 1,5 mL à usage unique proviennent de Dutsher (Bernolsheim, France) et ont pour nom de référence Microtube 1,5 mL PP easy fit naturel. Ces eppendorfs doivent être préalablement pré-lavés à l'acétonitrile s'ils sont employés pour l'analyse des azoles afin d'éliminer les éventuels interférents.

Des eppendorfs 1,5 mL avec filtre ont été testés mais n'ont pas été conservés dans le protocole final. En effet, des interférences ont été générées avec ces filtres pour les azoles. Il s'agissait de Spin-X-centrifuge Costar avec des filtres en Nylon de 0,22  $\mu$ m de Corning Incorporated (New-York, USA).

#### Références du petit matériel :

Seule une centrifugeuse Mikroliter de Hettich (Tuttlingen, Allemagne) est utile en plus de l'équipement de base préalablement référencé. Son accélération unique de 15000 g permet la centrifugation des extraits dans les eppendorfs de 1,5 mL.

Références des plasmas de référence :

Différents plasmas de référence ont été testés et proviennent tous de chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Le plasma de poulet a été celui régulièrement utilisé mais des plasmas de bœuf, de chat, de cochon et de rat ont été testés. Ils sont conditionnés sous forme de plasma lyophilisé à laquelle de l'eau MQ doit être ajoutée avant utilisation.

Protocole 25  $\mu$ L prise d'essai :

Sont à ajouter dans l'éppendorf : l'acétonitrile pour compléter à un volume total de 150  $\mu$ L (donc à soustraire les volumes de solution ajoutés préparés dans l'acétonitrile), 30  $\mu$ L d'une solution d'EI à 1 ng/g et enfin 25  $\mu$ L de matrice. Cette matrice peut soit être de l'eau MQ, le plasma de référence ou encore le plasma échantillon. Les différents volumes ajoutés sont pesés. L'éppendorf est centrifugé pendant 10 minutes et son surnageant est transféré à la pipette pasteur dans un flacon d'injection pré-rempli avec 1050  $\mu$ L d'eau MQ. Le volume total de l'extrait dilué est donc de 1200  $\mu$ L dans lequel deux injections de 600  $\mu$ L sont possibles avec l'extraction sur phase solide (SPE) en ligne.

La conservation des extraits peut éventuellement être réalisée en transférant le surnageant de l'éppendorf dans un flacon d'injection à conserver au congélateur puis le jour de l'analyse les 1050  $\mu$ L d'eau MQ sont ajoutés.

Protocole 10  $\mu$ L prise d'essai :

Ce protocole adapté a été employé pour analyser les azoles dans le plasma des mélanges charbonnières puisque la quantité de plasma disponible était restreinte pour cette espèce. Le volume total d'acétonitrile est de 45  $\mu$ L, la prise d'essai de 10  $\mu$ L de plasma et 600  $\mu$ L d'eau MQ sont ajoutés pour la dilution. Une seule injection de 600  $\mu$ L est donc réalisable sur cet extrait en SPE en ligne.

Comparaison des deux protocoles

Finalement, la Figure 34 résume les différentes étapes du protocole pour extraire les pesticides étudiés en matrice plasma.

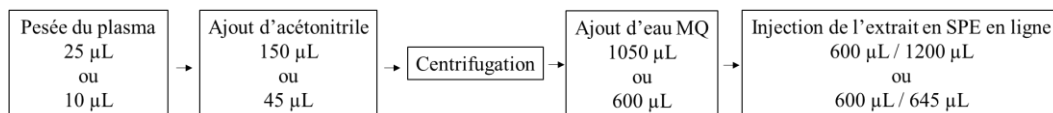


Figure 34 : Etapes du protocole d'extraction en matrice plasma

Différentes caractéristiques de ces deux protocoles peuvent être notées et comparées (Tableau 21). L'acétonitrile est ajouté au plasma de façon à précipiter ses protéines. En revanche, ce pourcentage d'acétonitrile dans l'extrait final a un fort impact puisque le chargement de celui-ci en SPE en ligne est opéré sur une cartouche apolaire. Plus le pourcentage d'acétonitrile sera élevé, moins les molécules seront retenues sur la cartouche. Finalement, le rapport volume total/volume de plasma traduit la dilution de ce dernier et entrainera donc un effet matriciel plus ou moins important.

Tableau 21 : Caractéristiques des deux protocoles (25 et 10  $\mu$ L) de préparation du plasma

Protocole	Volume d'ACN ( $\mu$ L)	Rapport ACN/plasma	% ACN dans l'extrait final	Rapport volume total /plasma
25 $\mu$ L prise d'essai	150	6	12,5 %	48
10 $\mu$ L prise d'essai	45	4,5	6,8 %	66

ACN : Acétonitrile

### Injection de l'extrait :

Pour ces deux protocoles, l'extrait est ensuite positionné directement sur le portoir de la SPE en ligne. Celle-ci permet une automatisation de la purification avec un volume d'échantillon élevé ainsi qu'une pré-concentration. Les conditions de ce module seront développées au sein de la partie analyse.

## b. Protocoles de préparation et d'extraction des plumes

### i. Préparation des plumes

Le protocole de préparation des plumes est commun à toutes les plumes et ce quel que soit le protocole d'extraction réalisé (20 ou 10 mg de prise d'essai). Les appareils sont précisés dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Références des appareils spécifiques au protocole préparation des plumes

Nom appareils ou consommables	Marque
Incubateur	Memmert (Schwabach, Allemagne)
Ioniseur antistatique	CEM (Orsay, France)
Broyeur à bille MM200	Retsh de Atlantic Labo (Eysines, France)
Bols inox 10 mL et billes 10 inox mm du broyeur	

Pour réaliser une matrice plume de référence, des plumes de poulet ont été collectées à l'abattoir Brun à Etaulier, France. Celles-ci ont suivi le même protocole de pré-lavage puis de broyage que les plumes échantillons.

Ce protocole (Figure 35) a débuté par un lavage trois fois à l'eau MQ par agitation horizontale. Les plumes ont ensuite été séchées à l'incubateur à 60 °C pendant une nuit. Une fois sèches, la partie calamus de la plume a été ôtée avec des ciseaux de dissection puis le reste de la plume a été prédécoupé en morceaux de 1 mm de longueur. Ces morceaux ont été déposés dans le bol du broyeur à bille. Pour faciliter cette étape, l'ioniseur antistatique peut être placé à côté afin d'éliminer l'électricité statique. Le bol auquel a été ajoutée une bille a été inséré dans le broyeur à bille pendant 5 minutes à une fréquence de 30 Hz. Les plumes broyées ont été conservées au congélateur dans un flacon ambré de 3 mL. Entre chaque échantillon, les ciseaux, le bol ainsi que la bille ont été nettoyés trois fois à l'éthanol.

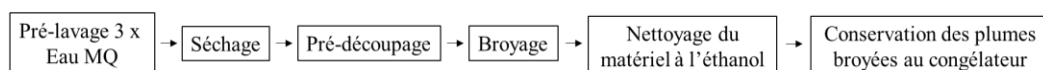


Figure 35 : Etapes du protocole de préparation des plumes

## ii. Extraction des plumes

Pour l'extraction des plumes sous forme de poudre, trois protocoles employant différentes technologies ont été comparés à savoir la technologie micro-ondes (MO), Edge et ultrasons (US). Leurs principes respectifs ont été développés dans le chapitre bibliographique. La Figure 36 résume les protocoles d'extraction selon la technologie employée qui seront décrits plus en détail dans les parties respectives suivantes.

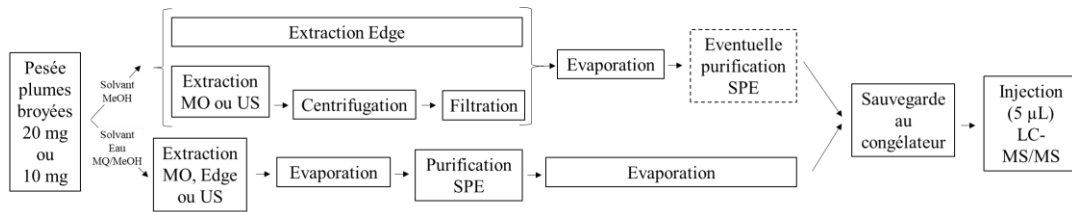


Figure 36 : Etapes des différents protocoles d'extraction des plumes

### 1. Protocole assisté par micro-ondes

Le protocole utilisant l'énergie micro-ondes (MO) est celui qui a été retenu pour l'extraction des plumes. Le matériel nécessaire est détaillé Tableau 23.

Tableau 23 : Références des appareils spécifiques au protocole d'extraction assistée par micro-ondes des plumes

Nom appareils ou consommables	Marque
Start E extraction assistée par micro-ondes et leur matra <sup>TM</sup>	Milestone (Soriso, Italie)
Grande centrifugeuse - Universal 32R	Hettich (Tuttlingen, Allemagne)
Tubes 15 mL pour centrifugation	Dutsher (Bernolsheim, France)

20 mg de plumes broyées sont pesés directement dans un matra <sup>TM</sup> préalablement conditionné la veille avec le programme 100 % méthanol. Ce programme 100 % méthanol inclut une première rampe de 5 minutes à une puissance de 450 W, puis une deuxième rampe de 5 minutes à 400 W et enfin un cycle de refroidissement de 10 minutes. Les étalons internes sont pesés et ajoutés de façon à réaliser une quantification par étalonnage interne. Puis, les natifs sont également pesés et ajoutés dans certains matra <sup>TM</sup> (témoin solvant, « spike » solvant, « spike » en matrice) de façon à évaluer les rendements d'extraction/quantification. 12 mL de méthanol sont prélevés et une fois les matra <sup>TM</sup> installés dans le Start E, le programme micro-ondes 100 % méthanol est lancé. Les 12 mL de surnageant sont ensuite transférés à la pipette pasteur dans un tube à centrifuger. L'extrait est centrifugé pendant 15 minutes à 3000 RPM (pour Rotations Per Minute en anglais). La phase liquide est transférée à l'aide d'une pipette pasteur remplie de laine de verre provenant d'Atlantic Labo (Eysines, France) dans un flacon, sachant que la laine de verre doit être au préalable lavée au dichlorométhane. Le flacon est déposé sur un bloc chauffant à 48 °C pour évaporer le méthanol sous flux d'azote jusqu'à un volume de 300 µL. L'évaporation ne doit surtout pas aller à sec. Le volume restant est transféré à la pipette pasteur dans un flacon d'injection muni d'un restricteur de 500 µL. 200 µL de méthanol sont ajoutés pour rincer les parois du flacon et sont additionnés au volume déjà présent dans le restricteur. La combinaison des extraits est réévalué jusqu'à un volume final de 300 µL. Il est ensuite conservé au congélateur en attendant son analyse par LC-MS/MS nécessitant d'un volume d'injection de 5 µL.

Le protocole 10 mg pour l'analyse du tébuconazole seul dans les plumes est identique à celui-ci en ayant juste une prise d'essai de 10 mg au lieu de 20 mg.

Les extraits plumes n'ont pas été purifiés. Dans le cas où cette étape de purification est requise : 100  $\mu$ L de ces extraits en méthanol peuvent être dilués dans de l'eau MQ pour une purification SPE, comme détaillé dans la partie purification SPE.

Cette purification peut également directement s'enchaîner après l'étape d'extraction à condition que l'extrait soit aqueux. Pour ce faire, l'extraction MO est réalisée avec 12 mL d'un mélange méthanol/Eau MQ (v:v) avec le programme MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50) qui inclut une première rampe de 5 minutes à une puissance de 400 W, puis une deuxième rampe de 5 minutes à 350 W et enfin un cycle de refroidissement de 10 minutes. Le surnageant est alors transféré dans des tubes ASE pour réaliser une évaporation au rapidvap. Les 6 mL de méthanol sont évaporés pendant environ 30 minutes. La purification SPE peut se réaliser sur les 6 mL d'eau MQ restants. A noter qu'aucune étape de centrifugation/filtration n'est nécessaire pour ce protocole puisque la cartouche SPE pourra jouer ce rôle.

## 2. *Protocole Edge*

L'extracteur Edge, les Q-Cup ainsi que les Q-disc sont de la marque CEM (Orsay, France). Un assemblage de Q-disc (C9 + G1 + C9 sachant que les lettres signifient le matériau : C pour la cellulose et G pour le verre) est déposé dans chaque Q-Cup. Cette combinaison de Q-disc est celle préconisée par le fabricant CEM comme universelle. 20 mg de plumes broyées sont pesés directement dans la Q-Cup auxquels sont ensuite ajoutés les étalons internes voire les natifs en fonction du besoin. Les Q-Cup sont installées sur le rack de l'extracteur Edge et l'extraction méthanol est lancée. Le programme méthanol est composé d'une addition de 10 mL par le haut de la Q-Cup et de 5 mL par le bas. La température d'extraction est fixée à 90 °C et dure 3 minutes. Puis, 5 mL de méthanol sont ajoutés pour le rinçage de la Q-Cup. Un volume total de 20 mL de méthanol compose donc chaque extrait. A ce stade, la centrifugation est inutile comme les Q-disc ont permis une filtration. En revanche, l'extrait est quand même passé au travers d'un entonnoir rempli de laine de verre préalablement rincée au dichlorométhane. Une évaporation au rapidvap puis au flux d'azote est réalisée pour atteindre un volume final de 300  $\mu$ L dans un flacon avec restricteur en rinçant les parois successivement. L'extrait est conservé au congélateur pour ensuite être analysé en LC-MS/MS avec un volume d'injection de 5  $\mu$ L.

Dans le cas où une étape de purification est ajoutée, le solvant d'extraction méthanol est alors remplacé par un mélange méthanol/Eau MQ (v:v). Après l'étape du rapidvap, c'est sur les 10 mL d'eau MQ restant que la purification sur phase solide SPE est réalisée.

### 3. Protocole ultrasons

Pour le protocole d'extraction par ultrasons, un grand bain ultrasons VWR est utilisé. Plus spécifiquement, 20 mg de plumes broyées sont pesées dans tube 60 mL. Les EI et/ou natifs sont ajoutés et pesés. 5 mL de méthanol sont additionnés pour réaliser une extraction US pendant 30 minutes. 5 mL d'eau MQ sont ajoutés pour réaliser un changement de solvant et les 10 mL sont transférés à la pipette pasteur dans un tube pour être centrifugés pendant 15 minutes à 3000 RPM. Le surnageant est filtré au travers une pipette pasteur remplie de laine de verre préalablement lavée au dichlorométhane. Le tube est déposé dans le rapidvap pour évaporer les 5 mL de méthanol et obtenir 5 mL d'eau MQ restants. Avec cet extrait aqueux, une purification sur cartouche solide peut être réalisée.

#### c. Protocole d'extraction des mousses PUF

Les mousses PUF sont extraites avec le protocole d'Extraction par Solvant Accélérée (ASE) décrit ci-dessous (Figure 37).

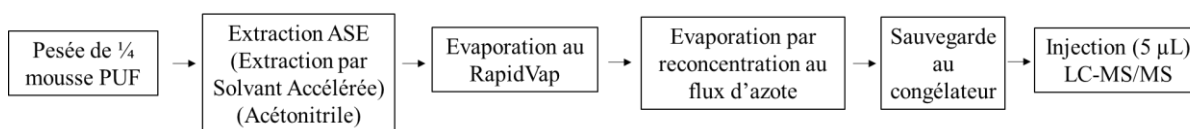


Figure 37 : Etapes du protocole d'extraction des mousses PUF

Le petit matériel et les consommables du Tableau 24 ont été employés dans ce protocole.

Tableau 24 : Références des appareils et consommables spécifiques au protocole d'extraction ASE des mousses PUF

Nom des appareils et consommables	Marque
Mousses PUF	Tisch Environmental (Cleves, Etats-Unis)
ASE Dionex 350	
Cellules ASE 100 mL et 34 mL	Thermo Fisher Scientific (Asnières sur Seine, France)
Filtre 30 mm cellulose 34 mL et 100 mL	
Papiers KIMWIPES	Kimtech fourni par VWR (Fontenay-sous-Bois, France)

Dans un premier temps, les cellules ASE de 100 mL sont lavées avec la méthode 100 % dichlorométhane en les remplissant de billes de verre pour éviter d'utiliser une grande quantité de solvant. Ce programme 100 % dichlorométhane inclut deux cycles avec une pression de 100 bars. Le temps de chauffage est de 5 minutes puis est maintenu à 90 °C pendant 8 minutes. Le rinçage est de 50 % et le temps de purge est fixé à 300 s. Une dizaine de papiers KIMWIPES est déposée dans chaque cellule munie d'un nouveau filtre de 30 mm au fond. Ces papiers sont lavés avec la méthode 100 % dichlorométhane. Les papiers en bon état sont récupérés et sont utilisés pour enrouler chaque mousse PUF pour éviter que la mousse se désagrège et fonde dans la cellule. Cette mousse PUF protégée est placée dans une cellule de 100 mL préalablement lavée et est nettoyé avec le même programme 100 % dichlorométhane. Les mousses PUF sont ensuite séchées pendant 15 minutes sous sorbonne. Les papiers propres ainsi que les mousses propres sont conservés dans de l'aluminium puis sous gaine plastique thermocollée jusqu'à leur prochaine utilisation.



Puis, dans un deuxième temps, l'extraction des échantillons peut être réalisée une fois le matériel pré-lavé. Les cellules ASE de 34 mL additionnées d'un filtre 30 mm au fond sont conditionnées avec la méthode 100 % acétonitrile. Les conditions de ce programme sont similaires à celles du dichlorométhane où seul le solvant d'extraction est changé en acétonitrile. L'échantillon de mousse PUF est tout d'abord pesé entièrement puis est découpé en huit portions équivalentes. Deux huitièmes situés en diagonale sont récupérés et pesés. Ils constituent la prise d'essai pour un sous-échantillon correspondant à un quart de la mousse initiale. Ce quart est enroulé dans un papier propre et est inséré dans une cellule de 34 mL préalablement conditionnée. Les EI ainsi que les natifs sont ajoutés directement sur la mousse PUF. Des billes peuvent être ajoutées pour compléter si nécessaire. Les mousses PUF dans les cellules sont extraites avec le programme 100 % acétonitrile. Les 45 mL d'acétonitrile sont récupérés dans un flacon de récupération ASE et sont évaporés au rapidvap pendant 2h30. Le volume restant d'environ 3 mL sont transvasés dans un flacon à l'aide d'une pipette pasteur et les parois sont rincées à l'acétonitrile. L'évaporation est poursuivie au flux d'azote jusqu'à environ 200  $\mu$ L. Un changement de solvant vers le méthanol est réalisé après des étapes successives de rinçage et d'évaporation sans aller à sec. Finalement, un volume final de 300  $\mu$ L de méthanol dans un flacon avec restricteur est obtenu. Cet extrait est conservé au congélateur en attendant d'être analysé en LC-MS/MS où 5  $\mu$ L seront injectés.

#### d. Protocole de purification sur phase solide SPE

La purification sur phase solide peut être réalisée uniquement avec un extrait aqueux. Le protocole de purification décrit en suivant a été testé mais n'a pas été appliqué sur les extraits de plumes ou de mousses. L'extrait aqueux (6 mL pour MO, 5 mL pour US, 15 mL pour Edge) est dilué dans 50 mL d'eau MQ acidifiée à pH 2 à l'aide de gouttes d'acide chlorydrique dilué à 1/3. Ce pH est ajusté au pHmètre. Les cartouches Oasis HLB (Cartouches Oasis® HLB 3cc 60 mg de chez Waters (Guyancourt, France)) sont conditionnées avec 3 mL méthanol puis 6 mL d'eau MQ à pH 2 (sans laisser sécher) pour revenir aux conditions de l'échantillon. Les extraits dilués sont versés dans un réservoir pour permettre la percolation au travers la cartouche SPE. Durant cette étape, les composés d'intérêt sont retenus sur la phase. La phase de la cartouche est laissée à sécher sous vide pendant 1 heure. Les molécules fixées sur la phase stationnaire sont ensuite éluées avec 3 mL de méthanol dans un flacon de récupération. Cet extrait organique est concentré sous flux d'azote jusqu'à 150  $\mu$ L méthanol. Ce faible volume est transféré dans un flacon d'injection avec restricteur de 300  $\mu$ L. Le flacon est lavé au méthanol et le volume récupéré est réuni dans le restricteur. L'extrait purifié est conservé au congélateur en attendant d'être analysé par LC-MS/MS.

Si la purification est réalisée sur les extraits organiques directement issus de l'extraction, 100  $\mu$ L de ceux-ci sont dilués dans 1 ou 50 mL d'eau MQ acidifiée à pH 2. Ensuite, tout le protocole de la purification est identique à celui décrit ci-dessus, excepté le volume final de l'extrait qui est 100  $\mu$ L pour revenir au volume initialement prélevé.

## 5. Analyse des extraits par LC-MS/MS

Le parc analytique EPOC est composé de plusieurs LC-MS/MS dont quatre ont été utilisés pour ces travaux de thèse à savoir le 6460, 6490, 6495 et 6495B. Ces quatre appareils sont munis d'un système HPLC Infinity 1290 et d'un triple quadripôle de marque Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

Le quadripôle 6460 est réservé aux étapes initiales de développement avec des concentrations plus élevées puisqu'il s'agit du moins sensible des quatre appareils. Le 6495 n'a été que très peu utilisé et les analyses ont été principalement réalisées sur le 6490 et 6495B. Le gain notable de sensibilité (jusqu'à un facteur 10) entre le 6460 et les 6490 provient notamment d'une différence d'architecture, d'optique ainsi que de l'ajout d'un Ion Funnel au niveau de la source. Ce dispositif permet une augmentation du signal grâce à trois innovations : la désolvation des ions qui est facilitée par un gradient thermique Agilent Jet Stream (présente également sur le 6460), la présence de six canaux indépendants sur le capillaire qui permettent la pénétration d'une fraction plus importante des ions formés au sein de l'optique du spectromètre, et enfin, l'entonnoir ionique qui permet une meilleure sélection des ions tout en évacuant la contamination et les molécules neutres. Le détecteur du 6495B a une tension deux fois supérieure à celle du 6490, induisant une sensibilité généralement meilleure d'un facteur deux. Pour la classe des molécules étudiées, non seulement le signal est augmenté mais le bruit également, ce qui engendre des performances similaires entre le 6490 et le 6495B. Les sensibilités obtenues pour nos molécules entre le 6495 et 6495B sont identiques.

### a. Conditions LC

Les composés injectés vont être séparés les uns des autres au sein du système chromatographie en phase liquide. La phase aqueuse en voie A est composée d'un mélange : eau MQ + 5 mM acétate d'ammonium + 0,1 % acide formique (pH = 3,6). La voie B, phase organique, est constituée de méthanol acidifié à 0,1 % à l'acide formique. Les phases mobiles sont reparamétrées à chaque reprise de l'instrument et ne doivent pas être sauvegardées entre deux utilisations. Une colonne de garde Poroshell 120 SB C18 (50 mm x 2,1 mm, 2,7  $\mu$ m) (Agilent) est connectée en sortie de la pompe binaire des phases mobiles et permet de décaler, voire de retenir d'éventuels interférents. La colonne chromatographique permettant la séparation des composés ciblés est la colonne Poroshell Phenyl Hexyl (100 mm x 2,1 mm, 2,7  $\mu$ m) (Agilent) avec en amont une pré-colonne Poroshell Phenyl Hexyl (5 mm x 2,1 mm, 2,7  $\mu$ m) (Agilent). Celles-ci sont installées au sein du four colonne maintenu à une température constante de 35 °C.

L'extrait, prélevé à hauteur de 5  $\mu$ L, est entraîné par un gradient de phase mobile à un débit de 0,3 mL/min. Le gradient d'élution débute à 100 % voie A, passe à 100 % voie B en 18 minutes, se maintient pendant 0,5 minute puis repasse à 100 % voie A à 19 minutes pour s'équilibrer durant 3 minutes et ainsi se préparer à la prochaine injection. Le temps total d'analyse d'un échantillon en injection directe est donc de 22 minutes.

La séparation de deux autres colonnes analytiques a été testée mais ne permet ni l'amélioration de la résolution (écart entre deux pics), ni celle de la forme des pics (des pics plus fins permettraient de gagner en intensité de signal). Il s'agit de la Kinetex C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7  $\mu$ m) (Phenomenex) ainsi que de la Poroshell 120 SB-C18 (100 mm x 2,1 mm, 2,7  $\mu$ m) (Agilent). La technologie Poroshell technologie permet des performances équivalentes à la technologie Kinetex en travaillant à de plus faibles pressions. En couplant avec la SPE en ligne, la pression va être rehaussée et la technologie Poroshell est la plus adaptée.

### b. Conditions de source

Après séparation, les composés sont ionisés avec une source de type électrospray en mode positif appelé ESI+ Agilent Jet Stream. L'azote est le gaz de collision permettant l'analyse en spectrométrie de masse en tandem en mode dynamique MRM appelé dMRM. Les conditions de source décrites ci-dessous sont adaptées au 6490 et 6495B mais pas au 6460. Ce dernier est non muni d'Ion Funnel, la valeur de tension du fragmentor est alors à optimiser pour chaque transition MRM du 6460 et est fixée pour les deux autres appareils à 380 V.

Voici les paramètres de source :

- Température gaz : 200 °C
- Débit de gaz : 11 L/min
- Pression nébuliseur : 40 psi
- Température du gaz nébuliseur : 350 °C
- Débit du gaz nébuliseur : 11 L/min
- Tension du capillaire : 3000 V
- Tension autour de l'aiguille : 300 V

Ainsi que les paramètres de l'Ion Funnel :

- Pression haute : 110
- Pression basse : 60

La différence de tension du multiplicateur d'électron (delta EMV pour Electron Multiplier Voltage) est fixée à + 200 voire + 400 pour l'analyse des extraits plumes et des mousses PUF en injection directe.

### c. Conditions SPE en ligne

Le couplage avec le module de SPE en ligne engendre une pression supérieure puisqu'une cartouche est ajoutée dans le circuit. C'est pour cette raison que le débit de la LC est plus faible que pour l'injection directe : 0,3 mL/min au lieu de 0,5 mL/min. Le débit de la pompe quaternaire de module SPE est fixé à 1000 µL/min en eau MQ. Sachant que 600 µL sont injectés, la durée de chargement doit alors être de minimum 0,6 minute. Ce temps de chargement est de 2 minutes pour les azoles et de 1 minute pour les néonicotinoïdes et leurs métabolites. Ce temps est inférieur pour ces derniers puisqu'étant plus polaires, ils fuient plus rapidement. Les analytes retenus sur la cartouche Poroshell 120 C18 (5 mm x 2,1 mm, 2,7 µm) (Agilent), qui est initialement une pré-colonne, sont ensuite entraînés à contre-courant par la phase mobile LC vers la colonne analytique pour être séparés. Entre chaque chargement, la cartouche est lavée avec de l'acétonitrile pendant une minute puis rééquilibrée à l'eau pendant 3,5 minutes.

Deux autres cartouches SPE en ligne ont été testées mais n'ont pas été retenues : PLEXA (12,5 mm x 2,1 mm) (Agilent), OASIS HLB préparée au laboratoire au sein d'une capsule (20 mm x 2,1 mm) (BGB Analytic) remplie de phase Oasis HLB (Waters, 25-35 µm de taille de particules). Des pics chromatographiques plus larges ont été obtenus avec ces cartouches entraînant donc une baisse du signal ainsi que de la sensibilité.

Le temps d'analyse en SPE en ligne est donc de 23 minutes pour les néonicotinoïdes et leurs métabolites (22 minutes du gradient LC + 1 minute de chargement) et 24 minutes pour les azoles (22 minutes + 2 minutes de chargement).

#### d. Transitions des molécules

Les temps de rétention (Tr), les transitions de quantification (TQ) et de confirmation (TC) associés à leur énergie de collision (CE) ainsi que l'énergie d'accélération (CAV pour Cell Accelerator Voltage en anglais) sont énumérés dans le Tableau 25.

Pour chacune des méthodes d'acquisitions employées dans le cadre de la thèse, les temps d'acquisition (dwell time en anglais) sont également présentés dans le tableau. Le temps de cycle est fixé à 800 ms pour toutes les méthodes exceptée la 5N, développée par la suite, où le temps de cycle a été augmenté et fixé à 1200 ms. La fenêtre d'acquisition pour chaque transition est de 2 minutes. Wide est la résolution sélectionnée pour les deux quadripôles.

Au total 9 méthodes d'acquisition sont employées dont 4 en injection directe et 5 en SPE en ligne. Le descriptif des méthodes employées en injection directe est celui-ci :

- **P1** qui correspond à l'analyse de toutes les molécules étudiées dans la thèse à savoir les azoles, les néonicotinoïdes, leurs métabolites et leurs EI en matrice plume,
- **Tébuconazole** et son étalon interne seuls pour application sur les extraits plumes,
- **P2** où seuls les natifs et les étalons internes des azoles et des néonicotinoïdes ont été analysés en matrice mousse PUF,
- **5N** comprenant l'analyse de 5 néonicotinoïdes et de leur EI respectif qui a été appliquée pour l'analyse des extraits plumes.

Les méthodes d'acquisition SPE en ligne sont appliquées sur la matrice plasma et concernent les méthodes suivantes :

- **A** pour certains azoles,
- **Tébuconazole** seul et son étalon interne,
- **N** pour certains néonicotinoïdes,
- **Imidaclopride** seul et son étalon interne,
- **M** pour certains métabolites des néonicotinoïdes.

Tableau 25 : Paramètres des transitions MRM pour les molécules des différentes méthodes d'acquisition

	Tr (min)	TQ (CE en V) ((CAV en V))		TC (CE en V) ((CAV en V))	Temps d'acquisition « Dwell time » (ms)							
		Ion précurseur	Ion fils	Ion fils avec le même ion précurseur	ID		SPE en ligne					
					P1	P2	5N	A	N	M		
6-chloronicotinique acide <sup>1</sup>	7,6	158	122,1 (16) ((5))	51 (44) ((4))	70							
6-hydroxy nicotinique acide <sup>1</sup>												
Acétamipride	10,1	223,08	125,9 (20) ((4))	56,02 (12) ((6))	55 <sup>4</sup>	80	200			70		
Acétamipride d3 <sup>1</sup>	10	226,1	126 (20) ((4))		55	80	200			70		125
Acétamipride N desmethyl	9,5	209,06	125,9 (16) ((5))	90,1 (36) ((4))	36							87
Bitertanol <sup>1</sup>	16,2	338,19	70,1 (4) ((7))	43,2 (32) ((7))	20	20						
Bromuconazole <sup>1</sup>	16,2 <sup>2</sup>	378	159,1 (28) ((5))	70,2 (16) ((5))	20	20						
Chloro-2-1,3-thiazole-5 carboxylique acide <sup>1</sup>												
Clothianidine <sup>1</sup>	8,7	250,02	169 (12) ((5))	132 (12) ((5))	40	72	130			72		
Clothianidine d3 <sup>1</sup>	8,7	253,04	172,1 (8) ((5))		40	72	130			72		100
Clothianidine urée <sup>1</sup>	6,8	206,02	174,8 (16) ((5))	85,9 (28) ((5))	98							400
Cycloxapride <sup>1</sup>	9,0	323,09	126 (40) ((4))	98,9 (68) ((4))	38	70				65		
Cyproconazole <sup>1</sup>	14,8 <sup>2</sup>	292,1	70,2 (16) ((4))	125,1 (36) ((7))	46	45		46				
Difénoconazole	17,2	406,1	250,9 (24) ((4))	110,9 (68) ((5))	55	60		55				
Dinotéfurane	5,2 <sup>2</sup>	203,12	43,2 (68) ((4))	157,1 (4) ((4))	200	400				400		
Epoxiconazole <sup>1</sup>	15,6	330,08	121 (16) ((5))	101,1 (48) ((5))	18 <sup>4</sup>	18			24			
Fenbuconazole <sup>1</sup>	16,2	337,1	70 (16) ((4))	124,9 (32) ((7))	20	20			28			
Fenbuconazole d5 <sup>1</sup>	16,2	342,16	70 (16) ((5))		20	20			28			
Flupyradifurone <sup>1</sup>	10,2	289,06	125,9 (28) ((4))	90 (52) ((4))	50	70				70		
Fluquinconazole <sup>1</sup>	15,9	376,06	306,9 (24) ((1))	108 (52) ((5))	20	21						
Flusilazole	15,9	316,1	247 (16) ((5))	165 (24) ((6))	20	21			26			
Flutriafol <sup>1</sup>	13,5	302,11	69,9 (12) ((5))	123 (28) ((4))	200	200			200			
Furoïque-3 acide <sup>1</sup>												
Imazalil <sup>1</sup>	13,1	297,06	41,2 (28) ((4))	39,1 (68) ((6))	200	200			200			
Imidaclopride	9,6	256	209 (12) ((5))	175 (12) ((4))	36	52	130			48		267 <sup>3</sup>
Imidaclopride d4	9,6	260,09	213,1 (12) ((4))		36	52	130			48		267 <sup>3</sup>
Imidaclopride guanidine <sup>1</sup>	5,9 <sup>2</sup>	211,08	126 (28) ((4))	90 (44) ((7))	130 <sup>4</sup>							
Imidaclopride oléfine <sup>1</sup>	8,4	254,05	171 (16) ((7))	235,9 (4) ((4))	55							
Imidaclopride urée <sup>1</sup>	8,8	212,06	128 (20) ((4))	99,1 (20) ((4))	40							100
Ipconazole	16,8 <sup>2</sup>	334,2	70,2 (32) ((6))	125,1 (44) ((5))	28	25						
Metconazole <sup>1</sup>	16,2	320,16	70,1 (20) ((5))	124,9 (44) ((5))	20	20			30			
Metconazole d6 <sup>1</sup>	16,2	326,19	70,1 (28) ((7))			20						
Myclobutanil <sup>1</sup>	15,3	289,12	70,1 (16) ((6))	125 (36) ((5))	20	20						
Nicotinique acide <sup>1</sup>	1,3	124,04	80 (20) ((7))	53 (32) ((4))	400							
Nitenpyrame <sup>1</sup>	7,1	271,1	56 (36) ((4))	99,1 (12) ((4))	130	400				300		
Penconazole <sup>1</sup>	15,8	284,07	70,1 (12) ((4))	159 (32) ((7))	20	19			24			
Penconazole d7 <sup>1</sup>	15,8	291,12	71,1 (16) ((7))			19						
Prochloraze	16,5	376	307,9 (4) ((6))	70 (24) ((7))	22	21			30			
Propiconazole	16,3	342,1	158,9 (32) ((7))	69 (20) ((6))	20	20			28			
Propiconazole d5 <sup>1</sup>	16,3	347,11	159 (32) ((4))		20	20			28			
Prothioconazole <sup>1</sup>	16,3	344,04	189 (20) ((7))	153,1 (60) ((6))	20	20			28			
Sulfoxaflor <sup>1</sup>	10,2 <sup>2</sup>	174,01	154 (20) ((4))	78,1 (40) ((4))	50	70				60		
Tébuconazole	15,8	308,2	70,1 (20) ((6))	125 (44) ((4))	20	19			26			
					267 <sup>3</sup>				267 <sup>3</sup>			
Tébuconazole d6	15,8	314,19	72,1 (20) ((5))		20	19			26			
					267 <sup>3</sup>				267 <sup>3</sup>			
Tétraconazole	15,5	372	70,1 (20) ((7))	158,9 (28) ((4))	19	19			26			
Thiaclopride <sup>1</sup>	11,2	253,03	126 (24) ((4))	90 (36) ((4))	190	200	400			267		
Thiaclopride amide <sup>1</sup>	9,6	271,04	125,9 (32) ((4))	73,1 (76) ((6))	36							86
Thiaclopride d4 <sup>1</sup>	11,2	257,06	126 (16) ((5))		190	200	400			267		600
Thiaméthoxame	8,3	292	211 (4) ((4))	181 (20) ((4))	55	100	200			90		
Thiaméthoxame d3	8,3	295,05	214,4 (8) ((4))		55	100	200			90		
Triadiméfon <sup>1</sup>	14,8	294,1	69 (16) ((5))	41,1 (36) ((4))	47	50			55			
Triadiménol <sup>1</sup>	14,8	296,12	70,1 (8) ((4))	43,2 (64) ((5))	47	50			55			
Triticonazole	15,4	318,14	70,2 (12) ((6))	43,3 (70) ((6))	19	19						

5N : 5 Néonicotinoïdes, A : Azoles, CAV : Cell Accelerator Voltage, CE : Energie de Collision, ID : Injection Directe, N : Néonicotinoïdes, M : Métabolites néonicotinoïdes, MRM : Multiple Reaction Monitoring, P1 : toutes les molécules pour ID plumes, P2 : toutes les molécules pour ID mousses PUF, TC : Transition de Confirmation, TQ : Transition de quantification, tr : temps de rétention

<sup>1</sup> Molécules développées dans le cadre de la thèse, <sup>2</sup> Pic chromatographique avec un double pic, <sup>3</sup> Temps d'acquisition lorsque la molécule est toute seule dans la méthode d'acquisition, <sup>4</sup> Inversion de TC et TQ en matrice plume

### e. Quantification des composés et retraitement des données

L'aire, la hauteur, le bruit, le temps de rétention pour les pics chromatographiques des transitions quantification et confirmation ainsi que le rapport des aires TC/TQ sont extraits à partir du logiciel Agilent Technologies Masshunter quantitative. Ils sont ensuite traités via Microsoft Excel pour calculer les concentrations d'après les calculs d'étalonnage interne.

Pour ce faire, un premier coefficient de réponse appelé  $K_i$  (coefficient de réponse de la molécule par rapport à son étalon interne) est déterminé par rapport à la réponse en aire d'une solution injectée de masses connues en composés à analyser (natifs) et étalons internes (Équation 1).

*Équation 1 : Calcul du coefficient de réponse  $K_i$  par étalonnage interne*

$$K_i = \frac{K_{EI}}{K_n} = \frac{m_n \times A_{EI}}{m_{EI} \times A_n}$$

Où :

*EI : Etalon Interne*

*n : Natif*

*A : Aire*

*m : masse*

*K : coefficient de proportionnalité*

Puis, après réarrangement de la formule, la masse de natifs inconnue dans l'échantillon est calculée à l'aide du coefficient de réponse précédemment déterminé (Équation 2). Cette masse est ensuite divisée par la prise d'essai en échantillon pour convertir cette masse en concentration massique.

*Équation 2 : Calcul pour obtenir la masse de molécule par étalonnage interne*

$$m_n = \frac{K_i \times m_{EI} \times A_n}{A_{EI}}$$

Dans le cas idéal, une molécule est associée à son homologue deutéré ayant les mêmes propriétés physico-chimiques que le natif. Il se comportera donc de façon similaire tout au long du protocole d'extraction et d'analyse et pourra permettre de corriger les éventuelles pertes durant les étapes de préparation ou encore les effets matriciels qui peuvent être tout aussi bien être positifs (augmentation du signal) que négatifs (inhibition du signal). Néanmoins, la molécule marquée isotopiquement n'est pas disponible dans le marché pour toutes les molécules. Pour ces dernières molécules, le choix d'association se réalise selon un compromis de plusieurs critères : structure de la molécule proche, temps de rétention proche,  $K_i$  proche de 1, rendement proche de 100 % sur le Ci et en matrice supplémentée. Le Tableau 26 énumère le choix des étalons internes associés à chaque molécule ainsi que les valeurs des  $K_i$ .

Tableau 26 : Etalon interne associé à chaque molécule analysée et valeurs des coefficients de réponse Ki

	<b>Etalon interne associé ((P2))</b>	<b>Ki (Ki P1) ((Ki P2))</b>
6-chloronicotinique acide	Imidaclopride d4	46,6
Acétamipride	Acétamipride d3	1,1 (2,4)
Acétamipride N desmethyl	Acétamipride d3	1,1
Bitertanol	Fenbuconazole d5	7,6
Bromuconazole	Fenbuconazole d5	2,2
Clothianidine	Clothianidine d3	1,1
Clothianidine urée	Clothianidine d3	0,5
Cyclozapride	Thiaméthoxame d3	1,3
Cyproconazole	Tébuconazole d6	0,8
Difénoconazole	Fenbuconazole d5	0,6
Dinotéfurane	Clothianidine d3	0,4
Epoxiconazole	Propiconazole d5	0,6 (1,1)
Fenbuconazole	Fenbuconazole d5	1,2
Flupyradifurone	Thiaclopride d4	4,0
Fluquinconazole	Fenbuconazole d5	3,3
Flusilazole	Fenbuconazole d5	0,4
Flutriafol	Tébuconazole d6	0,9
Imazalil	Tébuconazole d6	0,3
Imidaclopride	Imidaclopride d4	0,9
Imidaclopride guanidine	Imidaclopride d4	0,1 (0,5)
Imidaclopride oléfine	Imidaclopride d4	37,9
Imidaclopride urée	Imidaclopride d4	0,2
Iponazole	Tébuconazole d6	0,9
Metconazole	Propiconazole d5 ((Metconazole d6))	0,6 ((1,1))
Myclobutanil	Tébuconazole d6	1,4
Nicotinique acide	Imidaclopride d4	1,2
Nitenpyrame	Clothianidine d3	0,3
Penconazole	Tébuconazole d6 ((Penconazole d7))	0,7 ((0,7))
Prochloraze	Tébuconazole d6	0,8
Propiconazole	Propiconazole d5	1,2
Prothioconazole	Fenbuconazole d5	44,3
Sulfoxaflor	Acétamipride d3	1,1
Tébuconazole	Tébuconazole d6	0,8
Tétraconazole	Propiconazole d5	1,8
Thiaclopride	Thiaclopride d4	0,8
Thiaclopride amide	Thiaclopride d4	2,9
Thiaméthoxame	Thiaméthoxame d3	1,3
Triadiméfon	Propiconazole d5	1,3
Triadiménol	Tébuconazole d6	3,5
Triticonazole	Tébuconazole d6	1,6

ID : Injection Directe, Ki : Coefficients de réponse, P1 : toutes les molécules pour ID plumes, P2 : toutes les molécules pour ID mousses PUF

## 6. Critères qualités

Une démarche d'assurance qualité est mise en place au laboratoire afin de tracer des éventuelles dérives. Dans cette démarche, différents paramètres sont reportés systématiquement : toutes les utilisations de machines, des petits appareils, les lots de solvant, les masses de solutions ou des échantillons prélevés. En effet, le suivi gravimétrique est systématiquement appliqué pour tous les volumes prélevés et permet également de contrôler les masses des différentes solutions conservées au congélateur.

Les salles de manipulation sont organisées par niveau de contamination en fonction des concentrations des solutions et des molécules dans les échantillons. Ceci permet d'éviter d'éventuelles contaminations des blancs manipulations qui engendraient une augmentation des limites de quantification. Dans le cadre de la thèse, toutes les extractions d'échantillons plasma, plumes et mousses PUF ont été réalisées dans la salle « trace ».

Dans la même logique, la verrerie est dédiée et est gravée de façon nominative. Après chaque utilisation, elle est nettoyée au lave-vaisselle puis calcinée à 450 °C pendant 6 heures. De plus, les solvants, les réactifs ou les standards analytiques sont de haute pureté analytique, soit de qualité HPLC généralement.

Avant d'analyser les échantillons sur l'appareil analytique adéquat, les critères qualités et performances instrumentales doivent être vérifiés. Différentes cartes de contrôles sont alors réalisées et seront exposées par la suite. Lors de la préparation de l'échantillon, des contrôles qualités sont également ajoutés de façon à vérifier sa bonne réalisation ou si une contamination a eu lieu.

### a. Vérification des performances instrumentales injection directe et SPE en ligne

Que ce soit pour rester en injection directe ou ensuite installer le module supplémentaire de SPE en ligne, les critères développés dans cette partie sont à vérifier. Ce module est installé seulement si tous les critères sont tout d'abord validés en visualisant les différentes cartes de contrôles établies.

Le spectromètre MS-MS est dans un premier temps calibré avec une solution de référence Agilent Technologies : ASI-L Low Concentration Tuning Mix.

Puis après installation des colonnes et des solvants, les blancs d'injection équivalents aux blancs du système doivent être propres avec un bruit de fond similaire aux fois précédentes. Si ce n'est pas le cas, la provenance de l'interférence ou contamination doit être identifiée. Celle-ci peut provenir du système lui-même, auquel cas un solvant organique approprié va être mis en circulation. Le solvant organique de la voie B (méthanol) peut tout d'abord être mis en circulation. Puis, un nettoyage supplémentaire peut être réalisé si ce précédent n'est pas suffisant avec circulation d'un mélange de quatre solvants (composé d'alcool isopropylique également nommé propan-2-ol (50 %), d'acétonitrile (25 %), de cyclohexane (15 %) et de dichlorométhane (10 %)) en retirant bien la pré-colonne, la colonne chromatographique, et la colonne de garde installées.



*i. Développement des molécules et critères pour leur identification*

Les transitions spécifiques de chaque composé ont dû être recherchées. Pour ce faire, les molécules ont été injectées individuellement à une concentration de 1 µg/L dans le méthanol (ou 10 µg/L sur le 6460) sans colonne analytique et en mode scan ESI<sup>+</sup> avec un débit fixé à 0,3 mL/min en 50 % voie A et 50 % voie B. Ce mode scan signifie qu'un balayage de toutes les masses m/z (masse/charge de l'ion produit) va être réalisé dans la gamme de 100 à 400 voire 600 en fonction de la famille de molécules. Le CAV est fixé à 7 V et sera optimisé dans un deuxième temps. Les conditions de source sont identiques à celles préalablement exposées.

Avec en voie A de l'eau MQ acidifiée à l'acide formique 0,1 % et en voie B méthanol acidifié, la formation de l'ion moléculaire est à vérifier. Il peut s'agir généralement de l'ion [M-H]<sup>+</sup>, mais il peut y avoir des exceptions avec formation de certains adduits sodium, OH, déshydratation, décarboxylation, ...

Si un adduit sodium est formé, de l'acétate d'ammonium en voie A peut être ajouté à une concentration de 5 mM pour obtenir soit l'ion moléculaire [M-NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> ou [M-H]<sup>+</sup>. Le scan est à réitérer avec cette nouvelle phase pour vérifier les ions produits.

Certaines molécules se fragmentent dès le début dans la source sans donner l'ion moléculaire. La tension au niveau de la buse (appelée nozzle voltage en anglais) peut alors avoir une influence non négligeable, étant initialement à la valeur de 300 V, 0 V peut également être testé.

Une fois le pic moléculaire visible, quatre ions produits à partir de celui-ci vont être recherchés de façon automatique par le logiciel Optimizer Ion tout en sélectionnant la meilleure énergie de collision.

Ces transitions sont acquises en MRM après installation de la colonne chromatographique en injectant une solution mélange de tous les composés. Le temps de rétention de chacune des molécules est établi et les deux transitions les plus sensibles (rapport signal sur bruit (S/N)) parmi les quatre sont retenues. La plus sensible servira de transition de quantification et l'autre de confirmation. Ce rapport des aires obtenues pour ces deux pics ((Aire TC / Aire TQ) x 100) est le deuxième critère après le temps de rétention pour s'assurer de l'identification de la molécule comparée à un interfèrent. En matrice échantillon, cette sensibilité peut varier et les transitions peuvent être inversées (exemple avec l'acétamipride comme vu par la suite).

Par la suite, un écart de plus ou moins 0,05 minute sur le temps de rétention ainsi qu'un rapport inclus dans les 60 % par rapport aux valeurs de référence sont acceptés pour valider l'identité de la molécule. Les temps de rétention sont introduits dans le tableau des paramètres de transition mais pas les rapports (Tableau 27) puisqu'il s'agit d'un critère qualité et non de méthode.

Tableau 27 : Valeurs des rapports (Aire TC/TQ x100) pour les transitions de quantification et confirmation sélectionnées

	Rapports aires TC/TQ (P1)		Rapports aires TC/TQ (P1)		Rapports aires TC/TQ (P1)
6-chloronicotinique acide	79	Flupyradifurone	30	Nitenpyrame	39
Acétamipride	47 (220)	Fluquinconazole	76	Penconazole	55
Acétamipride N desmethyl	27	Flusilazole	74	Prochloraze	66
Bitertanol	75	Flutriafol	32	Propiconazole	98
Bromuconazole	49	Imazalil	67	Prothioconazole	65
Clothianidine	123	Imidaclopride	86	Sulfoxaflor	32
Clothianidine urée	76	Imidaclopride guanidine	30 (346)	Tébuconazole	8
Cyclozapride	31	Imidaclopride oléfine	308	Tétraconazole	146
Cyproconazole	32	Imidaclopride urée	30	Thiaclopride	22
Difénoconazole	22	Iponazole	11	Thiaclopride amide	31
Dinotéfurane	82	Metconazole	11	Thiaméthoxame	67
Époxiconazole	52 (195)	Myclobutanil	29	Triadiméfon	55
Fenbuconazole	72	Nicotinique acide	58	Triadiménol	22
				Triticonazole	14

ID : Injection Directe, P1 : toutes les molécules pour ID plumes, TC : Transition de Confirmation, TQ : Transition de Quantification

A noter que les transitions de quantification et confirmation ont été inversées en matrice plume par rapport aux autres matrices pour certaines molécules telles que l'acétamipride, l'époxiconazole et l'imidaclopride guanidine.

## ii. Linéarité et limites de quantification instrumentales

Il est important dans une étude d'analyse de traces d'avoir des limites de détection (LD) et de quantification (LQ) les plus basses possibles pour chacune des molécules. La limite de détection est la plus faible concentration pouvant être détectée avec une incertitude acceptable mais qui ne peut pas être quantifiée. La limite de quantification décrit la plus faible concentration pouvant être quantifiée. Pour qualifier ces deux valeurs et à condition que les critères du temps de rétention et du rapport d'aires TC/TQ soient respectés, c'est la valeur du rapport S/N (rapport entre le signal de la molécule sur le bruit de fond) qui entre en jeu. Celui-ci doit être égal à 9 pour LQ et 3 pour LD ( $LD = LQ/3$ ).

Le bruit est calculé en Peak-To-Peak, soit la méthode de calcul la plus stricte possible. Sa plage est généralement située en amont du pic pour représenter au mieux les effets matriciels et s'étend d'une durée au moins être équivalente à la largeur du pic chromatographique soit de 0,2 minute.

Les LQ peuvent être calculées par extrapolation d'un signal obtenu pour une concentration connue mais elles ont également été vérifiées après injection de cette concentration LQ calculée. Sachant qu'on injecte une concentration connue, un rendement peut être calculé. On admet une variabilité de ce rendement comprise entre 40 et 160 %. Cet écart permet d'englober la variabilité qui augmente aux concentrations proches de la limite de quantification.

Finalement, les LQ sont obtenues par vérification de ces différents critères : le temps de rétention, le rapport d'aires TC/TQ, le rapport S/N et le rendement.

Lorsqu'il n'y a pas de matrice et que les concentrations sont injectées en solvant ce sont des LQ machine qui sont exprimées en masse injectée d'unité le « pg inj ». Les LQ machine en injection directe et SPE en ligne en eau MQ établie pour les trois groupes de molécules sont données dans le tableau dédié (Tableau 28). A noter qu'en SPE en ligne, le 6-chloronicotique acide est impossible à analyser avec le protocole sélectionné. Dans ce tableau figurent également les gammes de linéarité avec la pente ainsi que le coefficient de corrélation  $R^2$  qui est supérieur à 0,99 pour toutes les molécules, excepté pour le prothioconazole en SPE en ligne. La gamme de linéarité est réalisée en traçant l'aire de la TQ en fonction de la masse injectée ( $y = a x$ ). Ne tenant pas compte ni du critère rapport d'aires TC/TQ ni du rapport S/N, il se peut que la LQ validée soit supérieure au point minimal de la gamme.

Tableau 28 : Sensibilité et linéarité instrumentales en injection directe et en SPE en ligne pour les trois méthodes analytiques

	Injection Directe				SPE en ligne				
	LQ (pg inj)	Gamme de linéarité (pg inj) (nombre de niveaux)	Pente (a)	$R^2$	LQ (pg inj)	Gamme de linéarité (pg inj) (nombre de niveaux)	Pente (a)	$R^2$	
A	Cyproconazole	0,06	0,03-30 (12)	15155	0,9997	0,08	0,04-30 (10)	12924	0,9998
	Difénoconazole	0,3	0,3-30 (8)	11185	0,9993	1	0,05-35 (10)	5360	0,9900
	Epoxiconazole	0,07	0,07-35 (11)	13840	0,9969	0,05	0,05-35 (10)	10959	0,9999
	Fenbuconazole	0,7	0,7-30 (6)	5836	0,9936	0,5	0,09-35 (9)	3825	0,9958
	Flusilazole	0,7	0,7-30 (6)	17163	0,9993	0,8	0,04-30 (10)	4542	0,9959
	Flutriafol	0,03	0,01-25 (15)	13484	0,9998	0,03	0,03-25 (10)	11898	0,9955
	Imazalil	0,6	0,6-25 (6)	13889	0,9960	8	0,4-30 (6)	11788	0,9998
	Metconazole	0,3	0,3-35 (9)	14194	0,9953	0,8	0,04-30 (10)	11442	0,9627
	Penconazole	0,07	0,04-35 (12)	16505	0,9958	0,4	0,05-35 (10)	11124	0,9989
	Prochloraze	0,7	0,4-30 (7)	10978	0,9985	3,4	0,89-20 (4)	12937	0,9992
	Propiconazole	0,2	0,2-20 (8)	9018	0,9995	0,4	0,05-20 (9)	4765	0,9930
	Prothioconazole	6,6	6,6-270 (6)	134	0,9960	30	31,4-300 (4)	62	0,9735
	Tébuconazole	0,3	0,3-35 (9)	12766	0,9968	0,2	0,21-30 (8)	10330	0,9992
	Tétraconazole	0,7	0,7-30 (6)	4181	0,9986	0,9	0,37-35 (7)	3166	0,9947
	Triadiméfon	0,3	0,3-40 (9)	6728	0,9995	0,3	0,11-40 (9)	5470	0,9997
	Triadiménol	0,3	0,3-30 (8)	2485	0,9999	0,3	0,1-40 (9)	2198	0,9994
N	Acétamipride	0,01	0,005-6 (12)	41134	0,9998	0,03	0,003-60 (7)	32601	0,9999
	Clothianidine	0,1	0,04-6 (8)	3300	1,0000	0,3	0,05-60 (5)	2174	0,9999
	Cyclozapride	0,015	0,03-6 (9)	11323	0,9996	0,03	0,03-60 (7)	10133	0,9998
	Dinotéfurane	0,1	0,05-6 (8)	7467	1,0000	3	3-60 (3)	488	0,9976
	Flupyradifurone	0,04	0,015-6 (10)	9209	0,9998	0,3	0,05-60 (5)	8404	0,9998
	Imidaclopride	0,1	0,05-6 (8)	4488	0,9995	0,3	0,06-60 (5)	3770	0,9998
	Nitenpyrame	0,01	0,006-6 (11)	15960	0,9999	0,3	0,03-60 (5)	2413	0,9998
	Sulfoxaflor	0,02	0,005-6 (12)	30986	0,9993	0,05	0,005-60 (6)	26641	0,9998
	Thiaclopride	0,01	0,005-6 (12)	49145	0,9992	0,03	0,006-6 (7)	34655	0,9999
	Thiaméthoxame	0,04	0,02-6 (10)	9286	0,9996	0,05	0,03-60 (7)	10840	0,9999
M	6-Chloronicotinique acide	1,5	0,26-15 (5)	178,36	0,9997		X		
	Acétamipride N desmethyl	0,015	0,003-15 (12)	28123	1,0000	0,025	0,005-55 (13)	31156	0,9996
	Clothianidine urée	0,07	0,003-15 (10)	5280	0,9999	2,7	0,4-500 (7)	654	0,9993
	Imidaclopride guanidine	0,01	0,003-17 (12)	38916	0,9998	0,02	0,02-5 (9)	4409	0,9998

	Imidaclopride oléfine	0,7	0,26-15 (5)	236	0,9999	1	0,5-500 (11)	201	0,9931
	Imidaclopride urée	0,02	0,013-15 (10)	10752	1,0000	0,02	0,02-54 (11)	11439	0,9991
	Nicotinique acide	0,26	0,26-15 (5)	2773	0,9976	100	50-500 (3)	8,9	0,9900
	Thiaclopride amide	0,02	0,007-15 (11)	10894	1,0000	0,045	0,01-25 (11)	10320	0,9989
6 « nouveaux » azoles en plus ajoutés à P1 et P2	Bitertanol <sup>1</sup>	1,3-13	0,12-12 (3)	3029 *	0,9998				
	Bromuconazole <sup>1</sup>	0,13	0,13-13 (3)	11331 *	1,0000				
	Fluquinconazole <sup>1</sup>		(2) <sup>2</sup>						
	Ipconazole <sup>1</sup>	0,05-0,12	0,12-13 (3)	38346 *	1,000				
	Myclobutanil <sup>1</sup>	0,07-0,14	0,14-14 (3)	21593 *	0,9999				
	Triticonazole <sup>1</sup>	1,2-11	0,11-11 (3)	18806 *	0,9999				

a : pente de la droite de type  $y = ax$ , A : Azoles, ID : Injection Directe, LQ : Limite de Quantification, M : Métabolites des néonicotinoïdes, N : Néonicotinoïdes, P1 : toutes les molécules pour ID plumes, P2 : toutes les molécules pour ID mousses PUF, R<sup>2</sup> : coefficient de corrélation, SPE : Extraction sur Phase Solide

Analysé sur le 6490 excepté \* sur le 6495B – <sup>1</sup> Molécules développées plus tardivement avec une précision moindre –

<sup>2</sup> Seulement deux points sur la gamme : non correct de réaliser une droite de linéarité

### iii. Cartes de contrôles instrumentales

Avant d'installer le module SPE en ligne ou encore d'injecter des échantillons, il est important de vérifier la sensibilité de la machine en amont en ID. Pour ce faire, les molécules sont injectées à 2xLQ ID et les LQ extrapolées de ces injections sont recensées dans une carte de contrôle 2xLQ injection directe machine (en Annexe 2) pour les trois familles de molécules. Pour chacune de ces cartes de contrôles, il y a deux méthodes d'analyse différentes, soit avec toutes les molécules qui étaient l'injection en amont de l'injection des extraits de plumes ou des mousses PUF, soit seulement une classe de molécules qui précédait l'installation de la SPE en ligne pour l'analyse dissociée.

Ensuite, la justesse de la quantification doit être vérifiée. Pour ce faire, cette injection à 2xLQ est réalisée deux fois sur deux pesées distinctes. La première permet de calculer le coefficient de réponse Ki (injection appelée Ki correspondant au témoin solution de calibration) et sur la deuxième injection, ce coefficient est appliqué pour calculer le rendement (injection appelée Ci). Une autre carte de contrôle en injection directe des valeurs du coefficient de réponse Ki ainsi que des rendements calculés est présentée en Annexe 3. Puis, la SPE en ligne peut être installée et des cartes de contrôle similaires ont été mises en place.

### b. Vérifications d'une séquence d'échantillons

La séquence d'échantillons n'est injectée qu'après avoir préalablement vérifié que le système est propre et que la quantification est juste. Plusieurs points de contrôle composent la séquence et permettent de valider les concentrations des échantillons. Tout d'abord, le solvant final des extraits (méthanol ou eau MQ en fonction du protocole) est injecté seul pour repérer une éventuelle contamination apportée par celui-ci. Ces blancs d'injection sont glissés entre chaque injection en SPE en ligne pour nettoyer le système et éviter son encrassement.

Des blancs de manipulation sont également réalisés et permettent de calculer l'apport en molécules provenant du milieu extérieur lors de la préparation. A noter que les contaminations extérieures pour les pesticides étudiés n'ont pas posé de problème lors de ces travaux, excepté pour le flupyradifurone avec le protocole plasma. Pour éliminer cette contamination les éppendorfs ont dû être pré rincés à l'acétonitrile.

Ensuite, des matrices de référence enrichies en molécules de l'étude à concentrations connues ont suivi le protocole d'extraction. Cet ajout est réalisé à deux concentrations : une à la LQ et une à forte concentration. La justesse d'extraction, exprimée en pourcentage, peut être calculée en divisant la masse calculée par rapport à la masse connue ajoutée par natif. La sensibilité peut également être calculée par extrapolation et est référencée dans une carte de contrôle. Les cartes de contrôles des séquences d'échantillons seront décrites par la suite sous forme de tableaux bilans et non sous forme détaillée de graphiques.

Dans ces cartes de contrôle figurent également les aires dans les blancs, les rapports d'aires TC/TQ, les temps de rétention, les valeurs des  $K_i$ , les aires des étalons internes, les LQ extrapolées des concentrations calculées dans les échantillons qui sont compilées pour repérer tout éventuel écart et variabilité.

A noter qu'au préalable de l'analyse des échantillons, des développements analytiques ont été réalisés permettant de valider la méthode. Ces développements ont eu pour but de repérer les éventuels effets matriciels et perte le long du protocole. Les étalons internes sont alors ajoutés à des étapes successives du protocole et les rendements ont été examinés (Figure 38) pour évaluer les éventuelles pertes. De façon à évaluer l'effet matriciel, l'ajout des natifs et des étalons internes est réalisé juste avant l'injection dans un extrait de la matrice souhaitée.

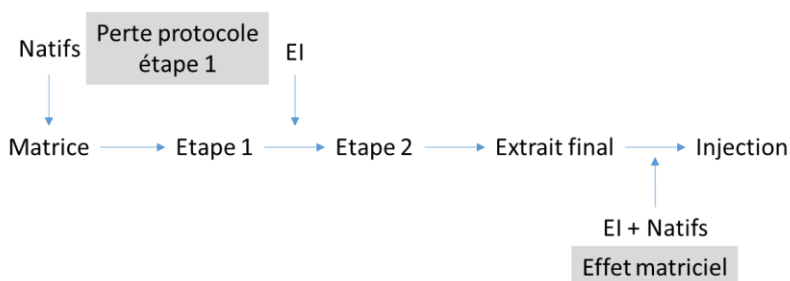


Figure 38 : Schéma de l'ajout des EI et natifs en fonction de l'évaluation de la perte protocole ou effet matriciel

### *i. Echantillons de plasma : sensibilité, linéarité et justesse*

Les LQ ainsi que la gamme de linéarité en matrice plasma (Tableau 29) ont été définies en fonction des mêmes critères de validation précédemment décrits. Il s'agit de LQ vérifiées à chaque concentration en matrice plasma de poulet de référence et non de LQ extrapolées. Les LQ sont valables pour les protocoles 25  $\mu$ L et 10  $\mu$ L seulement pour la classe des azoles. Certains métabolites ne sont pas analysables en SPE en ligne avec le protocole établi à savoir le 6-chloronicotinique acide, l'imidaclopride guanidine et oléfine ainsi que le nicotinique acide. Ce sont des molécules polaires qui fuient au travers de la cartouche apolaire qui ne peut les retenir. A noter que la droite d'étalonnage a été réalisée en étalonnage interne.

Tableau 29 : Sensibilité et linéarité en matrice plasma pour les trois méthodes distinctes SPE en ligne

	LQ validée (pg/g plasma)	Gamme de linéarité (pg/g plasma) (nombre de niveaux)	Pente (a)	R <sup>2</sup>	
A	Cyproconazole	20	5-100000 (8)	1,34	0,9937
	Difénoconazole	10	10-100000 (8)	0,60	0,9978
	Epoxiconazole	160	160-100000 (4)	0,51	0,9974
	Fenbuconazole	30	25-100000 (6)	1,08	0,9950
	Flusilazole	10	10-100000 (8)	0,85	0,9766
	Flutriafol	400	10-80000 (6)	0,80	0,9963
	Imazalil	400	100-100000 (5)	0,44	0,9971
	Metconazole	30	20-100000 (6)	0,78	0,9974
	Penconazole	25	15-100000 (7)	0,75	0,9957
	Prochloraze	25	25-100000 (6)	1,18	0,9993
	Propiconazole	200	50-60000 (5)	1,61	0,9939
	Prothioconazole	5000	5000-1000000 (4)	61,98	0,9879
	Tébuconazole	25 (seul : 25)	20-100000 (6)	1,08	0,9954
	Tétraconazole	20	20-100000 (6)	2,24	0,9968
	Triadiméfon	150	25-100000 (6)	1,75	0,9951
Triadiménol	1500	100-100000 (5)	3,72	0,9979	
N	Acétamipride	10	4-80000 (11)	0,97	0,9940
	Clothianidine	150	50-80000 (7)	1,68	0,9973
	Cycloxapride	50	20-80000 (9)	0,66	0,9966
	Dinotéfurane	600	180-50000 (4)	3,85	0,9988
	Flupyradifurone	25	7-80000 (10)	2,73	0,9993
	Imidaclopride	200 (seul : 10)	90-80000 (6)	1,05	0,9987
	Nitenpyrame	100	55-80000 (9)	1,50	0,9915
	Sulfoxaflor	10	2-80000 (11)	0,82	0,9992
	Thiaclopride	4	1-80000 (13)	0,99	0,9999
	Thiaméthoxame	50	20-50000 (9)	1,00	0,9988
M	Acétamipride N desmethyl	150	4-90000 (11)	1,58	0,9998
	Clothianidine urée	30	90-90000 (7)	3,06	0,9965
	Imidaclopride urée	10	30-90000 (11)	0,58	0,9993
	Thiaclopride amide	20	7-90000 (11)	8,80	0,9994

a : pente de la droite de type  $y = ax$ , A : Azoles, LQ : Limite de Quantification, M : Métabolites des néonicotinoïdes, N : Néonicotinoïdes, R<sup>2</sup> : coefficient de corrélation, SPE : Extraction sur Phase Solide

Le Tableau 30 énumère les performances du protocole d'extraction plasma avec analyse en SPE en ligne avec le protocole 25 µL. L'échantillon supplémenté (« spike » en anglais) à forte concentration a été réalisé à une concentration de 1500 pg/g plasma excepté pour le prothioconazole avec une concentration dix fois supérieure. Les rendements sont calculés et doivent être compris entre 40 et 160 % pour valider la molécule.

Certaines concentrations dans les échantillons pourront être gardées à condition que tous les critères de validation de l'échantillon soient validés bien que la concentration calculée soit inférieure à la LQ définie initialement sur les « spikes ». Pour chacun de ces cas, les conditions spécifiques seront à expliciter. Ceci est dû à la matrice plasma qui est une matrice complexe avec des effets variables en fonction des espèces.

Tableau 30 : Justesse et sensibilité du protocole d'extraction plasma pour les trois méthodes distinctes en SPE en ligne avec 25 µL de prise d'essai

		Justesse d'extraction en matrice plasma M ± SD (%)		Sensibilité en matrice plasma M ± SD (pg/g plasma)	
		A forte concentration (n <sub>A</sub> = 18, n <sub>N</sub> = 18, n <sub>M</sub> = 13)	A la LQ (n <sub>A</sub> = 7, n <sub>N</sub> = 16, n <sub>M</sub> = 13)	A forte concentration (n <sub>A</sub> = 18, n <sub>N</sub> = 18, n <sub>M</sub> = 13)	A la LQ (n <sub>A</sub> = 7, n <sub>N</sub> = 16, n <sub>M</sub> = 13)
A	Cyproconazole	97 ± 13	101 ± 10	14,1 ± 7,9	6,1 ± 2,7
	Difénoconazole	108 ± 31	104 ± 20	15,1 ± 16,5	4,2 ± 2,9
	Epoxiconazole	123 ± 16	328 ± 192	112 ± 165	92,0 ± 46,0
	Fenbuconazole	101 ± 11	122 ± 31	40,5 ± 18,4	32,5 ± 7,6
	Flusilazole	71 ± 20	48 ± 13	12,0 ± 6,3	4,4 ± 2,3
	Flutriafol	97 ± 17	87 ± 14	13,2 ± 8,9	6,3 ± 2,6
	Imazalil	99 ± 18	84 ± 22	25,1 ± 56,2	16,7 ± 10,3
	Metconazole	105 ± 16	126 ± 29	41,3 ± 39,8	67,2 ± 58,5
	Penconazole	88 ± 15	80 ± 22	8,3 ± 6,6	4,7 ± 1,2
	Prochloraze	101 ± 31	95 ± 44	25,4 ± 15,0	10,8 ± 3,7
	Propiconazole	100 ± 7	75 ± 40	48,1 ± 63,9	60,0 ± 22,9
	Prothioconazole	117 ± 63	74 ± 80	3417 ± 4226	3225 ± 1020
	Tébuconazole	99 ± 11	109 ± 20	12,5 ± 9,2	3,8 ± 2,9
	Tétraconazole	99 ± 12	111 ± 56	37,2 ± 28,3	9,2 ± 2,4
	Triadiméfon	104 ± 15	108 ± 52	64,1 ± 44,4	40,0 ± 14,6
Triadiménol	99 ± 12	103 ± 27	40,6 ± 56,7	29,6 ± 41,9	
N	Acétamipride	100 ± 6	116 ± 8	3,6 ± 1,7	2,3 ± 1,0
	Clothianidine	100 ± 7	108 ± 7	65,8 ± 40,5	44,2 ± 17,4
	Cycloxapride	104 ± 11	98 ± 11	31,1 ± 13,0	18,8 ± 9,1
	Dinotéfurane	111 ± 41	118 ± 20	1316 ± 2488	567 ± 666,0
	Flupyradifurone	115 ± 18	113 ± 16	37,7 ± 61,0	21,6 ± 16,5
	Imidaclopride	95 ± 8	122 ± 26	109,9 ± 64,1	63,8 ± 26,9
	Nitenpyrame	101 ± 12	99 ± 14	105,3 ± 94,8	88,4 ± 83,2
	Sulfoxaflor	95 ± 8	102 ± 6	6,4 ± 5,4	4,6 ± 2,1
	Thiaclopride	99 ± 6	126 ± 16	2,9 ± 3,0	1,8 ± 0,9
Thiaméthoxame	101 ± 4	109 ± 8	26,2 ± 19,3	17,7 ± 8,7	
M	Acétamipride N desmethyl	97 ± 7	104 ± 9	5,3 ± 5,4	2,9 ± 1,8
	Clothianidine urée	96 ± 6	93 ± 11	87,0 ± 39,1	71,5 ± 45,1
	Imidaclopride urée	92 ± 6	109 ± 16	33,3 ± 33,0	20,5 ± 14,9
	Thiaclopride amide	140 ± 60	101 ± 45	66,5 ± 115,9	11,7 ± 6,6

A : Azoles, LQ : Limite de Quantification, M ± SD : moyenne ± écart-type, M : Métabolites des néonicotinoïdes, N : Néonicotinoïdes

Pour le protocole 10 µL, réalisé uniquement pour l'analyse des azoles, les justesses d'extraction et sensibilité à ces deux mêmes concentrations sont réunies dans le Tableau 31. Le prothioconazole n'est pas validé avec ce protocole générant des rendements de quantification/extraction supérieurs à 400 %. L'époxiconazole n'a pas été validé en matrice de référence plasma de poulet à cause d'une interférence sur la transition de quantification. En revanche, cette molécule est bien validée en matrice plasma de mésange où l'interférence n'est pas présente. En ce qui concerne la méthode 10 µL pour la quantification des néonicotinoïdes, toutes les molécules ont bien été validées. En revanche, cette méthode n'a pas été appliquées pour de réels échantillons. La quantification des métabolites néonicotinoïdes n'a pas été vérifiée avec ce protocole.

Tableau 31 : Justesse et sensibilité du protocole d'extraction/quantification plasma pour les azoles et néonicotinoïdes en SPE en ligne avec 10 µL de prise d'essai

	Justesse d'extraction/quantification en matrice plasma M ± SD (%)		Sensibilité en matrice plasma M ± SD (pg/g plasma)	
	A forte concentration (n <sub>A</sub> = 2)	A la LQ (n <sub>A</sub> = 6, n <sub>N</sub> = 3)	A forte concentration (n <sub>A</sub> = 2)	A la LQ (n <sub>A</sub> = 6, n <sub>N</sub> = 3)
Cyproconazole	79	103 ± 6	6,9	5,3 ± 1,2
Difénoconazole	119	148 ± 11	11,8	6,2 ± 3,6
Epoxiconazole	124	389 ± 185	423,6	141,5 ± 48,2
Fenbuconazole	101	159 (n = 1 plasma mésange)	329,4	22,6 (n = 1 plasma mésange)
Flusilazole	57	85 ± 66	6,9	31,9 ± 15,6
Flutriafol	73	53 ± 14	6,9	8,9 ± 4,1
Imazalil	78	85 ± 7	5,1	5,7 ± 2,4
A Metconazole	97	95 ± 6	9,6	20,0 ± 2,5
Penconazole	78	137 ± 13	27,1	54,4 ± 43,3
Prochloraze	88	101 ± 8	133,8	7,6 ± 3,8
Propiconazole	88	107 ± 12	15,8	21,3 ± 7,6
Prothioconazole	104	77 ± 4	16,3	53,4 ± 6,9
Tébuconazole	93	117 ± 16	X	7,6
Tétraconazole	81	110 ± 55	47,6	6,2 ± 1,3
Triadiméfon	97	113 ± 7	116,1	28,7 ± 28,6
Triadiménol	89	113 ± 7	116,1	59,0 ± 24,1
Acétamipride		109 ± 5		37,0 ± 21,2
Clothianidine		116 ± 5		1,9 ± 0,3
Cyclozapride		109 ± 4		38,9 ± 3,9
Dinotéfurane		84 ± 14		8,9 ± 1,5
N Flupyradifurone		88 ± 7		200,6 ± 36,0
Imidaclopride		102 ± 3		17,7 ± 4,6
Nitenpyrame		103 ± 3		45,0 ± 7,0
Sulfoxaflor		75 ± 5		20,8 ± 0,5
Thiaclopride		103 ± 2		3,6 ± 0,9
Thiaméthoxame		119 ± 2		1,4 ± 0,5
		115 ± 2		13,2 ± 6,3

x : molécule non validée, A : Azoles, LQ : Limite de Quantification, M ± SD : moyenne ± écart-type, N : Néonicotinoïdes, SPE : Extraction sur Phase Solide



ii. *Echantillons de plumes : sensibilité, linéarité et justesse*

L'analyse des extraits plumes se fait en injection directe sans le module SPE en ligne. Les molécules acétamipride, clothianidine, imidaclopride, thiaclopride et thiaméthoxame ont été analysées avec la méthode 5N pour déterminer les LQ et analyser les échantillons. Ceci a permis d'avoir une méthode légèrement plus sensible pour ces cinq molécules comme le montre la Figure 39.

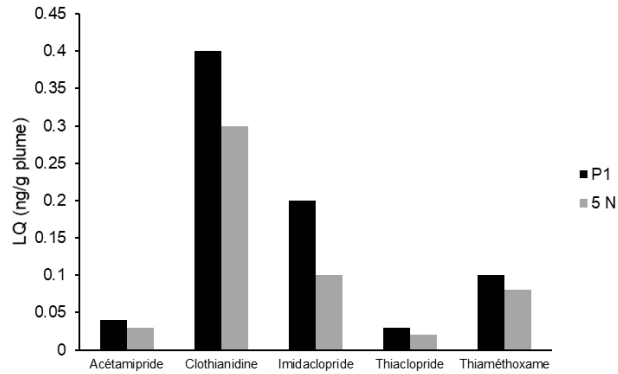


Figure 39 : LQ validées pour les deux méthodes d'acquisition P1 (toutes les molécules) et 5N (ces 5 néonicotinoïdes)

Les LQ ont été vérifiées pour la plupart des molécules après réalisation d'une gamme de « spike » en matrice plume (Tableau 32) dopée à plusieurs concentrations. Mais certaines LQ ont été obtenues par extrapolation de la concentration calculée présente dans cette matrice plume. Pour deux molécules (bitertanol et triadiménol), l'information de la LD a été maintenue. A cette LD, la transition de confirmation n'est pas validée mais n'a pas eu besoin d'être observée puisque ces molécules n'ont pas été détectées dans les échantillons analysés.

Les gammes d'étalonnage, réalisées par étalonnage interne, sont volontairement très étendues de façon à encadrer les concentrations calculées dans les échantillons. Tous les coefficients de corrélation  $R^2$  pour les gammes possibles sont supérieurs à 0,99. Le fluquinconazole, le prothioconazole et l'acide nicotinique ne sont pas validés pour ce protocole. En témoin solvant, le rendement d'extraction/quantification du fluquinconazole est de  $32 \% \pm 55 \%$  ( $n = 3$ ) qui signifie une perte ou une mauvaise quantification de celui-ci durant le protocole tout comme le prothioconazole avec ses  $35 \% \pm 5 \%$  ( $n = 3$ ). Pour l'acide nicotinique, des rendements supérieurs à 160 % sont obtenus en matrice plume :  $198 \% \pm 49 \%$  ( $n = 12$ ). Les droites de linéarité n'ont pas été étudiées pour ces trois molécules en matrice plume.

Tableau 32 : Sensibilité et gamme de linéarité par étalonnage interne validées en matrice plume

	Famille	LQ validée (LD) (ng/g plumes)	Gamme linéarité (ng/g plumes) (nombre de niveaux)	a	R <sup>2</sup>	
	6-chloronicotinique acide	M	85,0	75,0-1400 (9)	104,0	0,9902
	Acétamipride	N	0,03 <sup>1,2</sup>	0,5-1000 (17)	1,6	0,9961
	Acétamipride N desmethyl	M	0,03 <sup>1</sup>	0,5-1000 (17)	1,7	0,9939
	Bitertanol	A <sup>3</sup>	200,0 (30,0)	200,0-2400 (13)	7,7	0,9901
	Bromuconazole	A <sup>3</sup>	3,0	3,0-600 (10)	2,5	0,9976
	Clothianidine	N	0,3 <sup>2</sup>	0,3-400 (13)	1,6	0,9911
	Clothianidine urée	M	1,8	1,8-500 (11)	0,7	0,9945
	Cycloxapride	N	0,4	0,4-1300 (21)	2,5	0,9924
	Cyproconazole	A	0,2	0,2-1800 (27)	1,6	0,9917
	Difénoconazole	A	0,5	0,5-1000 (17)	0,6	0,9923
	Dinotéfurane	N	5,0	5,0-1600 (21)	0,8	0,9906
	Epoconazole	A	2,5	2,5-2200 (14)	0,9	0,9904
	Fenbuconazole	A	0,5	0,5-1000 (16)	1,5	0,9905
	Flupyradifurone	N	0,8	0,8-2000 (26)	6,2	0,9916
	Fluquinconazole	A <sup>3</sup>		x		
	Flusilazole	A	0,3	0,3-1000 (17)	0,6	0,9915
	Flutriafol	A	0,3	0,3-1600 (26)	2,1	0,9907
	Imazalil	A	0,3	0,3-300 (14)	0,6	0,9989
	Imidaclopride	N	0,1 <sup>2</sup>	0,1-2000 (27)	1,5	0,9933
	Imidaclopride guanidine	M	0,1	0,1-1200 (18)	0,2	0,9947
	Imidaclopride oléfine	M	7,6	7,0-1500 (10)	66,0	0,9933
	Imidaclopride urée	M	0,7	0,7-1500 (20)	0,4	0,9942
	Iaconazole	A <sup>3</sup>	3,0	3,0-500 (11)	12,3	0,9985
	Metconazole	A	0,4	0,4-1000 (15)	0,6	0,9927
	Myclobutanil	A <sup>3</sup>	0,5	0,5-600 (16)	1,5	0,9987
	Nicotinique acide	M		x		
	Nitenpyrame	N	0,5	0,5-2200 (25)	0,6	0,9931
	Penconazole	M	0,2	0,2-1500 (23)	1,5	0,9942
	Prochloraze	A	0,8	0,8-300 (11)	1,6	0,9985
	Propiconazole	A	10,0	10,0-1000 (21)	1,2	0,9927
	Prothioconazole	A		x		
	Sulfoxaflo	A	0,2	0,2-2000 (26)	1,9	0,9912
	Tébuconazole	A	0,4 <sup>1</sup>	0,3-1400 (21)	1,4	0,9907
	Tétraconazole	A	3,5	3,5-2000 (25)	2,7	0,9927
	Thiaclopride	N	0,02 <sup>2</sup>	0,02-500 (14)	1,0	0,9933
	Thiaclopride amide	M	0,5	0,5-2000 (27)	4,1	0,9915
	Thiaméthoxame	N	0,08 <sup>2</sup>	0,08-200 (14)	1,7	0,9922
	Triadiméfon	A	1,5	1,5-2000 (24)	1,6	0,9938
	Triadiménol	A	40,0 (15,0)	15,0-600 (8)	5,6	0,9990
	Triticonazole	A <sup>3</sup>	30,0	30,0-500 (5)	2,0	0,9984

x : molécule non validée, a : pente de la droite de type  $y = ax$ , A : Azoles, LD : Limite de Détection, LQ : Limite de Quantification, M : Métabolites des néonicotinoïdes, N : Néonicotinoïdes, R<sup>2</sup> : coefficient de corrélation

<sup>1</sup>LQ établie par extrapolation sur la concentration calculée comme molécule présente dans la matrice de référence - <sup>2</sup>LQ établie avec la méthode d'analyse 5N, <sup>3</sup>6 « nouveaux » azoles développés ultérieurement

Ensuite, la justesse de l'extraction est vérifiée à deux concentrations : à la LQ et une à forte concentration (Tableau 33). La solution à la LQ inclut toutes les molécules, exceptés 6 « nouveaux » azoles développés ultérieurement. Leur LQ a été établie dans un second temps comparé aux autres molécules c'est pourquoi le nombre de répliquât est inférieur ( $n = 1$ ) et que l'écart-type ne peut être calculé.

Quant à la solution à forte concentration, elle permet de doper les plumes de poulet de référence à une concentration allant de 10 ng/g plumes pour la plupart des molécules à 150 ng/g plumes pour le 6-chloronicotinique acide. Les EI ont été insérés pour obtenir une concentration finale de 10 ng/g plumes.

Tableau 33 : Justesse d'extraction/quantification et sensibilité du protocole d'extraction des plumes

Famille		Justesse d'extraction/quantification en matrice plume M ± SD (%)		Sensibilité extrapolée en matrice plume M ± SD (ng/g plumes)	
		A forte concentration (n = 12)	A la LQ (n = 9) (*n = 1)	A forte concentration (n = 12)	A la LQ (n = 9) (*n = 1)
		6-chloronicotinique acide	M	77 ± 17	63 ± 14
Acétamipride	N	101 ± 26	217 ± 46	0,03 ± 0,01	0,009 ± 0,005
Acétamipride N desmethyl	M	93 ± 22	265 ± 51	0,04 ± 0,05	0,005 ± 0,002
Bitertanol	A <sup>1</sup>	103 ± 21	153 *	0,84 ± 0,40	29,53 *
Bromuconazole	A <sup>1</sup>	86 ± 20	76 *	1,02 ± 0,30	2,83 *
Clothianidine	N	101 ± 25	82 ± 9	0,33 ± 0,14	0,31 ± 0,12
Clothianidine urée	M	97 ± 22	82 ± 14	0,11 ± 0,11	0,08 ± 0,03
Cyclozapride	N	86 ± 18	70 ± 17	0,18 ± 0,09	0,16 ± 0,11
Cyproconazole	A	94 ± 18	82 ± 10	0,15 ± 0,11	0,15 ± 0,09
Difénoconazole	A	136 ± 36	103 ± 23	0,30 ± 0,16	0,27 ± 0,11
Dinotéfurane	N	110 ± 23	107 ± 18	1,97 ± 0,72	2,62 ± 2,27
Epoxiconazole	A	101 ± 19	86 ± 18	0,82 ± 1,34	0,64 ± 1,14
Fenbuconazole	A	95 ± 19	77 ± 19	0,62 ± 0,33	0,51 ± 0,18
Flupyradifurone	N	98 ± 23	83 ± 18	0,34 ± 0,17	0,34 ± 0,26
Fluquinconazole	A <sup>1</sup>			x	
Flusilazole	A	90 ± 30	59 ± 14	0,09 ± 0,09	0,11 ± 0,18
Flutriafol	A	88 ± 18	64 ± 11	0,08 ± 0,04	0,11 ± 0,12
Imazalil	A	86 ± 16	74 ± 15	0,12 ± 0,09	0,12 ± 0,13
Imidaclopride	N	99 ± 22	96 ± 10	0,20 ± 0,10	0,13 ± 0,05
Imidaclopride guanidine	M	101 ± 27	77 ± 15	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Imidaclopride oléfine	M	100 ± 25	73 ± 32	7,01 ± 5,01	7,05 ± 4,41
Imidaclopride urée	M	100 ± 21	119 ± 17	0,05 ± 0,03	0,04 ± 0,01
Ipronazole	A <sup>1</sup>	88 ± 23	73 *	0,23 ± 0,19	0,97 *
Metconazole	A	87 ± 28	67 ± 13	0,46 ± 0,64	0,22 ± 0,16
Myclobutanil	A <sup>1</sup>	106 ± 19	46 *	0,06 ± 0,02	0,08 *
Nicotinique acide	M			x	
Nitenpyrame	N	98 ± 21	74 ± 12	0,29 ± 0,10	0,35 ± 0,09
Penconazole	M	85 ± 18	66 ± 19	0,14 ± 0,11	0,23 ± 0,24
Prochloraze	A	79 ± 11	61 ± 16	0,42 ± 0,14	0,49 ± 0,19
Propiconazole	A	103 ± 19	95 ± 21	0,61 ± 0,25	0,40 ± 0,13
Prothioconazole	A			x	
Sulfoxaflor	N	97 ± 24	76 ± 16	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02
Tébuconazole	A	100 ± 23	105 ± 13	0,42 ± 0,39	0,26 ± 0,25
Tétraconazole	A	91 ± 16	70 ± 14	1,03 ± 0,32	1,11 ± 0,30
Thiaclopride	N	99 ± 23	105 ± 23	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Thiaclopride amide	M	102 ± 24	81 ± 14	0,14 ± 0,10	0,15 ± 0,06
Thiaméthoxame	N	101 ± 23	76 ± 20	0,07 ± 0,04	0,07 ± 0,02
Triadiméfon	A	107 ± 22	84 ± 12	0,95 ± 0,46	0,94 ± 0,59
Triadiménol	A	90 ± 18	80 ± 14	0,73 ± 0,25	0,75 ± 0,30
Triticonazole	A <sup>1</sup>	101 ± 26	81 *	0,51 ± 0,86	0,17 *

x : molécule non validée, A : Azoles, LQ : Limite de Quantification, M ± SD : moyenne ± écart-type, M : Métabolites des néonicotinoïdes, N : Néonicotinoïdes

<sup>1</sup> 6 « nouveaux » azoles développés ultérieurement

Certaines concentrations dans les échantillons pourront être maintenues à condition que tous les critères de validation de l'échantillon soient validés bien que la concentration calculée soit inférieure à la LQ définie initialement sur les « spikes ». Dans ce cas-là, les échantillons seront additionnés d'une annotation.

*iii. Echantillons de mousses PUF : sensibilité, linéarité et justesse*

Les mousses PUF ont été analysées seulement en azoles et néonicotinoïdes. Les métabolites des néonicotinoïdes n'ont pas été recherchés dans cette matrice. Pour définir les limites de quantification LQ en ng/PUF, le maximum entre ces trois valeurs a été sélectionné :

- Concentration calculée dans le blanc protocole multipliée par trois,
- LQ extrapolée de la mousse PUF dopée qui a suivi le protocole,
- LQ extrapolée sur les concentrations calculées dans les échantillons lorsque la molécule a été quantifiée.

Le Tableau 34 réunit les LQ finales validées ainsi que la justesse d'extraction/quantification pour les mousses dopées à une concentration d'environ 10 ng/g PUF. La sensibilité extrapolée de cette mousse dopée a également été ajoutée au tableau. Le fluquinconazole ainsi que le prothioconazole ne sont pas validés avec ce protocole et cette matrice mousse PUF. Des rendements d'extraction/quantification inférieurs à 60 % sont obtenus pour ces deux molécules : 33 % ± 14 % et 24 % ± 4 % respectivement (n = 3). De plus, les rapports d'aires TC/TQ pour le prothioconazole ne sont pas inclus dans l'intervalle acceptée.

Tableau 34 : Sensibilité validée et justesse d'extraction/quantification du protocole d'extraction des mousses PUF pour la méthode P2 en injection directe

	Famille	LQ validée (ng/PUF)	Justesse	Sensibilité extrapolée
			d'extraction/quantification (n = 3) M ± SD (%)	en matrice plume (n = 3) M ± SD (ng/PUF)
Acétamipride	N	0,07	86 ± 8	0,002 ± 0,001
Bitertanol	A	0,30	69 ± 19	0,043 ± 0,028
Bromuconazole	A	0,64	102 ± 6	0,087 ± 0,064
Clothianidine	N	0,12	85 ± 7	0,018 ± 0,007
Cycloxapride	N	1,11	111 ± 7	0,142 ± 0,120
Cyproconazole	A	2,65	93 ± 12	0,038 ± 0,014
Difénoconazole	A	0,90	57 ± 11	0,113 ± 0,099
Dinotéfurane	N	0,29	91 ± 13	0,065 ± 0,006
Epoxiconazole	A	2,41	99 ± 18	0,032 ± 0,016
Fenbuconazole	A	1,48	80 ± 10	0,024 ± 0,004
Flupyradifurone	N	0,10	73 ± 14	0,018 ± 0,009
Fluquinconazole	A			
Flusilazole	A	0,37	89 ± 2	0,039 ± 0,046
Flutriafol	A	3,80	97 ± 11	0,547 ± 0,349
Imazalil	A	0,25	102 ± 10	0,035 ± 0,029
Imidaclopride	N	0,66	82 ± 13	0,047 ± 0,023
Ipconazole	A	0,16	54 ± 4	0,030 ± 0,016
Metconazole	A	0,33	81 ± 4	0,022 ± 0,006
Myclobutanil	A	0,48	93 ± 15	0,011 ± 0,001
Nitenpyrame	N	0,60	81 ± 12	0,11 ± 0,035
Penconazole	A	0,33	78 ± 9	0,015 ± 0,008
Prochloraze	A	2,94	41 ± 8	0,092 ± 0,043
Propiconazole	A	1,24	87 ± 15	0,03 ± 0,016
Prothioconazole	A			
Sulfoxaflor	N	0,01	74 ± 5	0,003 ± 0,0004
Tébuconazole	A	0,69	78 ± 3	0,017 ± 0,016
Tétraconazole	A	2,38	103 ± 15	0,028 ± 0,011
Thiaclopride	N	0,18	89 ± 7	0,002 ± 0,002
Thiaméthoxame	N	0,13	87 ± 6	0,035 ± 0,025
Triadiméfon	A	0,25	103 ± 30	0,054 ± 0,007
Triadiménol	A	0,14	74 ± 21	0,026 ± 0,013
Triticonazole	A	0,08	85 ± 22	0,010 ± 0,008

x : molécule non validée, A : Azoles, LQ : Limite de Quantification, M ± SD : moyenne ± écart-type, N : Néonicotinoïdes, PUF : PolyUrethane Foam

## 7. Bilan des échantillons extraits et analysés

Tous les échantillons prélevés sur les espèces capturées de manière aléatoire n'ont pu être analysés. Des choix ont été réalisés afin d'obtenir un ensemble homogène en termes de nombre d'échantillons et d'habitats. Tout d'abord, un nombre restreint d'échantillons par espèce ont été extraits et analysés. Puis, ce nombre a été augmenté si les premiers résultats semblaient pertinents.

### a. Echantillons de plasma

Au total, les différents échantillons de plasma qui ont été analysés dans le cadre de cette thèse sont donnés Tableau 35. Ce tableau s'accompagne également du nom de la méthode de préparation d'échantillon ainsi que la ou les méthodes d'analyse en SPE en ligne utilisées.

Tableau 35 : Bilan des échantillons de plasma accompagnés par la méthode de préparation et d'analyse en SPE en ligne

Espèce	Date	Nombre d'échantillons en tout et site	Méthode préparation	Nombre d'échantillons analysés par méthode analytique en SPE en ligne		
				A	N	M
Crapaud épineux (adulte)	Printemps 2018	21 Forêt (site : 3) 10 Agricole (site : 2)	25 µL	8/31	8/31	
	Automne 2019	24 Agricole (site : 1)		8/24	8/24	
Merle noir (juvénile ou adulte)	2016	28 Forêt (site : 4) 26 Viticole (site : 6) 22 Urbain (site : 5)	25 µL	78/86	21/86	10/86
	2019	6 Forêt (site : 4) 34 Viticole (site : 6)		6 Forêt 34 Viticole	15/40	15/40
Mésange charbonnière (juvénile ou adulte)	2019	8 Forêt (site : 4) 18 Viticole (site : 6)	10 µL	8 Forêt 18 Viticole		
Goéland (adulte) : Brun (GB) Argenté (GA) Marin (GM)	2016		25 µL		6 GA + 6 GB	6 GA + 6 GB
	2017			10 GBA	17 GB + 6 GA	17 GB + 6 GA
	2018	Île de Ré (site : 10)		10 GBA + 8 GMA	16 GB + 8 GM + 6 GA	16 GB + 8 GM + 6 GA
	2019				6 GA + 6 GB	6 GAA + 6 GB
	2020				3 GA + 7 GB	3 GA + 7 GB
Cigogne blanche (juvénile)	2019	39 Brouage (site : 8) 42 estuaire de la Gironde (site : 9)		10 Brouage 20 estuaire de la Gironde	10 Brouage 20 estuaire de la Gironde	10 Brouage 20 estuaire de la Gironde
Moineaux domestiques	2020	Expérience : 2 pools		Tébuconazole seul : 2		
Diamant mandarin	2016-2019	Expérience en double : 3 pools			Imidaclopride seul : 3	3

A : Azoles, GA : Goéland Argenté, GB : Goéland Brun, GM : Goéland Marin, M : Métabolites des néonicotinoïdes, N : Néonicotinoïdes, SPE : Extraction sur Phase Solide, n° des sites présentés Figure 30

Un premier jet d'échantillons a été analysé en azoles pour les merles noirs 2016. Obtenant des résultats intéressants, tous les échantillons possibles des deux années et des trois sites d'étude confondus ont été analysés en azoles. Les échantillons plasmatiques des mésanges provenant du même site viticole ont également été analysés en azoles mais pas en néonicotinoïdes par manque de quantité de plasma. Les azoles ont été privilégiés de par leur application sur les sites viticoles et leur intérêt environnemental.

Huit échantillons de crapauds épineux pour les deux saisons disponibles ont été analysés en azoles et en néonicotinoïdes mais aucun autre échantillon n'a été réalisé suite à ces premiers résultats non fructueux. Seuls quelques échantillons de goélands ont été analysés en azoles pour la même raison.

Pour les cigognes blanches, et ce pour les deux familles de molécules, 10 échantillons de chacune des deux zones de capture ont tout d'abord été sélectionnés avec un choix de nids varié. Puis, 10 autres échantillons provenant de l'estuaire de la Gironde ont été sélectionnés dont deux autres échantillons d'un même nid de cigognes où des molécules dans le précédent set d'échantillons ont été quantifiées.

En ce qui concerne les néonicotinoïdes pour les autres espèces, le but était d'avoir un nombre d'échantillons pour chacune comparable soit entre 10 et 20 pour chaque espèce, site ou année. Le choix des échantillons de merles noirs s'est appuyé sur les précédents résultats en azoles réalisés où la moitié des échantillons sélectionnés étaient positifs en azoles. Quant à la sélection des échantillons de goélands, les individus munis d'une balise GPS ont été analysés en priorité. Dans un premier temps, sur l'année 2018 les trois espèces GB, GM, GA ont été comparées. Au vu des résultats, seul le nombre d'échantillons des espèces GB et GA a été augmenté sur les autres années. La moitié des échantillons sélectionnés avait des concentrations « attendues » en néonicotinoïdes et l'autre moitié des concentrations « non attendues ». Ce terme « attendu » s'est appuyé sur la comparaison des trois taux isotopes du carbone (C), de l'azote (N) et du soufre (S) ainsi que sur le taux de mercure (Hg) mesurés au laboratoire LIENSs de La Rochelle et sur les composés perfluorés (Sebastiano et al., 2021) mesurés au laboratoire EPOC.

En effet, les individus avec des niveaux faibles sont généralement ceux utilisant beaucoup l'intérieur des terres et donc ceux chez lesquels on s'attend à trouver des néonicotinoïdes. Ceux avec des rapports isotopiques C/N et S élevés sont plus marins. Pour les échantillons capturés en 2020, ces taux d'isotopes et de mercure n'avaient pas été encore analysés au moment de la sélection des individus à analyser en néonicotinoïdes. Tous les échantillons capturés en 2020 ont donc été analysés.

## b. Echantillons de plumes

Les différents échantillons de plumes qui ont été analysés dans le cadre de cette thèse sont donnés Tableau 37.

Tableau 36 : Bilan des échantillons de plumes accompagnés par la méthode de préparation ainsi que d'analyse en injection directe

Espèce	Date prélevement	Nombre d'échantillons en tout et site	Méthode préparation échantillon plumes	Nombre d'échantillons analysés par méthode analytique ID
				P1 + 5N
Merle noir (juvénile ou adulte)	2016	35 Forêt (site : 4) 32 Viticole (site : 6) 23 Urbain (site : 5) (plumes rectrices)	Micro-ondes 20 mg	7 Forêts 29 Viticole 8 Urbain
	2017	1 Forêt pour test 12 Viticole (site : 6) (plumes rectrices)		1 Forêt 12 Viticole Juste P1 (sans 5N) sans les 6 « nouveaux » azoles développés en plus ni le flupyradifurone
	2019	68 Forêt (site : 4) 34 Viticole (site : 6) 48 Urbain (site : 5) (plumes rectrices)		3 Forêt 32 Viticole
Mésange charbonnière (juvénile ou adulte)	2019	109 Forêt (site : 4) 105 Viticole (site : 6) 57 Urbain (site : 5) (plumes ventrales)	Non analysé comme peu de matière avec le protocole sélectionné	
Goéland (adulte) : Brun (GB) Argenté (GA)	2016	Île de Ré (site : 10) (plumes ventrales + dorsales)	Micro-ondes 20 mg	5 GA + 5 GB
	2019			5 GA + 5 GB
	2020			3 GA + 7 GB
Cigogne blanche (juvénile)	2019	125 Brouage (site : 8) 43 estuaire de la Gironde (site : 9) (plumes de contour)		10 Brouage 10 Estuaire de la Gironde
Moineau domestique	2020	2 <sup>ème</sup> expérience : 2 pools pré contrôle 2 pools pré expérience 3 pools post contrôle 3 pools post expérience (plumes rectrices)	Micro-ondes 10 mg	Tébuconazole seul : 10

5N : 5 néonicotinoïdes, ID : Injection Directe, GA : Goéland Argenté, GB : Goéland Brun, P1 : Toutes les molécules pour ID plumes, n° des sites présentés Figure 30

Dans un premier temps, l'analyse s'est portée sur les échantillons de plumes de merles noirs 2017 d'où une analyse avec la liste des molécules non complète. Les échantillons de cette année étaient moins précieux et ont pu donc servir à tester la méthode d'extraction et d'analyse. Puis, celle-ci donnant des résultats prometteurs intéressants et valides, tous les échantillons merles 2016 et 2019 ont été extraits.

Malheureusement, avec cette technique de préparation d'échantillon, la quantité de matière disponible pour les échantillons de mésanges charbonnières est trop faible. Leurs plumes n'ont pu être analysées.

En ce qui concerne le choix des plumes de goélands, aucune plume de GM n'a été prélevée, l'analyse s'est donc portée sur les espèces GA et GB uniquement pour les années 2016, 2019 et 2020. De la même manière que pour le plasma, deux échantillons « non attendus » et trois « attendus » en molécules ont été sélectionnés pour chaque année et espèce disponibles avec en priorité les individus munis d'une balise GPS et pour lesquels le plasma a été également analysé.

La sélection des plumes de cigognes blanches correspond à la même liste que les analyses de plasma.

#### c. Echantillons de mousses PUF

Les mousses PUF ont été extraites avec le protocole PUF ASE précédemment décrit. Les extraits ont ensuite été analysés en injection directe pour analyser seulement les natifs azoles et néonicotinoïdes avec la méthode P2 préalablement décrite.

#### d. Données incluses dans les chapitres du manuscrit et les publications

##### i. *Echantillons et données brutes inclus*

Dans chaque axe de la thèse, le choix des échantillons analysés et sélectionnés a été fait afin de répondre à des problématiques définies. Le Tableau 37 permet de recenser les données employées dans chaque chapitre et publication du manuscrit de thèse.



Tableau 37 : Bilan des données mentionnées dans les chapitre du manuscrit et des publications insérées

Chapitre du manuscrit	Publication	Données incluses
3	Pas de publication	Mousses PUF / A + N
	1	Développement / Plasma merles noirs 2016 / A
4	2	Applications : Plasma merles noirs 2016 / A Plasma merles noirs 2019 / A Mousses PUF / A Données physiologiques et éco-toxicologiques
	Pas de publication	Plasma cigognes blanches / A Plasma goélands / A Plasma crapaud épineux / A
	3	Plasma merles noirs 2016, 2019 / N Plasma cigognes blanches / N Plasma goélands / N
	Pas de publication	Plasma crapaud épineux / N Plasma oiseaux / M
5	Pas de publication	Expérience moineaux domestiques / tébuconazole Expérience diamant mandarin / imidaclopride Développement plumes / A + N + M Plumes merles noirs 2016, 2019 / A Plumes cigognes blanches / A Plumes goélands / A
	Pas de publication	Plumes merles noirs 2016, 2019 / N + M Plumes cigognes blanches / N + M Plumes goélands / N + M
	Pas de publication	Maximum concentration plasma et plumes / A + N

A : Azoles, M : Métabolites des néonicotinoïdes, N : Néonicotinoïdes, PUF : PolyUrethane Foam

Le chapitre suivant, chapitre 3, mentionnera les résultats de l'extraction des mousses PUF afin d'avoir une notion de l'ambiance chimique sur certains sites. Les sites n°4 et n°6 sont en commun avec la capture des merles noirs et des mésanges charbonnières.

Pour l'axe dédié aux analyses de plasma, soit le chapitre 4, la publication n°1 méthodologique mentionne seulement quelques échantillons de chaque site (forêt, ville, viticole) de plasma de merle noirs 2016 en azoles de façon à illustrer l'utilisation du plasma pour mesurer ces contaminants. Cette publication est essentiellement portée sur le développement de la méthode analytique SPE en ligne. Dans la continuité de cette publication, la deuxième s'appuie sur tous les résultats azoles de l'espèce merle noir pour interpréter les niveaux selon les sites, les données physiologiques et éco-toxicologiques des individus. Cette publication intègre également les concentrations des mousses PUF en azoles installées sur les mêmes sites de capture.

Dans une deuxième partie de ce même chapitre, les résultats en néonicotinoïdes et leurs métabolites seront développés. La publication n°3 mentionnera les résultats pour ces molécules pour toutes les espèces vertébrées capturées dans la région Nouvelle-Aquitaine à savoir les merles noirs, les goélands et les cigognes blanches.

Ensuite, pour le chapitre 5 dédié aux plumes, une première partie méthodologique sera proposée. Les résultats en tébuconazole des pools de l'expérience laboratoire moineaux seront ensuite mentionnés dans cette partie. Les concentrations pour les espèces merles noirs, goélands et cigognes blanches seront comparés avec un sous partie qui réunira les azoles puis une autre qui mentionnera les résultats néonicotinoïdes et leurs métabolites. Les résultats seront comparés selon les espèces et la littérature pour ces deux familles. La comparaison entre la matrice plasma et plumes sera également mentionnée dans ce chapitre en incluant les propriétés physico-chimiques des molécules.

## *ii. Données des tests statistiques*

Certains tests statistiques ont été réalisés de façon à vérifier si des différences significatives entre des groupes étaient présentes. Pour ce faire, les tests ont été réalisés uniquement sur les molécules ayant des fréquences de quantification supérieures à 20 % dans au moins un des groupes étudiés. Les valeurs des concentrations inférieures à la LQ ont été remplacées par la moitié de la LQ de la molécule en question.

Si la comparaison concerne deux groupes, c'est le test statistique de Mann-Whitney a été mis en œuvre. Dans le cas où au moins trois groupes ont été comparés, c'est le test statistique de Kruskal-Wallis qui a été réalisé sur l'ensemble des groupes. Si une différence significative a été observée pour une des molécules, ce test a ensuite été complété du Post Hoc par paire de façon à avoir plus de détails sur les groupes concernés.

Que ce soit sur ces tests statistiques ou sur les droites linéaires tracées, la significativité dépend de la valeur de la p-value. On considère qu'une différence significative est présente à condition que la valeur de la p-value soit inférieure à 5 % (\*). Elle peut également être plus faible et donc préciser une plus grande significativité avec des valeurs de 1 % (\*\*) ou 0,1 % (\*\*\*). Si la valeur de la p-value est supérieure à 5 %, aucune différence significative ne peut être constaté (n.s. : non significatif).

Tous ces tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel SAS University edition, SAS company.

Dans certaines parties de la thèse, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée de façon à représenter les données de différentes espèces sur un même graphique. Pour ce faire les données de concentrations en logarithme ont été centré réduites. Les graphiques ont été réalisés à partir du logiciel IBM SPSS Statistics, version 22.



## Chapitre 3 : Usages et présence des azoles et néonicotinoïdes dans le compartiment aérien

1. Explication de la démarche .....	157
2. Azoles vendus et présents dans le compartiment aérien des sites étudiés.....	158
a. Utilisation des azoles en Nouvelle-Aquitaine .....	158
b. Suivi du compartiment aérien en azoles.....	159
3. Néonicotinoïdes vendus et présents dans le compartiment aérien des sites étudiés ...	171
a. Utilisation des néonicotinoïdes en région Nouvelle-Aquitaine.....	171
b. Suivi du compartiment aérien en néonicotinoïdes .....	172
4. Bilan sur les usages reliés à la présence des azoles et néonicotinoïdes dans le compartiment atmosphérique .....	176



## 1. Explication de la démarche

N'ayant pas eu accès aux molécules appliquées à proximité des sites de capture des individus, une recherche préalable a été réalisée. Cette recherche se découpe en deux parties pour chaque famille de molécules azoles et néonicotinoïdes.

La première partie consiste à extraire les quantités des substances actives achetées et vendues sur les sites d'étude afin de les relier à leur utilisation privilégiée sur grandes cultures et/ou viticoles. Cette première étape a été réalisée dans le chapitre 2 matériel et méthodes afin de prioriser les molécules à analyser. Un bilan spécifique aux molécules analysées sera tout de même réalisé dans ce chapitre agrémenté des couleurs mentionnées dans le chapitre 2 matériel et méthodes. A savoir la couleur jaune permet la caractérisation d'une molécule autorisée à être appliquée sur grandes cultures, violet sur les vignes et le bleu pour une autorisation couplée.

La deuxième partie concerne l'analyse des mousses PUF (PolyUrethane Foam en anglais) appliquées sur trois sites. Ces informations permettent une meilleure caractérisation de la notion d'ambiance chimique et donc une partie de l'exposome des espèces étudiées dans le cadre de cette thèse. Deux des trois sites dont le compartiment air a été échantillonné sont identiques à ceux de capture des merles noirs et mésanges charbonnières. Il s'agit d'un site forestier (site n°4 de la Figure 30 du chapitre 2) et d'un site viticole (site n°6 de la Figure 30) sur deux. Un autre site viticole (n°7 sur la Figure 30) a été échantillonné dans lequel aucun animal sauvage n'a été capturé. Les descriptifs des sites avec les cultures environnantes ont été préalablement explicités dans le chapitre 2 avec la Figure 32. Le site n°4 est principalement forestier avec quelques rares cultures céréalières qui sont présentes au-delà d'un rayon d'un km. Le site n°6 est entouré de zones viticoles ainsi que de cultures céréalières alors que le site n°7 est quasi exclusivement viticole.

Les concentrations ont tout d'abord été obtenues en ng/PUF dont les LQ sont mentionnées dans le Tableau 34 du chapitre 2. Les concentrations dans l'air sont principalement exprimées en ng/m<sup>3</sup> d'air échantillonné dans les bases de données Phyt-Atmo et dans la littérature (Coscollà et al., 2013; Raheison et al., 2019; Schummer et al., 2010). Quelques études mentionnent les concentrations en ng/PUF (Cruz, 2015). De façon à pouvoir comparer toutes ces données, les concentrations en ng/PUF de notre étude sont divisées par le nombre de jours d'échantillonnage ainsi que par un taux d'échantillonnage (Rs) moyen fixé à 4,5 m<sup>3</sup>/jour pour arriver à des concentrations estimées en ng/m<sup>3</sup>. Ce taux a été fixé par rapport aux données trouvées dans la bibliographie. Des valeurs ont été référencées pour les PCB entre 2 et 5 m<sup>3</sup>/jour (Chaemfa et al., 2008), de 3,5 m<sup>3</sup>/jour (Shoeib et Harner, 2002) ou encore entre 3,8-5,2 m<sup>3</sup>/j (Tuduri et al., 2006), pour le tébuconazole une valeur de 5,82 m<sup>3</sup>/j est obtenue (Lévy et al., 2020) et pour finir pour d'autres familles de polluants diverses les valeurs sont comprises entre 1 et 8 m<sup>3</sup>/j (Pozo et al., 2006).

Le nombre de jours d'exposition des mousses PUF sur le terrain varient entre 28 et 51 jours. Les limites de quantification estimées ont été calculées avec un nombre moyen (sur toutes les dates d'échantillonnage des mousses PUF) de 35 jours.

## 2. Azoles vendus et présents dans le compartiment aérien des sites étudiés

### a. Utilisation des azoles en Nouvelle-Aquitaine

Parmi la liste des azoles analysés, certains sont appliqués pour un usage sur grandes cultures, viticole voire les deux. Le Tableau 38 recense les quantités vendues pour ces molécules sur l'année 2017, l'année de déploiement des mousses PUF sur le terrain. Ce tableau est issu du Tableau 13 mentionné dans le chapitre 2.

Tableau 38 : Quantités de substances actives des azoles étudiés vendues dans les deux départements Charente et Charente-Maritime en 2017 par types de culture extrait du Tableau 13

	Quantités de substances actives vendues dans les départements Charente et Charente-Maritime (kg)		
	2017	2017 usage grandes cultures	2017 usage vigne
Bitertanol	0	0	0
Bromuconazole	1586	1586	0
Cyproconazole	4128	4128	0
Difénoconazole	849	835	720
Époxiconazole	10295	10295	0
Fenbuconazole	551	0	545
Fluquinconazole	0	0	0
Flusilazole	0	0	0
Flutriafol	1	1	0
Imazalil	0	0	0
Ipconazole	47	47	0
Metconazole	4360	4360	0
Myclobutanil	477	0	477
Penconazole	16	0	13
Prochloraze	23230	23229	0
Propiconazole	4840	4833	0
Prothioconazole	20746	20746	0
Tébuconazole	22965	20563	5359
Tétraconazole	867	38	829
Triadiméfon	0	0	0
Triadiménol	32	0	32
Triticonazole	228	220	0

Produits phytosanitaires autorisés à usage grandes cultures (jaune), viticole (violet), les deux (bleu).

Les difénoconazole, fenbuconazole, myclobutanil, penconazole, tébuconazole, tétraconazole et triadiménol sont achetés pour autorisation d'application sur la vigne. En ce qui concerne l'usage grandes cultures, les molécules suivantes sont autorisées pour être appliquées : le bromuconazole, le cyproconazole, le difénoconazole, l'époxiconazole, le flutriafol, l'ipconazole, le metconazole, le prochloraze, le propiconazole, le prothioconazole, le tébuconazole, le tétraconazole ainsi que le triticonazole.

Pour les molécules appliquées sur les deux types de cultures : le difénoconazole a une utilisation équivalente, le tébuconazole est plutôt orienté grandes cultures et le tétraconazole est plus viticole. A noter également que le tébuconazole est plus vendu, que ce soit pour application sur grandes cultures ou viticole, que le tétraconazole.

Sur le site viticole de déploiement des mousses PUF, les molécules suivantes n'ont pas été vendues pendant l'année 2017 : le bitertanol, le fluquinconazole, le flusilazole, l'imazalil et le triadiméfon.

Cette utilisation selon les cultures n'est pas uniforme sur une année (Figure 40). Les fongicides sont appliqués sur les grandes cultures dont le blé durant les périodes d'extension des tiges et d'épiaison qui ont lieu des mois de mars à juin. Ces informations sur la période de pousse de chaque culture sont contrôlées chaque semaine selon la région ou le département par l'institut du végétal ARVALIS. Sur les vignes, les azoles sont généralement appliqués à partir du mois de mai jusqu'au mois de juillet (d'après les calendriers de la chambre d'agriculture) (Mercadante et al., 2019) (Fustinoni et al., 2014). Ces dates sont données à titre indicatif avec des élargissements des périodes de traitement possible en fonction des conditions climatiques de l'année en question.

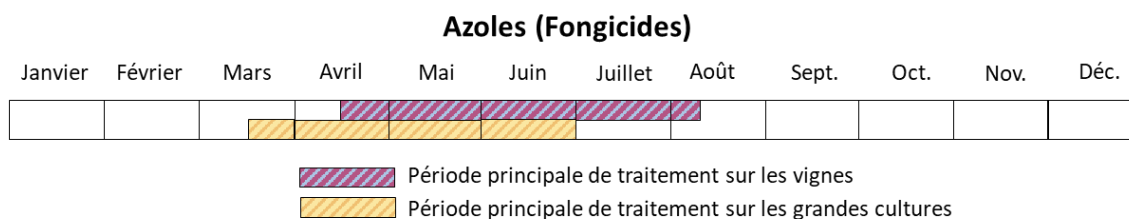


Figure 40 : Périodes principales d'application des azoles sur les vignes et grandes cultures selon le mois de l'année

#### b. Suivi du compartiment aérien en azoles

Les données brutes en azoles obtenues en ng/PUF pour les trois sites échantillonnés sont compilées en Annexe 4 (sous-parties i) sachant que les fluquinconazole et prothioconazole n'ont pu être validés dans cette matrice. Pour ces deux molécules, les rendements d'extraction/quantification en matrice mousse PUF sont inférieurs à 60 % (33 % ± 14 % et 24 % ± 4 % respectivement avec n = 3). De plus, les rapports d'aires TC/TQ pour le prothioconazole ne sont pas inclus dans l'intervalle acceptée.

Le Tableau 39 recense les concentrations estimées en ng/m<sup>3</sup> en azoles pour les trois sites : n°4 forestier, n°6 viticole et n°7 viticole respectivement. Le premier sous-tableau de résultat intègre également les LQ estimée en ng/m<sup>3</sup>.



Tableau 39 : Concentrations estimées en ng/m<sup>3</sup> en azoles accompagnées des LQ estimées pour les mousses PUF appliquées sur les sites n°4 forestier, n°6 viticole et n°7 viticole

	Concentration site n°4 forestier (ng/m <sup>3</sup> )									
	LQ estimée	Septembre (S)	Octobre (O)	Novembre (N)	Décembre/Janvier (D/J)	Janvier/Février (J/F)	Février/Mars (F/M)	Mars/Avril (M/A)	Avril/Mai (A/M)	Juin (J)
Bitertanol	1,9.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Bromuconazole	4,1.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cyproconazole	1,7.10 <sup>-2</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	2,3.10 <sup>-2</sup>	< LQ
Difénoconazole	5,7.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Epoxiconazole	1,5.10 <sup>-2</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	4,0.10 <sup>-2</sup>	< LQ
Fenbuconazole	9,4.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Flusilazole	2,3.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Flutriafol	2,4.10 <sup>-2</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Imazalil	1,6.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Ipconazole	1,0.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Metconazole	2,1.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,3.10 <sup>-2</sup>	< LQ
Myclobutanil	3,0.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Penconazole	2,1.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Prochloraze	1,9.10 <sup>-2</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Propiconazole	7,9.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,4.10 <sup>-2</sup>	< LQ
Tébuconazole	4,4.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,5.10 <sup>-2</sup>	7,6.10 <sup>-2</sup>	2,5.10 <sup>-2</sup>
Tétraconazole	1,5.10 <sup>-2</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,0.10 <sup>-2</sup> *
Triadiméfon	1,6.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Triadiménol	9,0.10 <sup>-4</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Triticonazole	5,0.10 <sup>-4</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

Chapitre 3 : Usages et présence des azoles et néonicotinoïdes dans le compartiment aérien

	Concentration site n°6 viticole (ng/m <sup>3</sup> )								
	Septembre (S)	Octobre (O)	Novembre (N)	Décembre/Janvier (D/J)	Janvier/Février (J/F)	Février/Mars (F/M)	Mars/Avril (M/A)	Avril/Mai (A/M)	Juin (J)
Bitertanol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Bromuconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cyproconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	2,6.10 <sup>-2</sup>	1,9.10 <sup>-2</sup>	< LQ
Difénoconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	2,4.10 <sup>-2</sup> **
Epoxiconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	5,8.10 <sup>-2</sup>	< LQ
Fenbuconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	2,7.10 <sup>-2</sup>	8,7.10 <sup>-1</sup>
Flusilazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Flutriafol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Imazalil	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Ipconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Metconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,7.10 <sup>-2</sup>	< LQ
Myclobutanil	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	4,8.10 <sup>-3</sup>	4,9.10 <sup>-2</sup>
Penconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	3,6.10 <sup>-1</sup>
Prochloraze	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Propiconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,3.10 <sup>-2</sup>	< LQ
Tébuconazole	2,7.10 <sup>-3</sup> *	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	3,3.10 <sup>-1</sup>	6,6.10 <sup>-1</sup>
Tétraconazole	1,1.10 <sup>-2</sup> *	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	2,9.10 <sup>-1</sup>	6,2.10 <sup>-1</sup>
Triadiméfon	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Triadiménol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Triticonazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

Chapitre 3 : Usages et présence des azoles et néonicotinoïdes dans le compartiment aérien

	Concentration site n°7 viticole (ng/m <sup>3</sup> )								
	Septembre (S)	Octobre (O)	Novembre (N)	Décembre/Janvier (D/J)	Janvier/Février (J/F)	Février/Mars (F/M)	Mars/Avril (M/A)	Avril/Mai (A/M)	Juin (J)
Bitertanol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Bromuconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cyproconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Difénoconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Epoxiconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Fenbuconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,1.10 <sup>-1</sup>	8,7.10 <sup>-1</sup>
Flusilazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Flutriafol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Imazalil	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Ipconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Metconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	2,6.10 <sup>-3</sup>	6,1.10 <sup>-3</sup>	< LQ
Myclobutanil	2,6.10 <sup>-3</sup> *	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	2,9.10 <sup>-3</sup>	3,8.10 <sup>-2</sup>
Penconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Prochloraze	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Propiconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Tébuconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	9,3.10 <sup>-3</sup>	1,9.10 <sup>-1</sup>	8,0.10 <sup>-2</sup>
Tétraconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	3,5.10 <sup>-1</sup>	1,5.10 <sup>-1</sup>
Triadiméfon	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Triadiménol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Triticonazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

LQ : Limite de Quantification

\* Concentrations estimées < LQ mais tous les critères vérifiés, \*\* Rendement d'extraction et de quantification = 57 %

La Figure 41 accompagne les tableaux pour illustrer les données azoles sur les trois sites sachant que les molécules qui ne sont jamais quantifiées ne sont pas présentées dans les graphiques. Bien qu'une seule donnée apparaisse par mousses selon son mois d'application, il ne s'agit pas d'un échantillonnage ponctuel mais passif.

Parmi les molécules non quantifiées, on retrouve le bitertanol, le flusilazole, l'imazalil et le triadiméfon. Cela coïncide bien avec les molécules non vendues sur le site d'étude de la thèse. On ne peut conclure pour le fluquinconazole qui n'est pas validé avec ce protocole en matrice mousses PUF.

D'autres molécules vendues et dont le produit phytosanitaire est autorisé pour être appliqué sur les grandes cultures n'ont pas été quantifiées lors de ces échantillonnages tels que le bromuconazole (pourtant fortement vendu avec 1586 kg sur les deux départements), le flutriafol, l'ipconazole, le prochloraze ainsi que le triticonazole. Le tradiménol n'a également pas été quantifié alors qu'il peut être appliqué sur les zones viticoles.

Sur la Figure 41, seules les molécules quantifiées sont présentes à savoir les cyproconazole, difénoconazole, époxiconazole, fenbuconazole, metconazole, myclobutanil, penconazole, propiconazole, tébuconazole et tétraconazole. Chacune de ces molécules est accompagnée de son autorisation d'application afin de relier présence et usage potentiel. Toutes ces molécules quantifiées dans le compartiment air ont une utilisation soit sur grandes cultures soit viticole voire les deux. Il est impossible de conclure pour le prothioconazole qui n'a pas été validé avec ce protocole. Il est à noter que cette molécule a été fortement vendue pour application sur grandes cultures (20746 kg sur les deux départements).

Les plus fortes concentrations sont obtenues sur les deux sites viticoles pour les fenbuconazole, tébuconazole et tétraconazole donnés pour un usage viticole ce qui coïncide bien avec les quantités vendues.

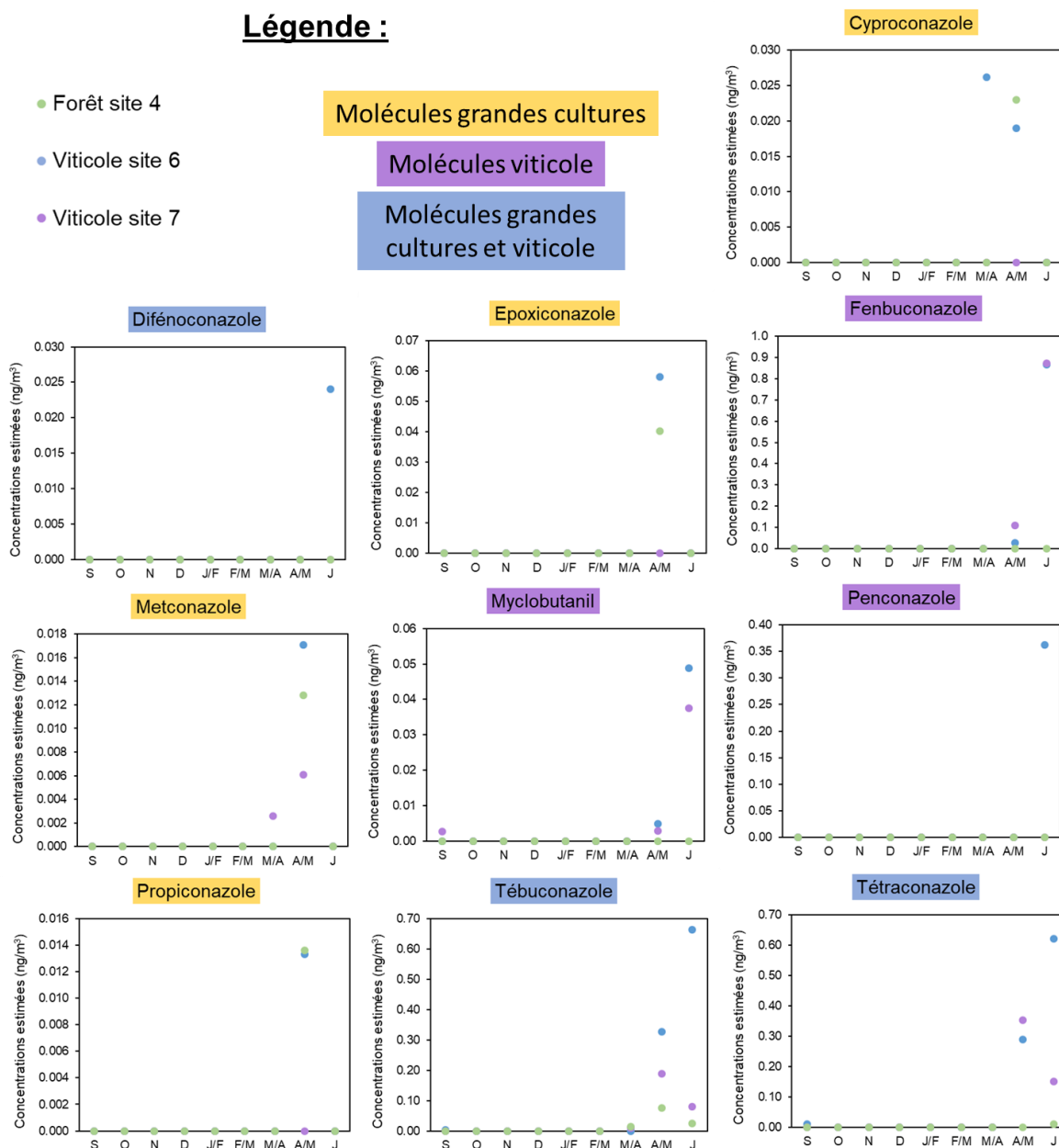


Figure 41 : Evolution des concentrations en azoles estimées en ng/m<sup>3</sup> dans les mousses PUF) selon les dates d'échantillonnages pour les trois sites (site n°4 forestier, site n°6 viticole et site n°7 viticole)

Les concentrations en tébuconazole et tétraconazole sont équivalentes alors que les quantités de tébuconazole vendues pour un usage viticole sont bien plus importantes (5329 kg contre 829 kg sur les deux départements étudiés). Cette différence peut s'expliquer par la volatilité de ces deux molécules sachant que leur temps de demi-vie respectif sont équivalents. En effet, le tébuconazole a été catégorisé comme non volatil (d'après la valeur de sa constante de Henry inférieure à  $2,7 \cdot 10^{-7} \text{ Pa} \cdot \text{m}^3 / \text{mol}$ ) contrairement au tétraconazole. N'étant pas volatil, le tébuconazole sera donc moins facilement retrouvé dans le compartiment aérien. Ces deux données de propriétés physico-chimiques sont mentionnées dans le Tableau 40 pour tous les azoles analysés. Les données ont été extraites du Tableau 14 présenté dans le chapitre 2.

Tableau 40 : Constante de Henry et temps de demi-vie atmosphérique en heures pour les azoles analysés d'après le Tableau 14 du chapitre 2

	Constante de Henry (Pa.m <sup>3</sup> /mol) <sup>4</sup>	DT50 dans l'air (h)
Bitertanol	2,6.10 <sup>-7</sup>	2,5 <sup>1</sup> ; 2,9 <sup>3</sup>
Bromuconazole	1,31.10 <sup>-5</sup>	14,8 <sup>3</sup>
Cyproconazole	5.10 <sup>-5</sup>	160 jours <sup>1</sup> ; 8,7 <sup>3</sup>
Difénoconazole	8,22.10 <sup>-7</sup>	5,95 <sup>3</sup>
Epoxiconazole	1,649.10 <sup>-5</sup>	14,6 <sup>3</sup>
Fenbuconazole	4,3.10 <sup>-4</sup>	13,1 <sup>13</sup>
Fluquinconazole		Non validé
Flusilazole	2,7.10 <sup>-4</sup>	20,8 <sup>13</sup>
Flutriafol	1,27.10 <sup>-6</sup>	13,3 <sup>3</sup>
Imazalil	1,08.10 <sup>-4</sup>	1,8 <sup>2</sup> ; 1,5 <sup>3</sup>
Ipconazole	3.10 <sup>-5</sup>	5,1 <sup>3</sup>
Metconazole	2,21.10 <sup>-7</sup>	8,1 <sup>3</sup>
Myclobutanil	4,33.10 <sup>-4</sup>	7,6 <sup>2</sup> ; 18,2 <sup>3</sup>
Penconazole	6,6.10 <sup>-4</sup>	15,9 <sup>3</sup>
Prochloraze	1,64.10 <sup>-3</sup>	1,6 <sup>3</sup>
Propiconazole	9,2.10 <sup>-5</sup>	5,5 <sup>3</sup>
Prothioconazole		Non validé
Tébuconazole	1.10 <sup>-5</sup>	2,6 jours <sup>1</sup> ; 11,2 <sup>3</sup>
Tétraconazole	3,6.10 <sup>-4</sup>	11,7 <sup>3</sup>
Triadiméfon	9.10 <sup>-5</sup>	7,6 <sup>3</sup>
Triadiménol	3,5.10 <sup>-6</sup>	4,0 <sup>3</sup>
Triticonazole	1,2.10 <sup>-6</sup>	2,0 <sup>3</sup>

DT50 : Temps de demi-vie à 50 %

<sup>1</sup> (Coscollà et al., 2013) déterminé par la méthode Atkinson, <sup>2</sup> Méthode de détermination non spécifiée (Coscollà et al., 2013),

<sup>3</sup> A partir du logiciel AOPWIN développé par W. Meylan et P. Howard à partir du modèle d'Atkinson, <sup>4</sup> Base de données PPDB

Les difénoconazole et myclobutanil ont des concentrations faibles comparés aux quantités vendues pour un usage viticole (720 et 477 kg respectivement). La forte volatilité du myclobutanil ne permet pas d'expliquer ces faibles concentrations. Et à contrario, la concentration en penconazole est élevée alors qu'il n'est que très peu vendu (13 kg). Ce dernier est en revanche très volatil. Le triadiménol, peu vendu dans les départements étudiés (32 kg pour un usage viticole), n'a pas été quantifié dans l'air.

Une saisonnalité des concentrations atmosphériques est fortement observée (Figure 41). En effet, aucun azole n'a été quantifié entre les mois d'octobre et de mars où seulement le myclobutanil et le tétraconazole ont été quantifiés en septembre sur un des deux sites viticoles à de faibles concentrations. Comme mentionné Figure 40, les azoles sont appliqués tout d'abord sur un usage pour grandes cultures durant les mois de mars à juin. Cette saisonnalité est bien observée avec les molécules autorisées à être appliquées uniquement sur les grandes cultures qui ont été quantifiées sur les mois de mars à mai (cyproconazole, époxiconazole, metconazole et propiconazole). La correspondance est vérifiée également pour les molécules autorisées à être appliquées sur les vignes étant normalement employées durant les mois d'avril à août (fenbuconazole, myclobutanil et penconazole). Les molécules autorisées à être appliquées sur les deux types de culture ont été quantifiées depuis les mois de mars (tébuconazole), d'avril (fenbuconazole et tétraconazole) jusqu'au mois de juin (difénoconazole uniquement en juin).

Les plus fortes concentrations sont obtenues durant les mois respectifs d'application des molécules. Aucun échantillonneur passif n'a été appliqué au-delà du mois de juin : donc les différences entre le calendrier de traitement et présence dans l'air des mois de juillet et août ne peuvent être observées sur les sites étudiés.

Cette variation des concentrations dépend de la date précise d'application ainsi que du temps de demi-vie atmosphérique de la molécule (Tableau 40). En effet, les propriétés physico-chimiques des molécules à savoir sa volatilité caractérisée par la constante de Henry et son temps de demi-vie dans l'air peuvent justifier leur présence dans ce compartiment.

Le myclobutanil, dans une étude, a été quantifié dans le compartiment atmosphérique au maximum le lendemain de sa date de traitement (Cruz, 2015). Les temps de demi-vie inférieurs à 21 h pour la plupart des azoles montrent qu'ils ne sont potentiellement pas persistants dans l'air et n'auraient pas le temps d'être transportés sur de longues distances. Néanmoins, ces estimations au travers le modèle d'Atkinson ne prennent en compte uniquement que la réactivité en phase gazeuse se fait avec le radical hydroxyle (Kwok et Atkinson, 1995). Les molécules peuvent également être présentes dans la phase particulaire (Schummer et al., 2010). Dans ce cas, la réactivité est plus faible et les molécules seront susceptibles d'être transportées sur de plus longues distances (Atkinson et al., 1999). Des différences entre l'estimation théorique des temps de demi-vie par ce modèle et ceux déterminés expérimentalement ont été mises en évidence pour plusieurs pesticides tels que la terbuthylazine (Pflieger, 2009), ou encore pour ces trois molécules trifluraline, métolachlore et alachlore (Götz et al., 2008). La répartition entre la phase gazeuse et particulaire a été établie pour certains azoles (Schummer et al., 2010) sous forme de pourcentage dans la phase gazeuse : cyproconazole (59 %), difénoconazole (28 %), flusilazole (52 %), myclobutanil (70 %), penconazole (12 %), prochloraze (44 %), tébuconazole (78 %) et 50 % pour le tétraconazole. Ces résultats de répartition dans la phase particulaire (notamment supérieur à 50 % pour de nombreuses molécules) suggèrent donc que les temps de demi-vie théoriques peuvent potentiellement être sous-estimés pour les azoles qui peuvent alors être transportés sur de plus longues distances.

Cette explication pourrait en partie expliquer pourquoi certaines molécules, normalement non appliquées sur le site où les mousses PUF ont été installées, soient finalement quantifiées dans le compartiment atmosphérique. Prenons pour exemple la molécule propiconazole qui a été quantifiée pendant le mois de mai aussi bien sur le site n°6 viticole que sur le site n°4 forestier. Cette molécule n'est normalement pas appliquée sur les vignes et ne devrait pas se retrouver en zone forestière qui n'emploie pas de pesticides. Les données météorologiques telles que le vent doivent alors être prises en compte du 13/04/2017 au 02/06/2017 pour évaluer son influence sur la présence de la molécule. Le logiciel en ligne NOAA HYSPLIT (<https://www.ready.noaa.gov/hypub-bin/trajtype.pl?runtype=archive>) permet d'obtenir des simulations des directions du vent à une date précise, pendant une période de temps donnée et à une hauteur fixée. Les dates aux extrémités de ces périodes ainsi que la date du 08/05/2017, située entre les dates limites seront sélectionnées avec une hauteur de 1,20 m correspondant à la hauteur d'installation des mousses. La provenance du vent 24 h avant cette date est présentée sur la Figure 42 selon la modélisation des deux sites. Ce temps 24 h a été établi de façon à être supérieur au temps de demi-vie théorique du propiconazole. On peut alors constater que les molécules peuvent être transportées sur ces deux sites forestier ou viticole par des vents à direction du Sud pour la date du 13 avril, du Nord pour la date du 8 mai ou encore de l'Est pour la date du 2 juin. Trois directions différentes sont observées sur cet intervalle de seulement deux mois où des grandes cultures sont présentes selon ces trois axes avec en plus des élevages bovins à l'est et sites viticoles au sud (d'après la Figure 1 mentionnée dans le chapitre 1).

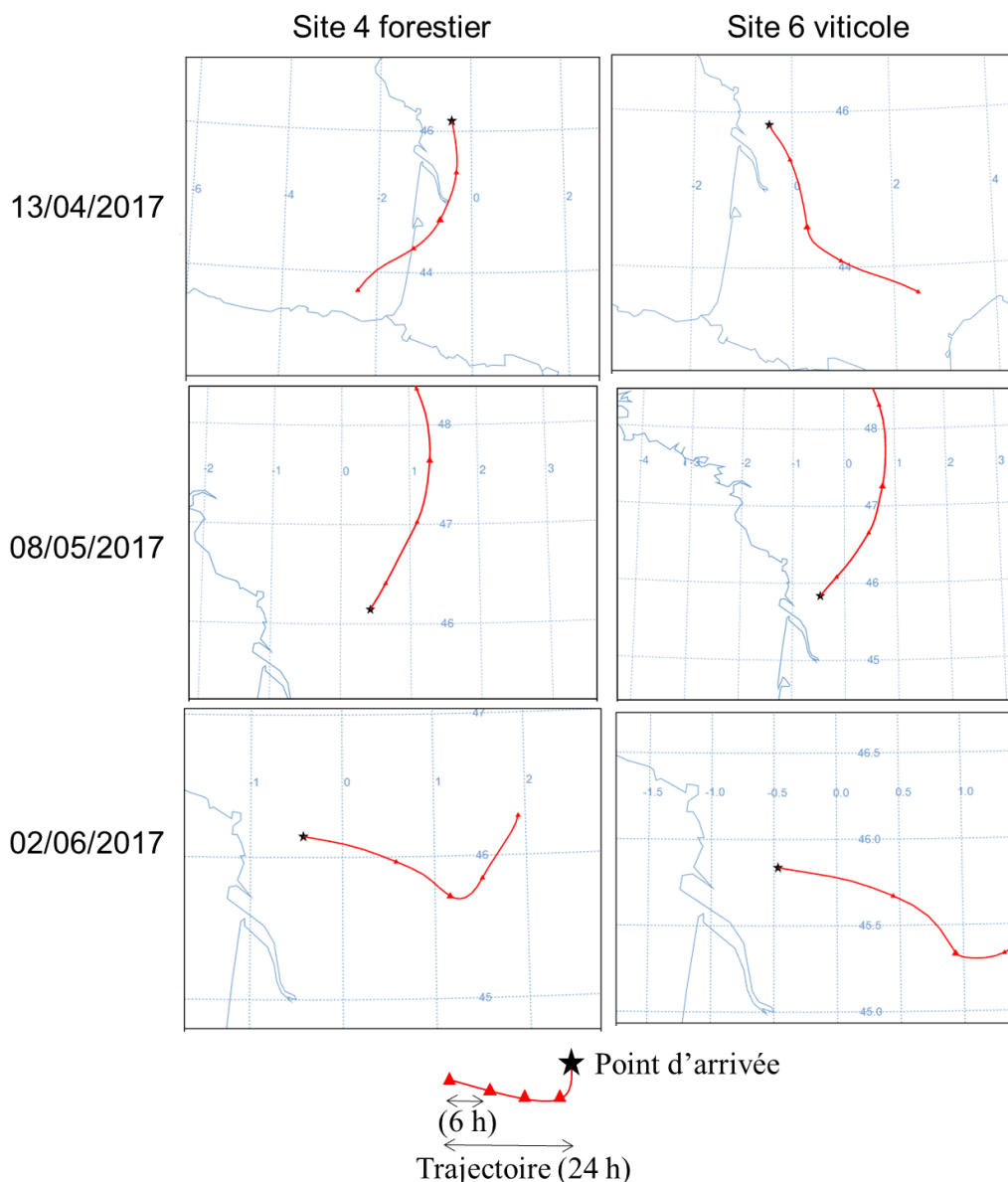


Figure 42 : Modélisation NOAA HYSPLIT sur la provenance des vents 24 heures avant trois dates de l'année 2017 sur les deux sites n°4 et n°6 à 1,20 m de hauteur

Cette explication est valable également pour d'autres molécules, normalement appliquées sur les grandes cultures et pourtant retrouvées dans les mousses PUF des sites n°4 et n°6 : le cyproconazole, l'époxiconazole et le metconazole (Figure 41). En effet, le site n°6 présente un assemblage de grandes cultures aux alentours en plus des vignes alors que le site n°7 à une prédominance viticole plus forte. On peut constater une différence de concentrations atmosphériques entre ces deux sites pour les molécules appliquées et sur les grandes cultures et sur les vignes : le difénoconazole ( $2,4 \cdot 10^{-2} \text{ ng/m}^3$  sur le site n°6 contre non quantifié sur le site n°7), le tébuconazole ( $6,6 \cdot 10^{-1}$  contre  $8,0 \cdot 10^{-2} \text{ ng/m}^3$ ) et le tétraconazole ( $6,2 \cdot 10^{-1}$  contre  $1,5 \cdot 10^{-1} \text{ ng/m}^3$ ). En revanche, il y a peu de différence pour les molécules appliquées uniquement sur les sites viticoles telles que le fenbuconazole ( $8,7 \cdot 10^{-1} \text{ ng/m}^3$  pour les deux sites) et le myclobutanil ( $4,9 \cdot 10^{-2}$  sur le site n°6 et  $3,8 \cdot 10^{-2} \text{ ng/m}^3$  sur le site n°7).



Ces observations montrent que les concentrations retrouvées dans l'air ne témoignent pas nécessairement des usages strictement limités au site où la mousse PUF a été installée. Le périmètre alentour est également à prendre en compte. Les oiseaux capturés dans le site forestier pourront alors être exposés à certains pesticides. Ils seront également exposés à des pesticides à usage viticole mais aussi sur grandes cultures sur le site n°6 viticole. En ce qui concerne le site n°7 viticole, il ne sera pas étudié en relation avec la capture d'oiseau puisqu'il n'y a pas eu d'oiseaux capturés (Figure 30 du chapitre 2).

Les concentrations obtenues peuvent également être comparées avec celles obtenues dans la littérature (Figure 43). Cette figure reprend les valeurs de concentrations maximales décrites dans le Tableau 7 du chapitre 1. Dans le cas de notre étude, nous n'avons pas de fréquence de quantification c'est pourquoi cette information n'est pas mentionnée sur la Figure 43.

Des concentrations très élevées sont référencées dans la publication (Schummer et al., 2010). Les concentrations mentionnées sont celles de la phase gazeuse. Des concentrations plus élevées pour les cyproconazole, flusilazole et prochloraze sont obtenues. Pourtant il s'agit de l'échantillonnage du jardin botanique de Strasbourg (site urbain) néanmoins situé à 5 km de cultures de maïs en 2007. Or en 2007, l'utilisation des pesticides pour l'entretien des espaces verts, des forêts et des lieux de promenade ouvert au public était encore possible dans les villes. C'est seulement depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2017 avec la « loi Labbé » en France que l'usage des pesticides est prescrit pour ces applications dans les villes.

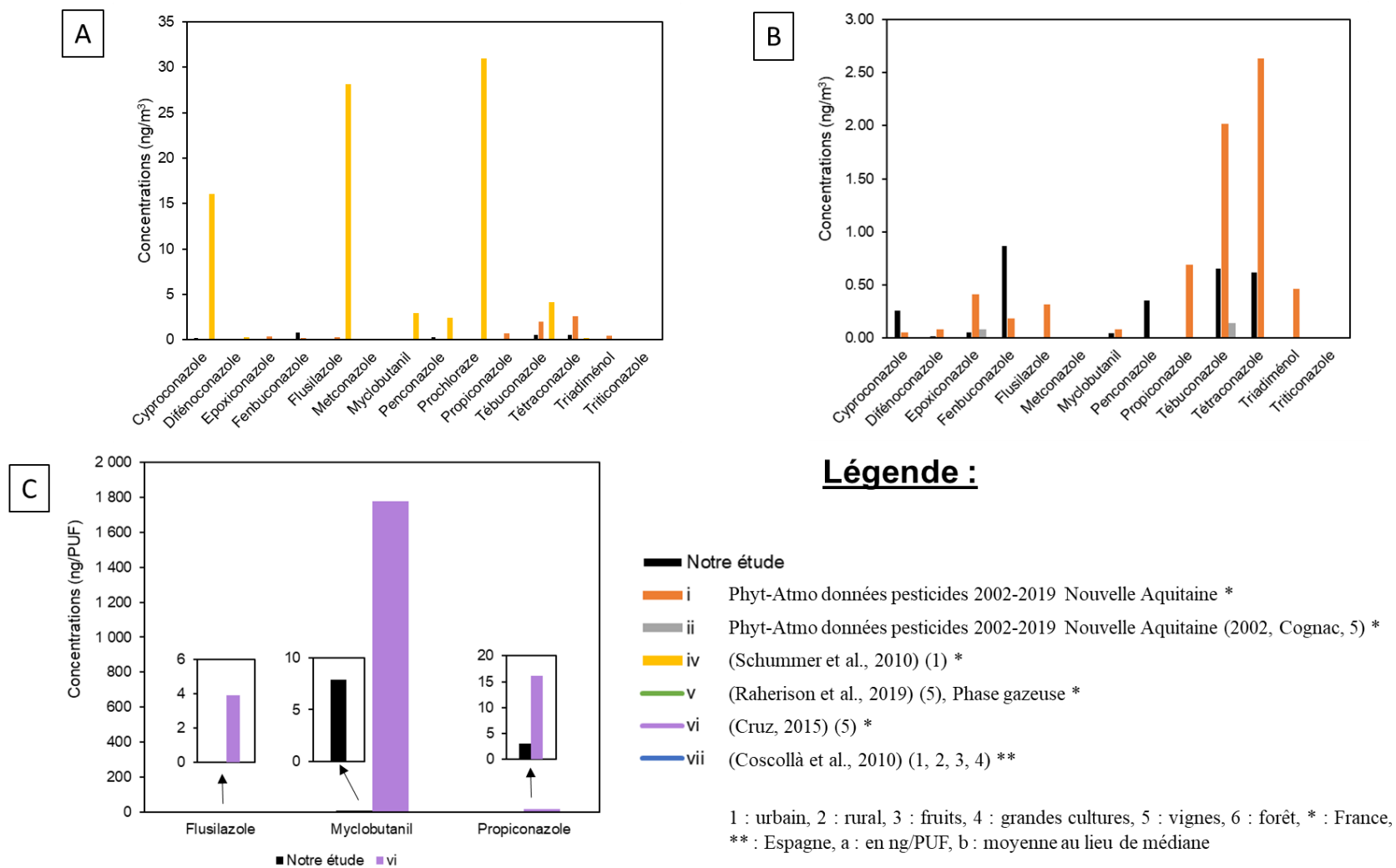


Figure 43 : Comparaison des concentrations obtenues dans notre étude avec la littérature où A : toutes les publications exceptée la vi en ng/m<sup>3</sup>, B : toutes les publications exceptées la iv et la vi en ng/m<sup>3</sup> et C : uniquement la vi avec les concentrations en ng/PUF issues du Tableau 7 mentionnées dans le chapitre 1

Le fenbuconazole est la seule molécule dans le cadre de notre étude qui a une concentration supérieure à celle antérieurement référencée (donnée fournie par Phyt-Atmo Nouvelle-Aquitaine). Le fenbuconazole a été quantifié à une concentration maximale de 0,181 ng/m<sup>3</sup> la semaine 22 (du 30 mai au 1<sup>er</sup> juin) de l'année 2016 sur le site de Saint-Saturnin (16) situé en région Nouvelle-Aquitaine. Cette commune est entourée de zones viticoles. La valeur maximale de notre étude est de 0,87 ng/m<sup>3</sup> obtenue sur le mois de juin de l'année 2017. A l'échelle de la France les quantités vendues en tébuconazole étaient très légèrement supérieures en 2017 qu'en 2016 ce qui peut justifier cet écart (Figure 44). Il est à noter également que Phyt-Atmo utilise un suivi par prélèvement actif sur une semaine à l'aide d'un préleveur bas débit qui permet le prélèvement combiné des phases gazeuses et particulaires, selon les normes : NF-XPX-43058 et NF-XPX-43059. Le faible débit est fixé à 16,5 L/min (Atmo Occitanie, 2020) et est équivalent à 11,5 m<sup>3</sup>/jour. Dans le cadre de nos travaux, les concentrations en ng/m<sup>3</sup> ont été estimées avec un taux d'échantillonnage plus faible de 4,5 m<sup>3</sup>/jour.

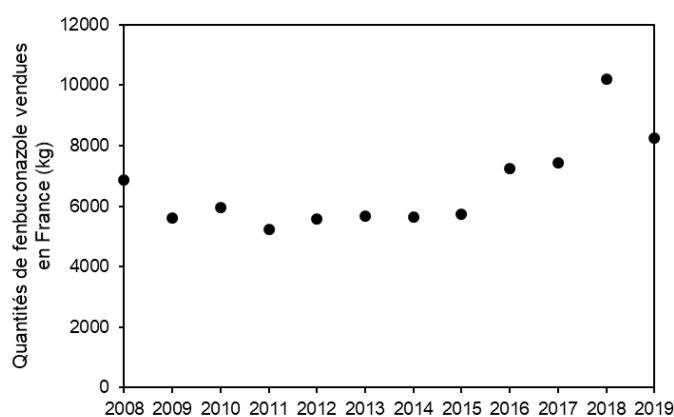


Figure 44 : Quantités de fenbuconazole vendues en France entre 2008 et 2019 (source BNVd)

Ensuite, la référence ii (base de donnée Phyt-Atmo en 2002 sur la commune de Cognac) fournit les données en ng/m<sup>3</sup> avec 0,08 pour l'époxioconazole contre 0,058 dans le cadre de notre étude et 0,14 contre 0,33 ng/m<sup>3</sup> pour le tétraconazole. Les données sont bien du même ordre de grandeur pour ces molécules. Pour finir, les valeurs en ng/PUF peuvent être comparées avec celles de la thèse de Justine Cruz (2015) où les valeurs de notre étude sont toutes inférieures à celles obtenues dans cette référence vi pour le flusilazole, le myclobutanil et le propiconazole. La différence est plus prononcée pour le myclobutanil avec une valeur élevée de 1779,1 ng/PUF contre 7,91 ng/PUF pour notre étude. Ces écarts peuvent provenir des quantités appliquées sur les sites, de la date d'application sur site et de prélèvement ainsi que de la météorologie de l'année étudiée. La principale différence doit essentiellement provenir de la zone d'exposition et du lieu d'application de la mousse PUF par rapport à la zone traitée. Dans le cadre de notre étude, les mousses PUF sont installées au même endroit de capture des oiseaux entre deux parcelles soit à plusieurs mètres des sites viticoles. En revanche, pour les travaux de Justine Cruz (2015), le but était d'observer les teneurs en pesticides d'un Château viticole où les mousses PUF ont été appliquées directement sur le terrain au milieu d'une parcelle traitée.

Finalement, toutes les concentrations estimées maximales dans le cadre de notre étude sont inférieures, bien que dans le même ordre de grandeur sauf pour le fenbuconazole, à celles référencées sur d'autres sites et années.

### 3. Néonicotinoïdes vendus et présents dans le compartiment aérien des sites étudiés

#### a. Utilisation des néonicotinoïdes en région Nouvelle-Aquitaine

Le Tableau 41 recense les quantités vendues pour les néonicotinoïdes analysés sur l'année 2017. Ce tableau est issu du Tableau 16 mentionné dans le chapitre 2.

Tableau 41 : Quantités de substances actives des néonicotinoïdes étudiés vendues dans les deux départements Charente et Charente-Maritime en 2017 par types de culture issues du Tableau 16

	Quantités de substances actives vendues dans les départements Charente et Charente-Maritime (kg)		
	2017	2017 usage grandes cultures	2017 usage vigne
Acétamipride	100	14	0
Clothianidine	0	0	0
Cyclozapride	0	0	0
Dinotéfurane	0	0	0
Flupyradifurone	0	0	0
Imidaclopride	16944	16918	0
Nitenpyrame	0	0	0
Sulfoxaflor	0	0	0
Thiaclopride	5688	5638	0
Thiaméthoxame	1767	41	1723

Produits phytosanitaires autorisés à usage grandes cultures (jaune), viticole (violet), les deux (bleu).

L'acétamipride, l'imidaclopride, le thiaclopride ainsi que le thiaméthoxame ont été vendus dans les départements étudiés pour un usage en grandes cultures. L'imidaclopride a été la molécule la plus vendue pour cet usage, suivie du thiaclopride puis du thiaméthoxame et de l'acétamipride. Le thiaméthoxame est le seul néonicotinoïde à avoir reçu l'autorisation pour être appliqué sur les sites viticoles. Son usage est d'ailleurs plus orienté vers les vignes que les grandes cultures. La clothianidine a été achetée pour un usage en grandes cultures en région Nouvelle-Aquitaine mais pas dans les deux départements étudiés. Aucun produit phytosanitaire composé des molécules suivantes n'a été vendu en région Nouvelle-Aquitaine : le cyclozapride, le dinotéfurane, le flupyradifurone, le nitenpyrame et le sulfoxaflor.

Selon le mois de l'année et de la culture, les néonicotinoïdes ne sont pas appliqués pendant les mêmes périodes (Figure 45). Les insecticides peuvent être appliqués sur les grandes cultures dont le blé à deux périodes de l'année : de septembre à novembre lorsque les premières feuilles apparaissent ainsi que durant les mois de mai/juin correspondant à l'étape d'épiaison. Les néonicotinoïdes ne doivent pas être appliqués durant les périodes de floraison présentant un risque pour les pollinisateurs.

Ces informations sur la période de pousse de chaque culture sont contrôlées chaque semaine par régions et départements par l'institut du végétal ARVALIS. Sur les vignes, les néonicotinoïdes sont généralement appliqués entre les mois de mai et d'août (d'après les calendriers indicatifs des chambres d'agriculture). Les dates de traitement peuvent être élargies en fonction des conditions spécifiques à l'année en cours.

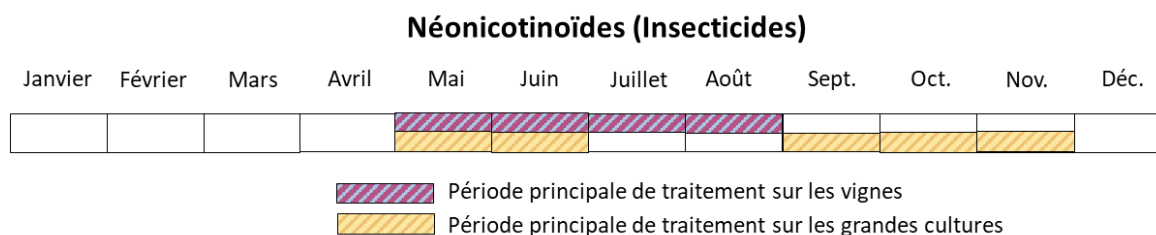


Figure 45 : Périodes principales d'application des néonicotinoïdes sur les vignes et grandes cultures selon le mois de l'année

### b. Suivi du compartiment aérien en néonicotinoïdes

Les données brutes obtenues en ng/PUF pour les trois sites échantillonnés sont compilées en Annexe 4 dans la sous-partie (ii) pour les néonicotinoïdes. Les métabolites des néonicotinoïdes n'ont pas été analysés dans cette matrice mousse PUF.

Le tableau suivant (Tableau 42) recense les concentrations estimées en ng/m<sup>3</sup> en néonicotinoïdes pour les trois sites : site n°4 forestier, site n°6 viticole et site n°7 viticole respectivement sur l'année 2017. L'interdiction des néonicotinoïdes en 2018 est survenue après cette année d'échantillonnage. L'impact de cette interdiction sur les concentrations dans l'air ne sera donc pas étudié dans le cadre de ces travaux de thèse.

Le premier sous-tableau de résultat intègre également les LQ estimée en ng/m<sup>3</sup> pour cette famille de molécules. Les concentrations par période sont montrées sur la Figure 46 qui illustre les différents précédents tableaux.

Les molécules suivantes n'ont pas été quantifiées dans les mousses PUF : la clothianidine, le cycloxapride, le dinotéfurane, le flupyradifurone, le nitenpyrame et le sulfoxaflor. Cette liste correspond bien avec les précédentes non utilisations/utilisations recensées. L'acétamipride, l'imidaclopride, le thiaclopride et le thiaméthoxame ont, eux, été quantifiés.

Le thiaméthoxame est la molécule retrouvée en plus forte concentration sur les deux sites viticoles ( $4,8 \cdot 10^{-2}$  ng/m<sup>3</sup> sur le site n°6 et  $9,0 \cdot 10^{-2}$  ng/m<sup>3</sup> sur le site n°7) en comparaison avec les autres ce qui coïncident avec son utilisation viticole.

Tout comme les azoles, une saisonnalité est visible. Le thiaméthoxame qui est vendu pour application sur les vignes est quantifié dans les deux mousses PUF installées au mois de juin sur les sites n°6 et n°7 viticoles. Cette période correspond avec le calendrier d'application sur les vignes (Figure 45). Le compartiment aérien des mois de juin et juillet n'ayant pas été échantillonné, les résultats ne pourront pas être comparés avec le calendrier d'application sur ces dates. Quant aux molécules appliquées sur grandes cultures, deux périodes sont visibles et correspondent avec leurs mois d'applications à savoir une période des mois de mars à juin (où normalement les néonicotinoïdes sont appliqués à partir du mois de mai) et une autre période comprise entre les mois de septembre novembre.

L'acétamipride, l'imidaclopride et le thiaclopride sont normalement employés uniquement sur les grandes cultures et sont pourtant retrouvés dans l'air du site n°4 forestier et des deux sites viticoles. Pour expliquer leur présence, les hypothèses mises en avant concernant le transport des azoles peut également s'appliquer pour les néonicotinoïdes.

Tableau 42 : Concentrations estimées en néonicotinoïdes accompagnées des LQ estimées pour les mousses PUF appliquées sur les sites n°4 forestier, n°6 viticole et n°7 viticole

	<b>Concentration site n°4 forestier (ng/m<sup>3</sup>)</b>									
	LQ estimée	Septembre (S)	Octobre (O)	Novembre (N)	Décembre/Janvier (D/J)	Janvier/Février (J/F)	Février/Mars (F/M)	Mars/Avril (M/A)	Avril/Mai (A/M)	Juin (J)
Acétamipride	4,0.10 <sup>-4</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	2,0.10 <sup>-4</sup> *	< LQ	< LQ	4,0.10 <sup>-4</sup>
Clothianidine	8,0.10 <sup>-4</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cycloxapride	7,0.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Dinotéfurane	1,8.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Flupyradifurone	6,0.10 <sup>-4</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Imidaclopride	4,2.10 <sup>-3</sup>	< LQ	1,8.10 <sup>-2</sup>	4,2.10 <sup>-3</sup> *	< LQ	< LQ	< LQ	1,8.10 <sup>-2</sup>	< LQ	< LQ
Nitenpyrame	3,8.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Sulfoxaflor	1,0.10 <sup>-4</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Thiaclopride	1,1.10 <sup>-3</sup>	< LQ	3,0.10 <sup>-4</sup> *	1,3.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	1,9.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ
Thiaméthoxame	8,0.10 <sup>-4</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

	<b>Concentration site n°6 viticole (ng/m<sup>3</sup>)</b>									
	Septembre (S)	Octobre (O)	Novembre (N)	Décembre/Janvier (D/J)	Janvier/Février (J/F)	Février/Mars (F/M)	Mars/Avril (M/A)	Avril/Mai (A/M)	Juin (J)	
Acétamipride	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	8,0.10 <sup>-4</sup>	1,4.10 <sup>-3</sup>	1,0.10 <sup>-3</sup>	
Clothianidine	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	
Cycloxapride	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	
Dinotéfurane	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	
Flupyradifurone	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	
Imidaclopride	< LQ	9,3.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	
Nitenpyrame	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	
Sulfoxaflor	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	
Thiaclopride	< LQ	< LQ	6,0.10 <sup>-4</sup> *	< LQ	< LQ	< LQ	2,7.10 <sup>-3</sup>	1,7.10 <sup>-3</sup>	7,0.10 <sup>-4</sup> *	
Thiaméthoxame	< LQ	1,6.10 <sup>-3</sup>	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	4,8.10 <sup>-2</sup>	

	Concentration site n°7 viticole (ng/m <sup>3</sup> )								
	Septembre (S)	Octobre (O)	Novembre (N)	Décembre/Janvier (D/J)	Janvier/Février (J/F)	Février/Mars (F/M)	Mars/Avril (M/A)	Avril/Mai (A/M)	Juin (J)
Acétamipride	2,0.10 <sup>-4</sup> *	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	7,0.10 <sup>-4</sup>	7,0.10 <sup>-4</sup>	<LQ
Clothianidine	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cycloxapride	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Dinotéfurane	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Flupyradifurone	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Imidaclopride	<LQ	1,1.10 <sup>-2</sup>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Nitenpyrame	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Sulfoxaflor	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Thiaclopride	1,0.10 <sup>-4</sup> *	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	5,2.10 <sup>-3</sup>	4,0.10 <sup>-3</sup>	<LQ
Thiaméthoxame	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	9,0.10 <sup>-2</sup>

LQ : Limite de Quantification

\* Concentrations estimées < LQ mais tous les critères vérifiés

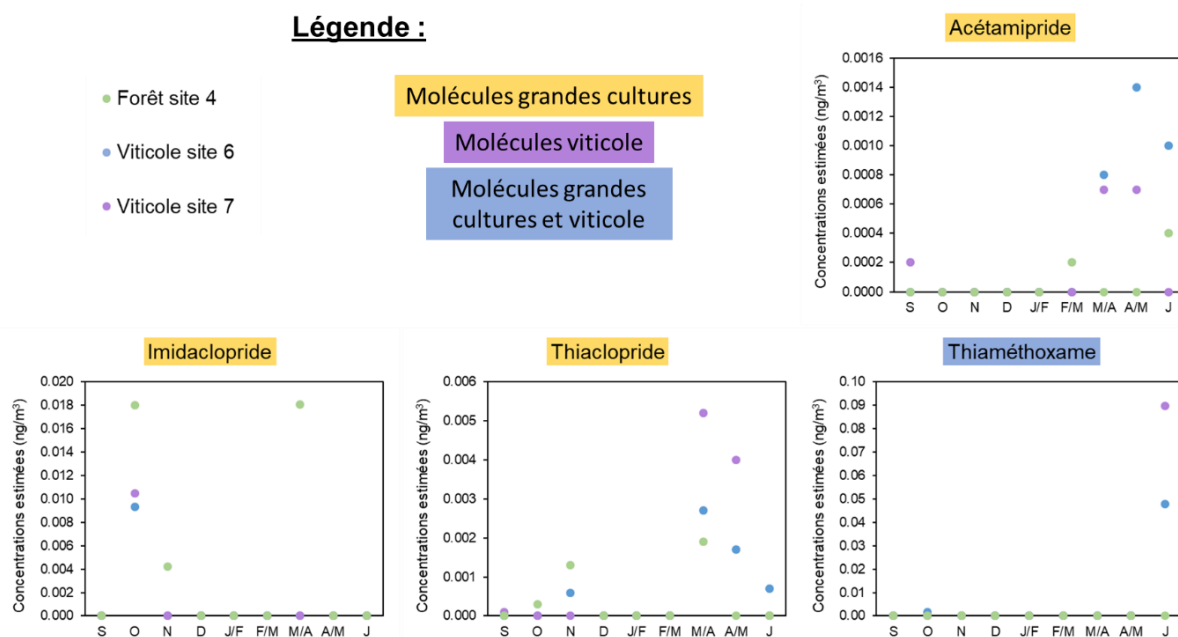


Figure 46 : Evolution des concentrations en néonicotinoïdes estimées en ng/m<sup>3</sup> dans les mousses PUF) selon les dates d'échantillonnages pour les trois sites (site n°4 forestier, site n°6 viticole et site n°7 viticole)

Les concentrations obtenues sont bien plus faibles que celles des azoles alors que le thiaméthoxame, par exemple, est vendu en grande quantité (1723 kg pour application sur les sites viticoles dans les deux départements étudiés). Les concentrations en azoles peuvent monter jusqu'à  $8,7 \cdot 10^{-1}$  pour le fenbuconazole (qui est pourtant vendu en quantité inférieure : 545 kg sur application viticole) contre  $9,0 \cdot 10^{-2}$  ng/m<sup>3</sup> pour le thiaméthoxame qui est le néonicotinoïde retrouvé à de plus fortes concentrations.

Ceci peut éventuellement provenir du faible potentiel de volatilité. En effet, leur constante de Henry est faible pour chacune des molécules de cette famille. Ils seront donc sous forme gazeuse que très peu de temps après leur application (Bonmatin et al., 2015). Le néonicotinoïde le plus volatil est le sulfoxaflor mais il n'est pas vendu dans les sites étudiés.

Les temps de demi-vie qui ont été calculés à partir du modèle d'Atkinson sont tous inférieurs à 3,5 heures. Les données de constantes de Henry et de DT50 sont mentionnées dans le Tableau 43 à partir des propriétés physico-chimiques préalablement décrites dans le Tableau 17 du chapitre 2. Bien que les temps de demi-vie théoriques soient faibles, une différence peut exister avec les données environnementales en fonction de leur répartition dans la phase particulaire.



Tableau 43 : Constante de Henry et temps de demi-vie atmosphérique pour les néonicotinoïdes analysés d'après le Tableau 17 du chapitre 2

	Constante de Henry (Pa.m <sup>3</sup> /mol) <sup>3</sup>	DT50 dans l'air (h)
Acétamipride	5,3.10 <sup>-8</sup>	3,36 <sup>1</sup> ; 1,7 <sup>2</sup>
Clothianidine	2,9.10 <sup>-11</sup>	0,9 <sup>2</sup>
Cyclozapride	-	-
Dinotéfurane	8,7.10 <sup>-9</sup>	1,5 <sup>2</sup>
Flupyradifurone	8,2.10 <sup>-8</sup>	-
Imidaclopride	1,7.10 <sup>-10</sup>	0,85 <sup>1 2</sup>
Nitenpyrame	3,54.10 <sup>-13</sup>	0,8 <sup>2</sup>
Sulfoxaflor	5,77.10 <sup>-7</sup>	-
Thiaclopride	4,8.10 <sup>-10</sup>	1,4 <sup>2</sup>
Thiaméthoxame	4,7.10 <sup>-10</sup>	0,5 <sup>2</sup>

DT50 : Temps de demi-vie à 50 %

- : information non disponible, <sup>1</sup> (Coscollà et al., 2013) déterminé par la méthode Atkinson, <sup>2</sup> A partir du logiciel AOPWIN développé par W. Meylan et P. Howard à partir du modèle d'Atkinson, <sup>3</sup> Base de données PPDB

Leur faible persistance dans l'air ainsi que leur volatilité faible ne priorisent pas leur analyse dans le compartiment atmosphérique ce qui explique que l'on trouve peu d'information dans la littérature sur cette famille. Toutes les concentrations maximales estimées avec notre étude sont supérieures à celles obtenues par Phyto-Atmo qui a trouvé des concentrations inférieures aux LD ou LQ pour l'acétamipride, la clothianidine et le thiaméthoxame. Une valeur maximale pour l'imidaclopride a néanmoins été quantifiée avec une valeur supérieure à celles de notre étude. En effet, en 2014 semaine 30 (du 21 au 27 juillet) à Saint Yrieix la Perche (87500, France) l'imidaclopride a été quantifié à une valeur de 2,298 ng/m<sup>3</sup> qui est bien supérieure à 1,8.10<sup>-2</sup> trouvée lors de notre étude. Cette ville est entourée de grandes cultures, d'où une proximité plus importante que pour nos sites par rapport à cet usage ; et les quantités achetées en 2014 sont équivalentes à celles de 2017 (Tableau 16 du chapitre 2).

#### 4. Bilan sur les usages reliés à la présence des azoles et néonicotinoïdes dans le compartiment atmosphérique

Les données de substances actives vendues en région Nouvelle-Aquitaine permettent de retracer l'utilisation des azoles et néonicotinoïdes selon le type de culture : grandes cultures ou viticole. Le Tableau 45 synthétise les usages autorisés, la vente de la molécule dans les départements étudiés et sa présence dans le compartiment atmosphérique pour les deux familles de molécules.

Finalement, 7 azoles et 1 néonicotinoïde sont vendus avec une autorisation d'application sur site viticole. Toutes ces molécules ont été quantifiées dans le milieu atmosphérique d'un ou des deux sites viticoles exceptés un azole peu acheté (triadiménol).

Quant à l'autorisation d'application sur les grandes cultures, elle concerne plus de molécules dont 12 azoles et 4 néonicotinoïdes. Dans le compartiment aérien des sites viticoles voire forestier, 7 des azoles sur les 12 ont été quantifiés et les 4 néonicotinoïdes quantifiés.

6 azoles normalement vendus pour application sur grandes cultures n'ont pas été quantifiés sur les sites d'étude. Quant aux néonicotinoïdes, toutes les molécules vendues ont été quantifiées dans le compartiment atmosphérique.

Les concentrations maximales obtenues ont été comparées avec celles recensées dans la littérature. Dans l'ensemble, les concentrations obtenues dans notre étude sont du même ordre de grandeur voire plus faibles que celles obtenues sur d'autres parcelles viticoles françaises.

Tableau 44 : Bilan de la coïncidence entre vente des azoles et néonicotinoïdes avec présence dans le compartiment atmosphérique

	Vendu pour usage Grandes cultures ou viticole	Molécule présente sur au moins un site	Bilan si ça coïncide
A			
	Bitertanol	×	×
	Bromuconazole	✓	×
	Cyproconazole	✓	✓
	Difénoconazole	✓	✓
	Époxiconazole	✓	✓
	Fenbuconazole	✓	✓
	Fluquinconazole	×	✓
	Flusilazole	×	×
	Flutriafol	✓	×
	Imazalil	×	×
	Ipconazole	✓	×
	Metconazole	✓	✓
	Myclobutanil	✓	✓
	Penconazole	✓	×
	Prochloraz	✓	×
	Propiconazole	✓	×
	Prothioconazole	✓	×
	Tébuconazole	✓	✓
	Tétraconazole	✓	✓
	Triadiméfon	×	✓
	Triadiméfol	✓	×
	Triticonazole	✓	×
	Acétamipride	✓	✓
	Clothianidine	×	×
	Cyclozapride	×	×
	Dinotéfurane	×	✓
N	Flupyradifurone	×	×
	Imidaclopride	✓	✓
	Nitenpyrame	×	×
	Sulfoxaflor	×	×
	Thiaclopride	✓	✓
	Thiaméthoxame	✓	✓

A : Azoles, N : Néonicotinoïdes,

Produits phytosanitaires autorisés à usage grandes cultures (jaune), viticole (violet), les deux (bleu).

Il a été constaté que les données des concentrations dans les mousses PUF ne retracent pas uniquement l'application sur le site étudié. En effet, certaines molécules ont été quantifiées dans le compartiment atmosphérique alors qu'elles sont normalement non appliquées sur le site n°4 forestier (cyproconazole, époxiconazole, metconazole, propiconazole, tébuconazole, tétraconazole pour les azoles et acétamipride, imidaclopride, thiaclopride et thiaméthoxame pour les néonicotinoïdes). Non appliquées également sur le site n°6 viticole, certaines molécules ont été quantifiées alors qu'elles sont destinées à être appliquées uniquement sur les grandes cultures (cyproconazole, époxiconazole, metconazole, propiconazole pour les azoles et acétamipride, imidaclopride, thiaclopride pour les néonicotinoïdes).

Les molécules peuvent être transportées sur de longues distances et donc traverser diverses parcelles. Ces transports sont à nuancer pour les néonicotinoïdes qui sont peu volatils avec des temps de demi-vie très faibles. En revanche, en fonction de la proportion de la molécule dans la phase gazeuse ou particulaire, ces calculs théoriques de temps de demi-vie pourraient être sous-estimés.

Au vu de leur faible persistance, la saisonnalité des concentrations obtenues est à mettre en lien également avec la saisonnalité des traitements en azoles et néonicotinoïdes. Toutes les périodes d'application coïncident avec la présence des deux familles de molécules dans le compartiment air.

Ces concentrations pourront être recoupées avec celles obtenues dans les matrices biologiques des oiseaux capturés sur ces mêmes sites. Cela concerne les merles noirs et les mésanges charbonnières sur les sites n°4 forestier et n°6 viticole. Les concentrations plasmatiques de ces espèces seront étudiées au sein du chapitre 4 et les concentrations des plumes uniquement pour l'espèce merles noirs seront mises en parallèle avec ces concentrations mousses PUF au sein du chapitre 5.

Les oiseaux peuvent, en effet, être au contact d'autres molécules que celles appliquées dans les parcelles visées ou les parcelles voisines. Il est à noter que les voies de contamination ne sont pas uniquement réduites à la voie respiratoire. En effet, d'autres voies ont été décrites précédemment dans le chapitre 1 bibliographie telles que la voie cutanée, ou encore via l'alimentation. La contamination atmosphérique apparaît comme une variable d'explication de la contamination des oiseaux et permet de renseigner une partie de l'ambiance chimique. Elle met en évidence également la contamination longue distance au regard de la contamination en lien avec les produits appliqués sur la parcelle suivie. Néanmoins il est à garder en tête que cette donnée reste insuffisante pour complètement renseigner l'exposome des oiseaux. C'est une donnée importante mais incomplète.



## Chapitre 4 : Développements analytiques et applications en matrice plasma

1.	Développements en injection directe et SPE en ligne.....	182
a.	Azoles.....	182
i.	Développements (synthèse des résultats de la publication n°1 page 218) .....	182
ii.	Effet matrice plasma.....	183
b.	Néonicotinoïdes et leurs métabolites.....	185
i.	Injection directe pour les néonicotinoïdes.....	185
ii.	Injection directe pour les métabolites des néonicotinoïdes .....	186
iii.	SPE en ligne en eau MQ.....	188
iv.	SPE en ligne matrice plasma .....	191
c.	Avantages et inconvénients de la SPE en ligne.....	196
2.	Applications environnementales .....	197
a.	Azoles.....	197
i.	Merles noirs (synthèse des résultats de la publication n°2 page 243).....	197
ii.	Mésanges charbonnières.....	199
iii.	Cigognes blanches .....	202
iv.	Autres espèces .....	204
b.	Néonicotinoïdes.....	204
i.	Vertébrés (synthèse des résultats de la publication n°3 page 273).....	204
i.	Merles noirs .....	207
ii.	Goélands .....	208
iii.	Autres espèces .....	210
c.	Corrélation entre azoles et néonicotinoïdes.....	210
d.	Néonicotinoïdes métabolites .....	213
3.	Expériences d'exposition en laboratoire .....	214
a.	Tébuconazole, azole .....	214
b.	Imidaclopride, néonicotinoïde.....	215
i.	Analyse de l'imidaclopride.....	215
i.	Analyse des métabolites .....	216
4.	Bilan des concentrations plasmatiques.....	216

Publication n°1 : Development of a method to analyse selected azoles fungicides in the plasma of free-living birds using LC-MS/MS combined with on-line SPE..... 218

Publication n°2 : High contamination of a sentinel vertebrate species by azoles in vineyards: a study of Common blackbirds in multiple habitats in Western France ..... 243

Publication n°3 : Plasmatic levels of neonicotinoids as indicators of global exposure of contrasted wild birds species ..... 273

## 1. Développements en injection directe et SPE en ligne

### a. Azoles

#### i. *Développements (synthèse des résultats de la publication n°1 page 218)*

La publication n°1 intègre les développements en injection directe (ID) et en Extraction sur Phase Solide (SPE) en ligne afin d'analyser les azoles en matrice plasma.

Comme mentionné dans la partie bibliographie, la présence des azoles (en tant que produits phytosanitaires et non de médicament) n'est que très peu documentée dans les tissus biologiques à provenance environnementale. Quelques études les ont analysés dans les matrices humaines telles que l'urine ou les cheveux. Le potentiel de contamination des azoles chez les oiseaux sauvages n'a pas été observé. Il a alors fallu, dans un premier temps, développer une méthode analytique. Celle-ci s'est appuyée sur des précédents travaux permettant l'analyse des PFAS dans le plasma à l'aide d'une SPE en ligne installée en amont de la LC-MS/MS (Munoz et al., 2017).

Les transitions des nouvelles molécules à développer ont été recherchées en faisant varier les énergies CE et CAV. Différentes colonnes chromatographiques ont ensuite été comparées en termes de résolution, de forme et de hauteur des pics où ces derniers influent sur la sensibilité d'une molécule. C'est finalement la colonne chromatographique Poroshell phénylhexyl qui a été sélectionnée. Elle a d'ailleurs déjà été utilisée pour l'analyse des pesticides incluant des azoles (Gaweł et al., 2019). D'autres paramètres chromatographiques ont été testés tels que la phase mobile et son débit. Des sensibilités comprises entre 0,03 et 6,6 pg injectés sont obtenues en ID pour le flutriafol et le prothioconazole respectivement.

Ensuite, la SPE en ligne a été connectée en amont et différents paramètres ont été testés. C'est ainsi que trois cartouches ont été comparées où de meilleures sensibilités ont été obtenues avec la pré-colonne C18 appliquée en tant que cartouche. Avec 600 µL d'eau MQ injectée, les sensibilités avec ce module sont comprises entre 0,03 et 30 pg injectés pour les deux mêmes molécules qu'en ID.

Une fois les sensibilités et les linéarités des appareils évaluées, les développements se sont focalisés sur la préparation de l'échantillon plasma. Du solvant doit être ajouté au plasma de façon à provoquer la précipitation des protéines. Dans notre cas, c'est l'acétonitrile qui a été sélectionné (Munoz et al., 2017) (Yao et al., 2001) (Xu et al., 2005). Néanmoins, ce pourcentage de solvant doit être le plus faible possible puisqu'il entraîne une diminution des aires des pics chromatographiques. En effet, les molécules sont moins retenues sur la phase stationnaire lors du chargement sur la cartouche. Le pourcentage dans l'extrait injecté est finalement fixé à 12,5 % de façon à maintenir un rapport de solvant/plasma de 6. Une autre étape peut être ajoutée à la suite de cette précipitation des protéines : la filtration. Cette étape n'a finalement pas été maintenue puisqu'elle retient certains azoles et engendre des interférences. En matrice plasma, des LQ comprises entre 10 et 1500 pg/g plasma sont obtenues pour le flusilazole et le triadiménol respectivement sachant que le prothioconazole a été validé avec une LQ de 5000 pg/g plasma. Il s'agissait déjà en ID de la molécule la moins sensible. Ces LQ ont été comparées avec celles mentionnées dans la littérature pour ces mêmes molécules mais dans d'autres matrices. De meilleures performances ont été obtenues en matrice eau avec un volume bien supérieur de 2000 µL (Montiel-León et al., 2018) voire de 5000 µL (Cotton et al., 2016).

Il a été prouvé que la matrice plasma est une matrice complexe qui peut générer des interférences notamment pour le triadiménol. Les effets matriciels ont d'ailleurs été comparés pour diverses espèces : merles noirs, bovin, chat, poulet, crapaud épineux, cochon, rat. Les biais de concentrations sont variables selon les espèces ce qui renforce l'intérêt de valider les LQ au sein même de la matrice plasma de l'espèce étudiée.

Les droites de linéarité par étalonnage interne ont des coefficients de corrélation tous supérieurs à 0,99 exceptés pour le flusilazole et le prothioconazole. Les contrôles qualités en matrice plasma montrent une bonne répétabilité sur une même journée ainsi qu'entre plusieurs journées tant à la LQ qu'à forte concentration (en plasma de référence et en échantillon). La conservation des extraits a été vérifiée jusqu'à 6 mois au congélateur avec ajout de l'eau MQ juste avant l'injection.

Tout ce protocole finalement optimisé, calibré et validé a été appliqué à de réels échantillons de merles noirs capturés dans l'environnement. L'application s'est avérée être un succès puisque les différents types d'habitat des merles noirs à savoir le site forestier n°4 (n = 11), le site urbain n°5 (n = 11) ou le site viticole n°6 (n = 11) sont ressortis. Certains azoles (difénoconazole, fenbuconazole, tébuconazole et tétraconazole) ont été plus fréquemment quantifiés et avec des concentrations supérieures dans les échantillons provenant du site viticole où ces pesticides sont appliqués. Ce protocole analytique peut alors être appliqué à un plus grand nombre d'échantillons qui seront exposés dans ce chapitre.

Pour les plus petites espèces telles que les mésanges charbonnières, la prise d'essai de 25 µL est encore trop élevée au vu de la faible quantité disponible. L'objectif est donc de l'abaisser à 10 µL. Pour ce faire, un protocole a été testé avec des proportions en solvant différentes du protocole 25 µL. Les LQ précédemment établies en matrice plasma ont été vérifiées avec ce nouveau protocole comme décrit dans le chapitre précédent matériel et méthode.

## ii. Effet matrice plasma

L'effet matriciel a été qualifié pour certaines espèces dans la publication n°1. Après avoir analysés tous les échantillons, de nouvelles espèces peuvent être ajoutées pour quantifier cet effet matrice. Les limites de quantifications extrapolées des étalons internes, tous ajoutés à une concentration environ égale à 1000 pg/g plasma, ont été comparées (Figure 47).

Ce diagramme prouve une hétérogénéité des comportements entre espèces bien que la matrice soit similaire. La différence se situe essentiellement avec les plasmas de goélands qui présentent des sensibilités et variabilités bien supérieures pour les trois EI. Le plasma de cigognes blanches est, à contrario, la matrice qui génère les meilleures sensibilités. Pour expliquer la différence de sensibilité deux facteurs peuvent influencer : la hauteur du pic chromatographique (S) ou le bruit de la ligne de base (N). Dans le cas du fenbuconazole d5, on obtient entre les trois espèces merles noirs, cigognes blanches et goélands bruns sur le LC-MS/MS 6495B :

$$S_{\text{Merles noirs}} = 45930 \pm 13707$$

$$N_{\text{Merles noirs}} = 50 \pm 20$$

$$S_{\text{Cigognes blanches}} = 73510 \pm 8667$$

$$N_{\text{Cigognes blanches}} = 54 \pm 77$$

$$S_{\text{Goélands bruns}} = 29382 \pm 5871$$

$$N_{\text{Goélands bruns}} = 216 \pm 289$$



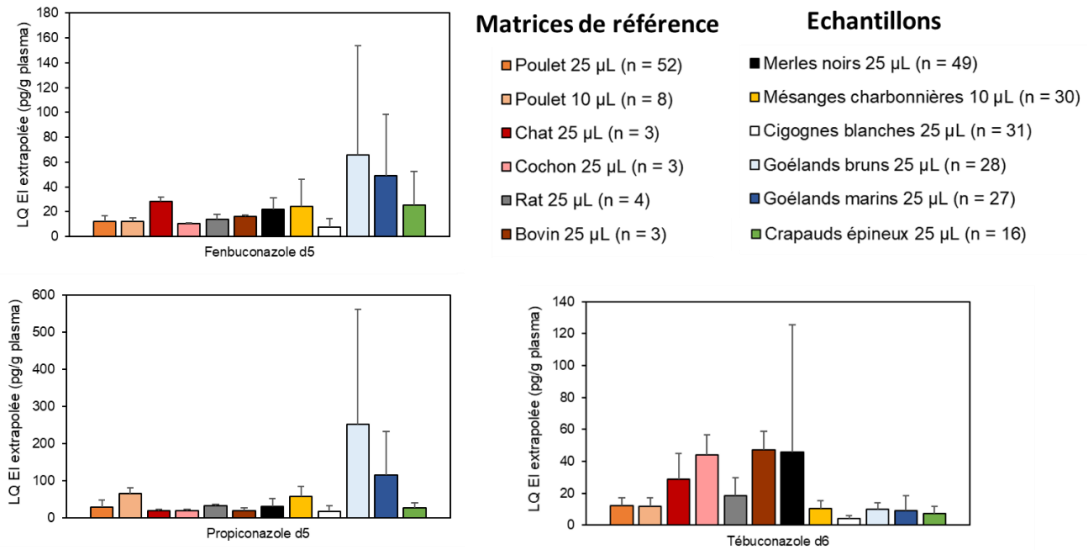


Figure 47 : Diagrammes des LQ extrapolées des EI azoles dans le plasma de différentes espèces

Avec ces valeurs, on constate que la différence des LQ entre les espèces merles noirs et les goélands s'explique donc non seulement par une diminution de signal d'un facteur 1,5 (extinction matriciel) mais également par une augmentation du bruit d'un facteur 4 où la variable bruit en explique la majorité. Les deux facteurs cumulés expliquent un rapport de 5,5 entre les deux LQ extrapolées. Cet écart n'est pas équivalent à celui dans la Figure 47 puisque ces précédentes données de signaux et bruits ne sont pas corrigés par la concentration réellement injectée en matrice plasma et les données du 6490 ne sont pas intégrées.

Au sein de la matrice plasma de cigognes blanches, la molécule triadiméfon n'a pu être validée à cause d'une interférence spécifique à cette matrice présente sur la transition de confirmation (Figure 48).

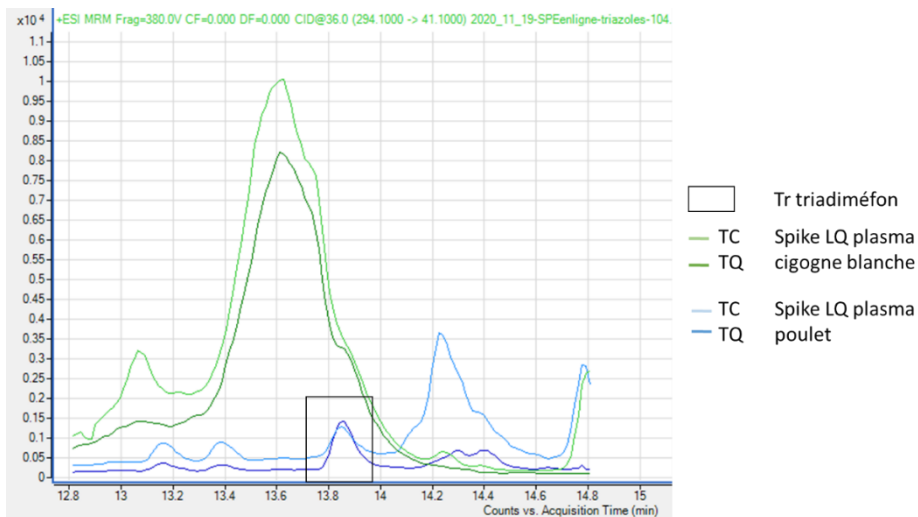


Figure 48 : TQ et TC du triadiméfon sur un plasma dopé à la LQ poulet et de cigogne blanche

Toutes ces informations suggèrent, que pour le dosage des azoles, le plasma est une matrice complexe et dépendant de l'espèce étudiée.

## b. Néonicotinoïdes et leurs métabolites

### i. Injection directe pour les néonicotinoïdes

Une fois les deux transitions sélectionnées pour chaque molécule ainsi que leurs énergies de collision et d'accélération optimales, d'autres paramètres peuvent être testés.

#### Optimisation des conditions de source :

En injection directe, les conditions de source ont tout d'abord été optimisées. Pour une température de gaz fixée à 200 °C, la tension au niveau de l'aiguille de la technologie Jet Stream d'Agilent a été testée entre les valeurs 0 et 2000 V avec des pas de 250 V. La Figure 49 illustre la réponse des aires de la transition de quantification dans le cas du dinotéfurane sachant que l'allure est identique pour tous les natifs. Les aires sont maximales pour une tension nulle ce qui signifie que les molécules se fragmentent facilement toute seule.

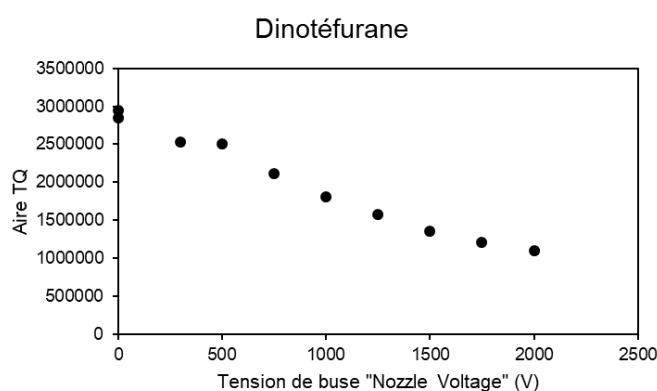


Figure 49 : Influence de la tension de buse sur les aires de la transition de quantification du dinotéfurane

Pour une tension de buse « nozzle voltage » fixée à 0 V ; ce sont les couples de hautes et faibles pressions au niveau de l'ion funnel qui sont testés. Différents couples tels que : 110/60, 200/110, 200/60, 70/60, 100/60 et enfin 150/60 ont été comparés. C'est le dernier couple 150/60 qui a permis d'obtenir de meilleures sensibilités.

Ensuite, la température du sheat gaz a été variée entre 300 et 400 °C par pas de 350 °C. La température étant généralement comprise entre 200 et 400 °C pour les pesticides, c'est la valeur médiane qui a été retenue (300 °C).

D'autres couples de température et débit de gaz à savoir 200 °C pour 11 L/min, 250/20 et 120/14 ont été testés. Le premier couple 200/11 est celui permettant d'obtenir de meilleurs résultats en termes de sensibilité.

Finalement, les conditions de la méthode optimisée néonicotinoïdes sont compilées (Tableau 45) et comparées avec celle de la méthode azoles préalablement optimisée (Figure 50). Les LQ sont comparables exceptées celles de l'acétamipride d3 ainsi que celles du thiaclopride qui sont plus faibles et donc plus sensibles avec la méthode optimisée azoles. Les conditions de source finalement retenues pour l'analyse des néonicotinoïdes sont celles de la méthode azoles. Ceci permet de les uniformiser et prouve également l'interconnexion entre les paramètres.

Tableau 45 : Paramètres de sources pour la méthode optimisée des néonicotinoïdes et des azoles

Paramètres de source	Méthode optimisée néonicotinoïdes	Méthode optimisée azoles
Tension de buse « nozzle voltage » (V)	0	300
Ion funnel (V)	150/60	110/60
T° sheat gaz (°C)	350	350
Gaz T° (°C)	200	200
T et débit de gaz (°C et L/min)	200/11	200/11

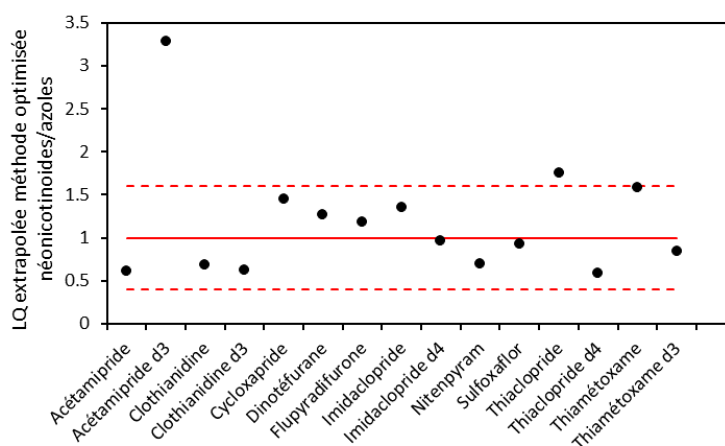


Figure 50 : LQ extrapolées obtenues avec les conditions de source optimisées pour les néonicotinoïdes divisée par celles obtenues avec la méthode optimisée des azoles (n = 2)

### ii. Injection directe pour les métabolites des néonicotinoïdes

Tous les métabolites des néonicotinoïdes commandés dans le cadre de la thèse ont tout d'abord été développés en mode électrospray positif (ESI+). L'ion moléculaire a bien été identifié ainsi que les transitions sélectionnées pour la clothianidine urée, l'imidaclopride guanidine, l'imidaclopride oléfine, l'imidaclopride urée, le nicotinique acide, thiaclopride amide, le thiaclopride amide et le 6-chloro nicotinique acide. L'acétamipride N desmethyl, lui, avait déjà été développé au sein du laboratoire dans le cadre d'un autre projet en amont. En revanche, le pic moléculaire avait une faible intensité pour le nicotinique acide et le 6-chloronicotinique acide qui se fragmentent dès le début dans la source avec une tension de buse qui a été fixée à 300 V. D'après les publications certaines transitions ont été retenues en ESI+ ce qui prouve qu'il est possible de les analyser avec cette polarité ((Li et Pike, 2013; Nozal et al., 2001) pour le nicotinique acide et (Berset et al., 2017; Hao et al., 2018) pour le 6-chloronicotinique acide).

Ces deux composés ont quand même été testés en ESI- pour tenter de visualiser leur pic moléculaire. Cette recherche a également été réalisée pour les métabolites où aucun pic moléculaire n'a été visualisé en ESI+ soit le 6-hydroxy nicotinique acide, le chloro-2-1,3-thiazole-5 carboxylique acide et le furoïque-3 acide. Ils peuvent potentiellement être analysés en GC après une étape de dérivation. La technologie GC ne faisant pas partie du cadre de la thèse, cette dernière voie ne sera pas exploitée. Les pics moléculaires ont bien été identifiés pour chacune de ces molécules testées. En revanche, seulement deux transitions (au lieu de

quatre) ont été trouvées pour chaque molécule. Le logiciel Optimizer n'en a sélectionné qu'une seule pour le 6-hydroxy nicotinique acide.

Ensuite, ces composés ont été injectés en condition de couplage LC-MS/MS avec la même colonne Poroshell phényl-hexyl. Le 6-hydroxy nicotinique acide ainsi que le furoïque-3 acide ont des temps de rétention inférieur à 1 minute correspondant au temps mort. Ce qui signifie que ces composés ne sont pas retenus et n'interagissent pas avec la phase stationnaire de la colonne chromatographique. Finalement, le développement en ESI- peut continuer pour le nicotinique acide, le 6-chloronicotinique acide ainsi que le chloro-2-1,3-thiazole-5 carboxylique acide. Ces composés ont été injectés avec les mêmes phases aqueuse et organique acidifiées à l'acide formique. Aucune de ces molécules n'est détectée avec cette phase. L'analyse de ces trois métabolites en ESI- ne peut donc pas être regroupée avec les autres molécules analysées en ESI+.

Une gamme pour évaluer les sensibilités machine en pg injectés ont été réalisées et ont été comparées à celles obtenues en ESI+ (Tableau 46).

Tableau 46 : Comparaison des sensibilités en pg injectés en ID pour les métabolites néonicotinoïdes entre ESI+ et ESI-

Molécule	Bilan ESI+			Bilan ESI-		
	LQ (pg inj)	Gamme linéarité (pg inj)	R <sup>2</sup>	LQ (pg inj)	Gamme linéarité (pg inj)	R <sup>2</sup>
2 Chloro 1,3 thiazole 5 carboxylique acide	-	-	-	2	2-800	0,9574
6 Chloronicotinique acide	1,5	1,5-15	0,9937	1	1-800	0,9592
6 Hydroxynicotinique acide	-	-	-	-	-	-
Furoïque-3 acide	-	-	-	-	-	-
Nicotinique acide	0,26	0,26-15	0,9976	0,4	40-800	0,9416

ESI : Electrospray Ionization, ID : Injection Directe, LQ : Limite de Quantification, R<sup>2</sup> : coefficient de corrélation pour une droite de type  $y = a x$

Les sensibilités sont équivalentes mais la linéarité est meilleure en ESI+ pour les deux molécules comparables. Les deux molécules 6-chloronicotinique acide et nicotinique acide sont donc laissées dans la méthode ID néonicotinoïdes métabolites ESI+. Les autres métabolites non ne seront pas analysés bien qu'un développement analytique plus poussé pourrait être entrepris en tant que molécules polaires.

Ensuite, sur les métabolites répondant en ID ESI+, des tests de condition de source ont été réalisés pour voir leur impact sur la sensibilité. Les résultats obtenus sont semblables à ceux des néonicotinoïdes natifs à savoir une tension optimale de 0 V bien que les conditions finales obtenues sont les mêmes que celles appliquées pour les azoles. Pas de différence signification n'a été observée entre les conditions optimales et les conditions de sources azoles.

En mode MRM, la rétention et sensibilité de deux colonnes ont été comparés : la Poroshell phényl-hexyl ainsi que la Poroshell C18. Globalement, les signaux sont plus faibles bien que les aires sont semblables. Cette diminution en signal provient d'un élargissement des pics chromatographiques avec une légère traînée à l'arrière des pics. La même colonne chromatographique sera donc sélectionnée aussi bien pour l'analyse des azoles que des néonicotinoïdes et leurs métabolites.

iii. SPE en ligne en eau MQ

Cette partie sur la SPE en ligne réunit aussi bien les résultats obtenus pour les molécules mères que leurs métabolites. La cartouche SPE en ligne sélectionnée, après des tests de comparaison, pour l'analyse des azoles est la pré-colonne C18 dotée d'une phase stationnaire apolaire. Le but étant d'avoir une méthode automatisée, rapide en temps de préparation, le même extrait que celui préparé pour l'analyse des azoles est également injecté pour l'analyse des néonicotinoïdes. La cartouche de SPE en ligne doit alors idéalement être identique.

Le temps de chargement a été optimisé. Pour l'analyse des azoles il est fixé à 2 minutes. Des temps de chargement variant de 0,7 à 3 minutes ont été testés. La valeur minimale de 0,7 min a été fixée légèrement au-delà des 0,6 minute nécessaire pour charger 600 µL à une vitesse de 1000 µL/min. Les résultats en aire relative sont illustrés Figure 51. Plusieurs molécules fuient sur la cartouche ce qui signifie qu'elles ne sont pas suffisamment retenues sur la phase stationnaire. C'est le cas pour le dinotéfurane, qui pour un temps de chargement supérieur à 1,5 minute passe complètement au travers la cartouche ainsi que les métabolites 6-chloro-nicotinique acide, clothianidine urée, imidaclopride guanidine et imidaclopride oléfine.

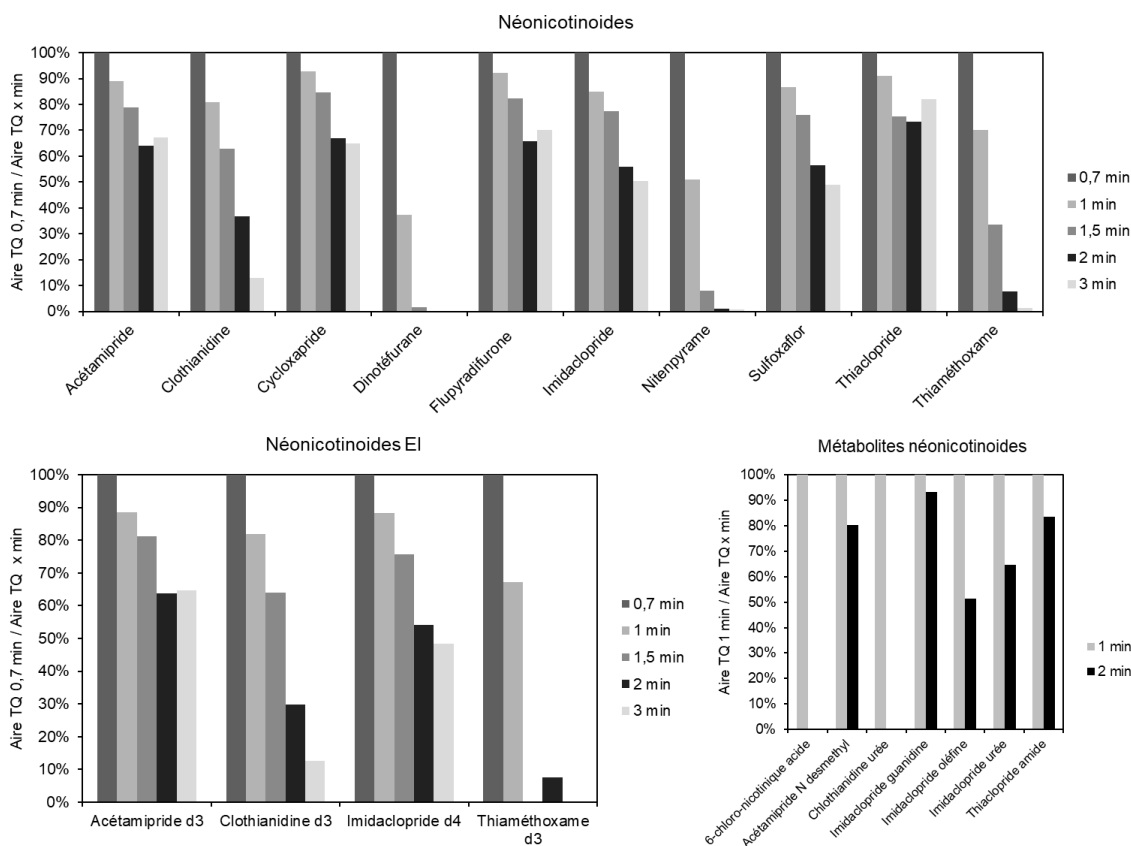


Figure 51 : Rapport des aires pour différents temps de chargement sur la cartouche pré-colonne C18 en SPE en ligne pour les néonicotinoïdes, leurs métabolites et leurs EI (injection d'une solution aqueuse à environ 0,03 ng/g)

Idéalement, le temps le plus faible de 0,7 minute auraient pu être sélectionné mais au vu de l'allure des pics chromatographiques c'est le temps de chargement de 1 minute a été fixé avec la cartouche pré-colonne C18. En effet, le dinotéfurane présente un double pics (Figure 52) qui laisse sous-entendre un étalement de la molécule sur la phase stationnaire de la cartouche de SPE en ligne et donc un temps de chargement trop court.

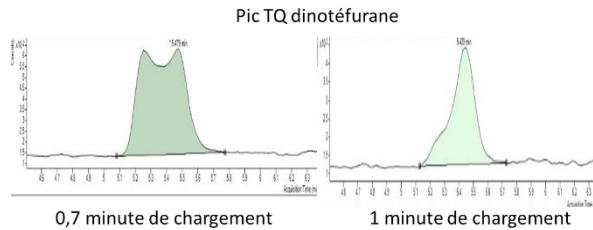
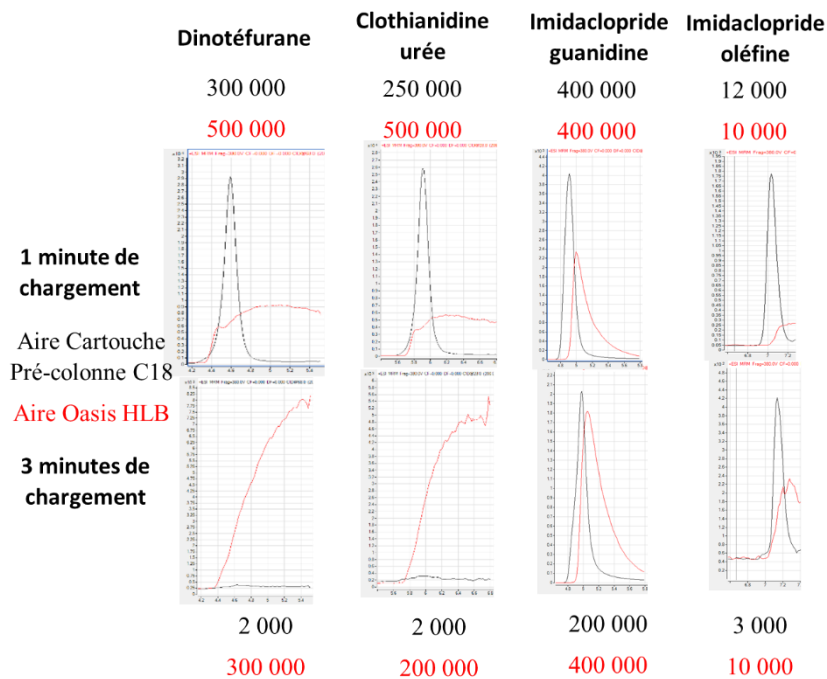


Figure 52 : Allure du pic chromatographique de la transition de quantification (TQ) du dinotéfurane pour deux temps de chargement sur la cartouche pré-colonne C18 en SPE en ligne

Au vu de cette faible rétention pour de nombreuses molécules, il a paru utile de tester une cartouche munie d'une phase plus polaire : Oasis HLB. Les cartouches pré-colonne C18 ainsi que Oasis HLB ont donc été comparées comme cela avait été réalisé pour l'analyse des azoles. Deux temps de chargement ont été testés en triplicat avec une concentration de 0,1 ng/g en eau MQ. Le Tableau 47 résume l'allure des pics ainsi que les aires mesurées pour le pic de la TQ pour quatre molécules.

Tableau 47 : Comparaisons de deux cartouches SPE en ligne pour deux temps de chargement pour 1 néonicotinoïde et 3 métabolites



En termes d'allure de pic, ils sont plus fins avec la cartouche pré-colonne C18. Quelle que soit la cartouche, une fuite peut être constatée avec une diminution des aires entre 1 minute et 3 minutes de chargement. En revanche, les aires sont plus élevées avec la cartouche Oasis HLB ce qui est cohérent puisqu'elle permet une meilleure rétention des molécules polaires. Néanmoins, sa granulométrie étant plus élevée (taille des particules de 25-35  $\mu\text{m}$ ) que celle de la pré-colonne C18 (2,7  $\mu\text{m}$ ), cette cartouche ne permet pas une bonne efficacité où un élargissement des pics chromatographiques est visible.

Afin de tenter d'affiner ces pics avec la cartouche Oasis HLB et un temps de chargement fixé à 1 minute, le pH lors du chargement peut être modulé. Aucune amélioration n'a été obtenue avec deux conditions de pH différentes : voie eau de la pompe de la SPE en ligne acidifiée à 1 % en acide formique avec ou sans acidification de l'échantillon à 1 % en acide formique également. Aucune autre cartouche de SPE en ligne n'a ensuite été testée et le choix s'est maintenu aux paramètres suivants : 1 minute de chargement avec la cartouche pré-colonne C18.

A noter que le métabolite 6-chloronicotinique acide, bien que validé en ID, n'est pas compatible avec aucune des cartouches ni temps de chargement testés. La sensibilité de cette molécule est bien trop faible étant polaire et fuit très rapidement. Cette molécule ne sera donc pas développée par la suite.

En revanche aucune des publications présentes dans la littérature n'analyse en matrice plasma les néonicotinoïdes avec la technique de SPE en ligne. Une publication référence leur analyse avec cette technique munie d'une cartouche HyperSep Retain PEP (20 x 2,1 mm, 40-60  $\mu\text{m}$ ) dans la matrice eau de rivière (Montiel-León et al., 2018). Le volume de prise d'essai de cette matrice est de 2000  $\mu\text{L}$ . Les LQ avec le protocole de notre étude ont été obtenues dans cette même matrice. Des eaux de rivières préalablement analysées pour vérifier la non quantification des néonicotinoïdes ont été ensuite dopées à différentes concentrations pour réaliser une gamme d'étalonnage. Le Tableau 48 compare les LQ en pg injectés de cette publication avec les LQ du protocole sélectionné. La sensibilité obtenue avec nos conditions est bien meilleure pour toutes les molécules exceptées pour le dinotéfurane.

Tableau 48 : Comparaison des LQ en pg injectés en eau de rivière

	(Montiel-León et al., 2018) Volume injection = 2000 $\mu\text{L}$ LQ (pg inj)	Notre étude Volume injection = 600 $\mu\text{L}$ LQ (pg inj)
N	Acétamipride	0,2
	Clothianidine	1,0
	Cycloxapride	
	Dinotéfurane	2,0
	Flupyradifurone	
	Imidaclopride	1,0
	Nitenpyrame	2,0
	Sulfoxaflor	
	Thiaclopride	0,2
	Thiamétoxame	0,2
M	Acétamipride N desmethyl	0,04
	Clothianidine urée	0,39
	Imidaclopride guanidine	0,045
	Imidaclopride urée	Non validé, interférence à droite du pic chromatographique TQ en matrice eau de rivière
	Imidaclopride oléfine	> 4,2
	Thiaclopride amide	0,03

LQ : Limite de Quantification, M : Métabolites des néonicotinoïdes, N : Néonicotinoïdes, TQ : Transition de Quantification

S'est ensuite posée la question si les néonicotinoïdes et leurs métabolites pouvaient être regroupés dans une seule et même méthode d'injection pour un gain de temps. Ce rassemblement de molécules et donc de transitions diminuent les sensibilités extrapolées (Figure 53). Cette différence peut s'expliquer par une diminution des temps d'acquisition pour chaque transition en ayant plus à acquérir. Une plus faible intensité sera donc accumulée au niveau du détecteur. Les deux familles de molécules seront finalement séparées bien que le temps d'analyse sera donc doublé.

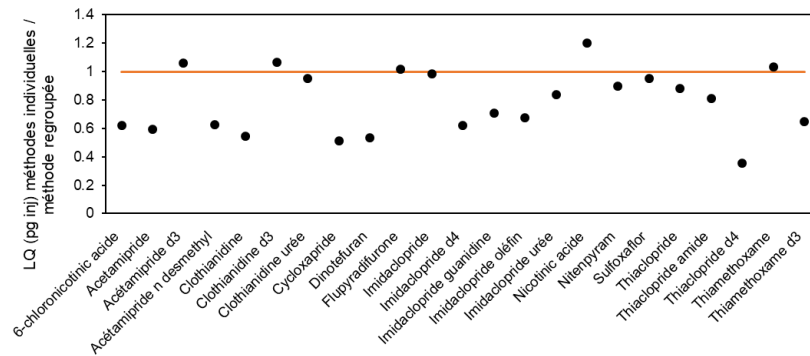


Figure 53 : LQ extrapolée en pg injectés (n = 3) pour l'injection d'une solution à 20 pg inj avec 12,5 % d'acétonitrile pour les méthodes néonicotinoïdes et leurs métabolites individuelles ainsi que regroupée

#### iv. SPE en ligne matrice plasma

Pour la validation des néonicotinoïdes en matrice plasma, aucun problème n'est parvenu. La validation a été réalisée également pour le protocole 10  $\mu$ L pour les néonicotinoïdes même si aucun échantillon n'a été analysé pour ces molécules avec ce protocole. Les sensibilités pour les deux protocoles sont comparées avec un plasma de poulet dopé à la LQ (Figure 54). Une amélioration est même observée pour le protocole 10  $\mu$ L notamment pour l'imidaclopride. Les moyennes (n = 3) des rendements d'extraction/quantification varient entre 75 % et 119 % pour le protocole à 10  $\mu$ L de prise d'essai avec le plasma de poulet dopé à la LQ.

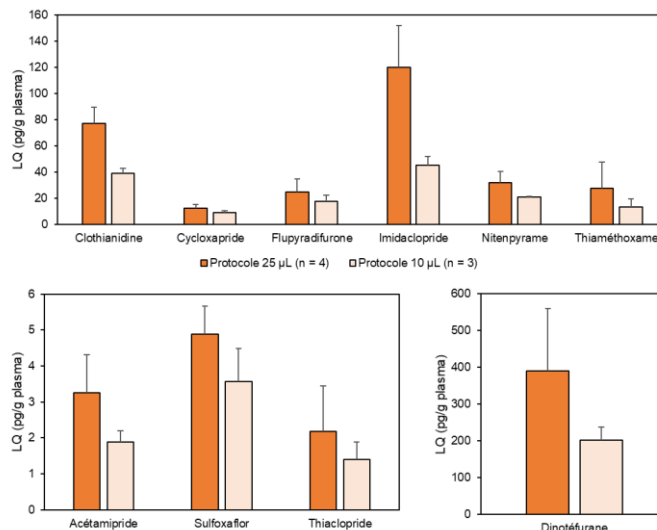


Figure 54 : LQ extrapolée sur des plasma de poulet dopés à la LQ pour les deux protocoles 25 et 10  $\mu$ L de prise d'essai pour les néonicotinoïdes



Pour revenir aux 6 métabolites restants après l'étape de validation en SPE en ligne, certains n'ont pu être approuvés en matrice plasma. Il s'agit de l'imidaclopride guanidine et oléfine.

La gamme validée en matrice plasma pour le premier métabolite est comprise entre 20000 et 100000 pg/g plasma. Cette concentration très élevée génère des contaminations résiduelles sur les injections suivantes non négligeables. Cette molécule a été donc supprimée par la suite de la méthode d'acquisition puisque le temps d'analyse aurait été allongé avec de multiples blancs d'injection. Ne connaissant pas l'intérêt des métabolites dans un premier temps, le temps d'analyse ne doit pas être long.

Le deuxième métabolite de l'imidaclopride : l'imidaclopride oléfine est très peu sensible en matrice plasma. La concentration la plus élevée testée est de 90000 pg/g plasma où un S/N de 100 est obtenu. De plus, le rendement de d'extraction/quantification à cette concentration est seulement de 20 %. Il s'agit d'une extinction de signal dû à la matrice. Aucun test n'a été réalisé à plus forte concentration et cette molécule ne sera pas acquise par la suite.

Comme vu pour les azoles, l'effet matrice plasma peut varier en fonction des espèces bien que la matrice soit identique. La Figure 55 permet d'illustrer les différences pour les EI des néonicotinoïdes ajoutés à une concentration environ égale à 1000 pg/g plasma. Comme les EI des métabolites sont identiques à ceux des néonicotinoïdes, la conclusion est également valable pour cette famille de molécules. En revanche, les LQ extrapolées ne sont pas équivalentes puisque les temps d'acquisition pour cette méthode d'acquisition sont différents.

Le plasma de référence poulet induit des sensibilités supérieures aux autres espèces pour les EI clothianidine d3, imidaclopride d4, thiaclopride d4 et thiaméthoxame d3. Les meilleures sensibilités sont obtenues en matrice plasma de cigognes blanches. C'était d'ailleurs également le cas pour les EI azolés. Les goélands bruns et argentés ont les plus hautes LQ pour l'acétamipride d3 avec également une variabilité élevée. La différence de sensibilité au sein de cette famille de goélands est observée notamment pour le goéland marin qui présente de meilleures sensibilités pour tous les EI comparées à celles obtenues pour les deux autres espèces de goélands.

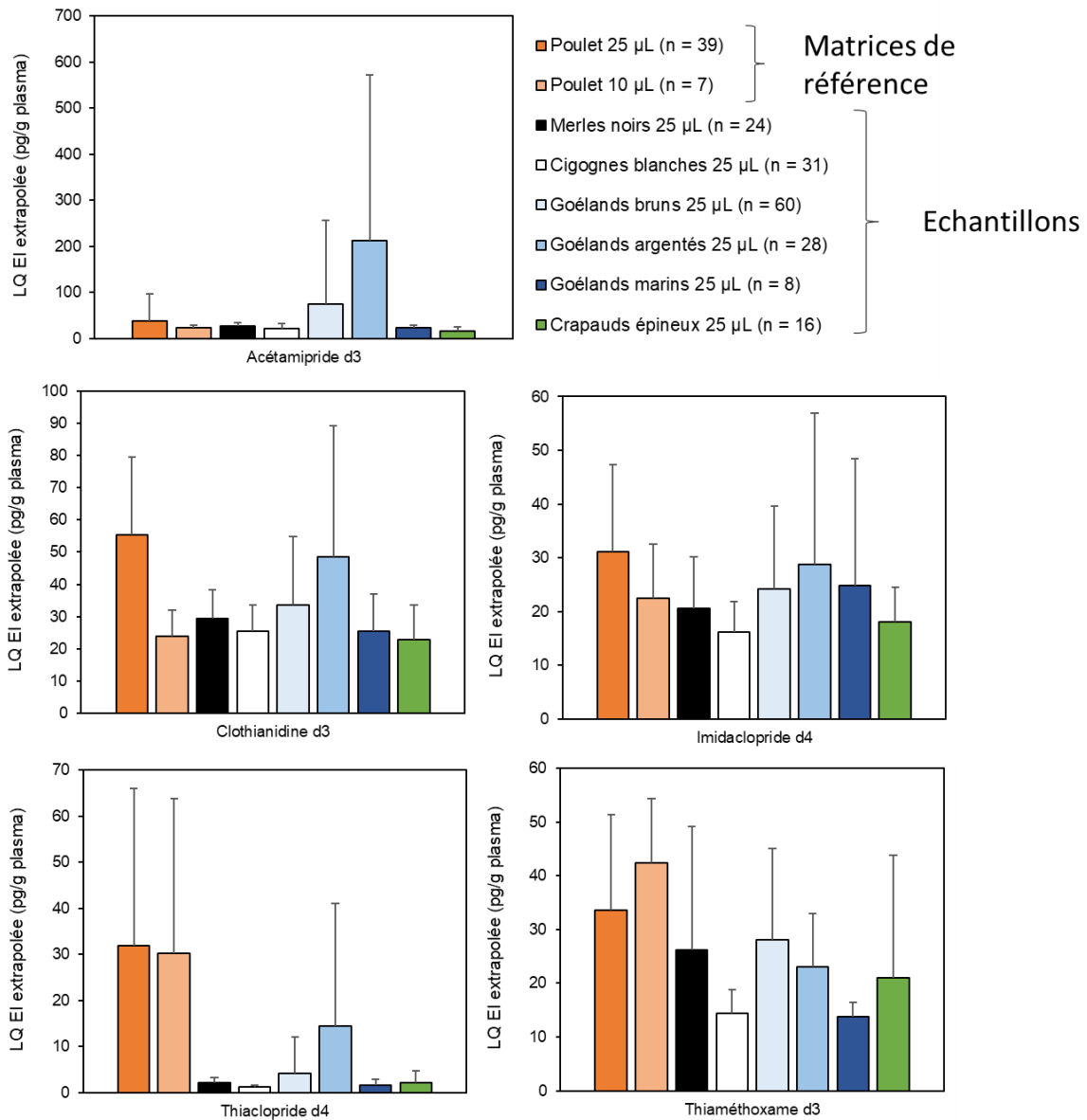


Figure 55 : Diagrammes des LQ extrapolées des EI néonicotinoïdes dans le plasma de différentes espèces

Les LQ en matrice plasma obtenues dans le cadre de notre étude sont comparées avec celles obtenues dans la littérature (Tableau 49).

Les plus anciens travaux mentionnent des prises d'essai très élevées de plus de 500 µL qui sont non compatibles avec l'analyse de plasma chez des petites espèces. Les plus récentes publications ont réussies à abaisser cette prise d'essai avec des volumes en dizaine de µL. Parmi ces travaux, les LQ obtenues pour notre étude génère des LQ plus élevées que les autres.

Tableau 49 : Comparaison des LQ obtenues en matrice plasma pour les néonicotinoïdes avec la littérature

	Notre étude	(Humann-Guillemot et al., 2021)	(Lennon et al., 2020b)	(Hao et al., 2018)	(Eng et al., 2021, 2017)	(Taliensky-Chamudis et al., 2017)	(Byholm et al., 2018; David et al., 2015)	(Stivaktakis et al., 2016)	(Luzardo et al., 2015)	(Kapoor et al., 2014)
Volume d'échantillon (µL)	25	10	20-50	50	25	500	-	500	2000	1000
Unité	pg/g	pg/g	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/mL	pg/g
Acétamipride	10	10		3,6 *	30 *	2000	0,6-7,5 *			
Clothianidine	150	50	210	7,4 *	49 *	10000				
Cycloxapride	50									
Dinotéfurane	600			9,1 *	40 *	10000				
Flupyradifurone	25									
Imidaclopride	200	50		4,6 *	51 *	2000	39	6000	10000	-
Nitenpyrame	100			8,8 *	44 *					
Sulfoxaflor	10									
Thiaclopride	4	10		2,3 *		2000	1,3-6,3			
Thiaméthoxame	50	30		4,5 *	61 *	10000				

- : information non disponible, \* LD au lieu de LQ

LD : Limite de Détection, LQ : Limite de quantification

Le Tableau 50, réalisé à partir du Tableau 11 présent dans le chapitre 1 bibliographie, intègre également les conditions analytiques qui ont permis d'obtenir ces LQ.

Ce dernier tableau nuance ces données de LQ. En effet, notre étude est la seule à employer la technique SPE en ligne pour analyser le plasma. Cette technique entraîne des temps de préparations inférieurs qui sont avantageux pour analyser un grand nombre d'échantillons. Des compromis sont à réaliser entre performances finales obtenues et le temps total de réalisation.

Tableau 50 : Conditions analytiques des publications analysant les néonicotinoïdes en matrice plasma issues du Tableau 11

Matrice	Volume (µL)	Composés	Extraction (Solvant)	Purification (adsorbant)	Dilution du plasma	Volume injecté (µL)	Concentration de dopage (pg/g ou *pg/mL)	Rendements (%)	LQ (pg/g ou *pg/mL)	Références
Plasma poulet	25	Acétamipride, clothianidine, cycloxapride, dinotéfurane, flupyradifurone, imidaclopride, nitenpyrame, sulfoxaflor, thiaclopride, thiaméthoxame	ELL (ACN/Eau MQ)	SPE en ligne (C18)	48	600	LQ, 1000	98-126, 95-115	4-600	Notre étude
Plasma de martinet à ventre blanc	10	Acétamipride, clothianidine, imidaclopride, thiaclopride, thiaméthoxame	ELL (ACN/Eau)	SPE (Oasis HLB)	10	5	-	-	10-50	(Humann-Guillemint et al., 2021)
Plasma oiseaux	20-50	Clothianidine	ELL (MeOH acidifié/eau)	x	10	-	-	88,3	210 *	(Lennon et al., 2020b)
Plasma de poulet et de bovin	50	Acétamipride, clothianidine, dinotéfurane, imidaclopride, nitenpyrame, thiaclopride, thiaméthoxame + 1 métabolite + 1 autre	ELL (MeOH acidifié)	x	10	90	8-16 *	96,9-101,2	LD : 2,3-9,1 *	(Hao et al., 2018)
Plasma de carouge à épaulettes	25	Acétamipride, clothianidine, dinotéfurane, imidaclopride, nitenpyrame, thiaméthoxame + 6 métabolites + 1 autre	ELL (MeOH acidifié)	x	20	90	400 *	89,3-111,2	LD : 49-61 *	(Eng et al., 2021, 2017)
Sang de bondrée apivore	-	Acétamipride, imidaclopride, thiaclopride	QuEChERS (ACN/ eau, sels : sulfate de magnésium/acétate de sodium, SupelTM QuE PSA/C18/GCB)	-	-	20	-	-	LD : 0,6-39 *	(Byholm et al., 2018; David et al., 2015)
Sang de poulet	500	Acétamipride, clothianidine, dinotéfurane, imidaclopride, thiaclopride, thiaméthoxame	QuEChERS (ACN acidifié, sels : sulfate de magnésium/acétate de sodium, PSA, DSC-C18)	-	1	-	2000, 10000, 20000, 50000, 100000 *	59-76	2000-10000 *	(Taliensky-Chamudis et al., 2017)
Sérum de lapin	500	Imidaclopride + 1 métabolite	ELL (Eau/DCM)	x	0.2	10	5.10 <sup>5</sup> , 5.10 <sup>6</sup> , 5.10 <sup>7</sup> *	88,4	6000 *	(Stivaktakis et al., 2016)
Sang humain	2000	Imidaclopride + 18 autres	ELL (DCM/acétate d'éthyle/acétone)	x	1	25	2.10 <sup>5</sup> *	88	10000 *	(Luzardo et al., 2015)
Sang de rat	1000	Imidaclopride + 2 métabolites	ELL (ACN, sulfate de magnésium anhydre)	SPE (C18)	1	20	-	-	-	(Kapoor et al., 2014)

- information non disponible, x : étape non réalisée

ACN : Acétonitrile, DCM : Dichlorométhane, ELL : Extraction Liquide Liquide, LD : Limite de détection, LQ : Limite de quantification, MeOH : Méthanol, QuEChERS : Quick, Effective, Cheap, Rugged and Safe extraction, SPE : Extraction sur Phase Solide

### c. Avantages et inconvénients de la SPE en ligne

La SPE en ligne a été initialement sélectionnée pour ses avantages à savoir de permettre une automatisation de la préparation d'échantillon afin de réduire le temps de manipulation. En effet, après une étape de SPE hors ligne, une étape d'évaporation doit se suivre avant l'injection. La technique de SPE en ligne a été appliquée pour l'analyse des PFAS (Munoz et al., 2017; Sebastiano et al., 2021) et du bisphénol (Gély et al., 2021) dans le sang pour ces molécules. Elle fonctionne très bien et permet d'obtenir de bonnes sensibilités en matrice plasma ou sang. Cette technique permet alors de traiter un grand nombre d'échantillons avec une même cartouche rincée entre chaque injection. Elle est également peu consommatrice de solvants et de déchets contrairement aux méthodes classiques d'extraction liquide-liquide ou QuEChERS.

Cependant, cette technique s'accompagne également d'un lot d'inconvénients. Tout d'abord les critères de vérification et qualité à vérifier sont nombreux. En effet, il faut les vérifier en amont de l'installation du module SPE en ligne et également une fois le module connecté.

De plus, de nombreuses interférences ont vu le jour lors de l'analyse des azoles où les précautions à prendre étaient nombreuses pour cette famille. Il est également arrivé que les lignes de base de certaines transitions soient plus élevées, dès le blanc système, bien le bruit soit équivalent à celui attendu. Dans ces cas, pour retrouver une ligne de base abaissée et sans interférant, il a fallu laisser circuler dans le système un mélange de solvant pendant plusieurs heures (Figure 56). Ce mélange est composé d'alcool isopropylique (50 %), acétonitrile (25 %), cyclohexane (15 %) et dichlorométhane (10 %). Une fois les performances habituelles retrouvées, les critères qualités de l'étape suivante peuvent être vérifiés.

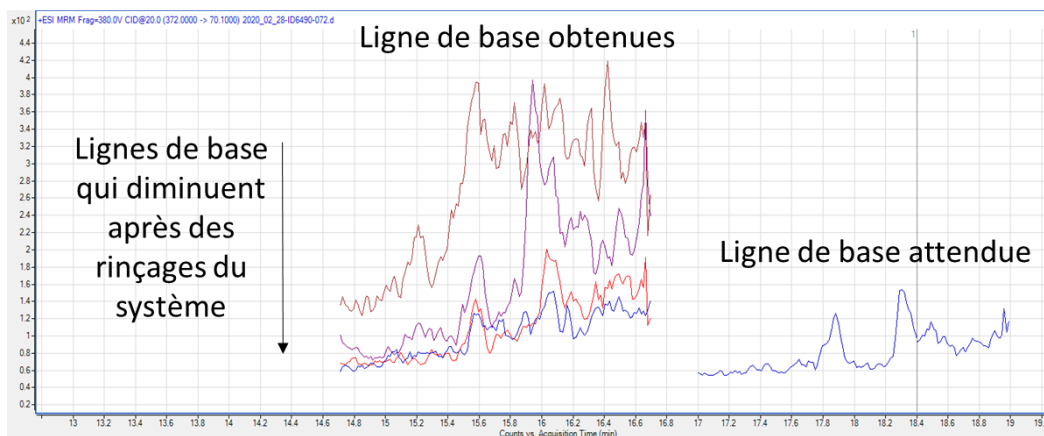


Figure 56 : Lignes de base obtenues pour la TQ du tétraconazole lors d'un blanc système en ID

En ce qui concerne l'analyse des néonicotinoïdes et leurs métabolites, cette technique avec la cartouche pré-colonne C18 ne paraît pas compatible puisque ce sont des molécules polaires qui fuient rapidement. Ceci entraîne une baisse significative des sensibilités machine entre celles obtenues en pg injectés en ID et celles en SPE en ligne. Un changement de cartouche peut être réalisé mais toutes ne seront pas compatibles. En effet, comme le système est en couplage, les pressions au sein du système sont plus élevées. Les cartouches à faible porosité entraînent des pertes de charge plus importantes.

De plus, le plasma dilué dans l'eau MQ ne peut être injecté que pour une famille donnée de pesticides. Cela n'est pas le cas lors d'une extraction classique liquide-liquide avec une reprise dans un solvant organique pouvant être sauvegardé.

A ces inconvénients de méthodes analytiques s'ajoute également la complexité de la matrice plasma. En effet, les LQ bien que préalablement validées en matrice plasma de poulet de référence ont dû systématiquement être vérifiées pour le plasma spécifique de l'espèce. Comme vu dans la partie précédente, une variabilité est présente selon les espèces.

Les nombreux inconvénients listés ne changent en rien la qualité des résultats générés. De plus, ils ne pouvaient être anticipés au vu de l'absence de données fournies avec cette technique analytique dans la littérature pour ces familles de molécules.

Des critères ont été ajoutés aux tableaux des données de concentrations pour des cas particuliers permettant ainsi de maintenir l'information sur certaines valeurs inférieures à la LQ. Ces légendes spécifiques accompagnent chaque tableau de données dans les annexes adéquates présentées ultérieurement.

## 2. Applications environnementales

### a. Azoles

Les données brutes des concentrations obtenues des concentrations en azoles chez les merles noirs sont mentionnées en sous-parties (i) de l'Annexe 5, de l'Annexe 6 pour les mésanges charbonnières, de l'Annexe 7 pour les cigognes blanches, de l'Annexe 8 pour les goélands et enfin de l'Annexe 9 pour les crapauds épineux.

Le myclobutanil n'a pas été analysé dans les échantillons plasmatiques. La priorisation des molécules n'était pas complète au stade de l'analyse de ces échantillons. Le chapitre précédent n°3 sur l'échantillonnage passif du compartiment air montre qu'il aurait été pertinent d'un point de vue environnemental d'analyser cette molécule.

#### *i. Merles noirs (synthèse des résultats de la publication n°2 page 243)*

Tous les résultats obtenus pour les merles noirs seront plus amplement étudiés dans la publication n°2 dont les données brutes sont compilées en sous-partie (i) de l'Annexe 5. Cette publication retrace les azoles quantifiés en matrice plasma avec une approche écologique et écophysiological. Plusieurs problématiques sont soulevées dans cette étude portant sur l'influence de l'habitat, de l'année de capture, de la saisonnalité, du sexe et de l'âge des individus, de leur phénotype sur les concentrations retrouvées dans leur plasma.

Les résultats des échantillons de mousses PUF sont exposés pour les azoles sur le site forestier (site n°4) et viticole (site n°6) afin de les mettre en parallèle avec les concentrations plasmatiques. Il en ressort les mêmes conclusions pour la matrice plasma qu'au chapitre précédent à savoir une saisonnalité des concentrations quantifiées dans la phase gazeuse. Aucun azole, excepté le tébuconazole en milieu forestier pour les mois de mars/avril, n'a été quantifié avant le mois d'avril sur les deux sites étudiés. De fortes concentrations en cinq azoles ont été quantifiées sur les mois de mai/juin pour le difénoconazole, le penconazole, le fenbuconazole, le tébuconazole et le tétraconazole.

En matrice plasma de merles noirs plusieurs azoles ont été quantifiés : le cyproconazole, le difénoconazole, le fenbuconazole, le flusilazole, le metconazole, le tébuconazole et le tétraconazole. D'autres en revanche n'ont pas été quantifiés : l'époxiconazole, le flutriafol, l'imazalil, le penconazole, le prochloraze, le propiconazole, le prothioconazole, le triadiméfon et le triadiménol.

Dans un premier temps, les différents habitats seront comparés entre les milieux urbain, forêt et viticole. Aucun azole n'a été quantifié sur le site urbain et seulement quelques-uns en milieu forestier. Les difénoconazole, fenbuconazole, tébuconazole et tétraconazole ont été les molécules les plus quantifiées en milieu viticole. Ces molécules coïncident bien avec celles autorisées à être appliquées en milieu viticole. Des différences significatives ont été calculées, à l'aide du test  $\chi^2$ , entre ces molécules quantifiées dans le milieu viticole avec les valeurs des deux autres milieux. Aucune différence significative n'a été relevée pour les autres molécules et également entre les deux milieux urbain et forestier.

Pour la suite des tests, seules les quatre molécules difénoconazole, fenbuconazole, tébuconazole et tétraconazole sont concernées puisqu'elles ont des fréquences de quantification supérieures à 15 % dans au moins un milieu (viticole). La date d'échantillonnage apporte des différences significatives pour le difénoconazole, le fenbuconazole et le tétraconazole. Cela signifie que les concentrations ont tendance à augmenter entre les mois d'avril et juillet. Cette remarque coïncide bien avec les concentrations des mousses PUF qui sont également élevées vers les mois de mai/juin. En 2016, les concentrations sont significativement plus élevées par rapport à celles de 2019 générées pour le difénoconazole, le fenbuconazole ainsi que le tébuconazole. La pluviométrie sur les différents mois des deux années a été cumulée sur une zone proche des sites de capture (Cognac-Chateaubernard (16)). En effet, plus le temps est humide plus les champignons peuvent se développer. C'est alors que l'application de fongicide peut être plus intense. Néanmoins, cette hypothèse ne permet de pas de justifier la différence puisque c'est en 2019 que les pluies (en mm) étaient plus importantes sauf sur le mois de mai (62,7 mm en 2016 contre 57,7 mm en 2019). En revanche, aucune de ces quatre molécules n'est affectée par le statut et sexe (juvénile, adulte mâle ou adulte femelle).

La condition corporelle est ensuite observée correspondant au rapport du poids corporel sur la taille des ailes. Ce marqueur de santé global indique l'état des réserves corporelles. La condition corporelle est significativement affectée par le statut de l'oiseau. Les femelles sont en meilleures conditions que les mâles et les juvéniles. En revanche aucune différence n'est observée entre ces deux derniers statuts. L'habitat impacte également significativement la condition corporelle avec des merles noirs urbains en meilleurs conditions que ceux issus des sites viticole et forestier. Aucune différence n'a été observée sur la condition des merles noirs capturés sur ces deux derniers habitats. Une diminution de la condition est observée selon les mois d'échantillonnage. En revanche, celle-ci n'est pas affectée par l'année d'échantillonnage entre 2016 et 2019.

L'hématocrite est un marqueur de santé, souvent utilisé dans les études écotoxicologique (Klaassen et al., 2013; Lopez-Antia et al., 2021) et, correspondant à la proportion de globules rouges dans le sang, n'est pas affectée ni par le statut en site viticole ni par les concentrations en azoles sélectionnés.

Ensuite, la qualité du plumage des oiseaux, corrélée à sa densité, par rapport aux différents paramètres a été observée. Aucune différence significative n'a été calculée entre les années et les types d'habitat. En revanche, la qualité est affectée significativement par le statut à savoir que les mâles ont des plumes plus denses que celles des femelles. La densité n'est pas affectée par les concentrations en azoles sélectionnés.

Tous ces résultats sont à nuancer. Dans l'environnement, de nombreuses molécules sont retrouvées. Les résultats des tests statistiques prennent en compte les effets cocktails de toutes ces molécules. Pour vraiment prouver l'effet d'une molécule sur un organisme, ce sont des expériences en laboratoire qu'il faut réaliser. Même si une molécule prouve avoir des effets lors de ces expériences, des résultats différents peuvent subvenir lors de l'observation dans

l'environnement. A l'opposé, des effets s'annulant peuvent également se produire. Si les tests ne sont pas significatifs pour une molécule donnée par rapport à ces conditions environnementales, cela ne signifie pas qu'elle n'est pas toxique.

### ii. *Mésanges charbonnières*

Les espèces mésanges charbonnières (données brutes présentes dans l'Annexe 6) et merles noirs peuvent être comparées sur un même site d'échantillonnage et également pour les mêmes mois. Sur les données brutes des concentrations plasmatiques des mésanges charbonnières, uniquement les valeurs supérieures à la LQ sont gardées pour pouvoir avoir les mêmes conditions de validation que celles des merles. En ce qui concerne les données brutes des merles, seules les valeurs des mois de juin et juillet 2019 pour les juvéniles sont maintenues comme les plasmas de mésanges ont été échantillonnées uniquement pendant ces deux mois sur des juvéniles. Toutes les données inférieures à la LQ ont été remplacées par la moitié de cette LQ. Le résumé de ces sélections de données pour les deux espèces est compilé dans le Tableau 51.

En forêt, seule la molécule tébuconazole est quantifiée chez un individu de mésange charbonnière. En site viticole, en revanche, les difénoconazole, fenbuconazole, tébuconazole et tétraconazole sont quantifiés chez les deux espèces et le flusilazole chez un individu de mésange charbonnière. La différence entre les deux sites forêt et viticole est bien observable chez les mésanges tout comme elle l'a été démontrée dans la publication n°2 chez les merles noirs.

En milieu viticole, se pose la question si l'une des deux espèces est plus contaminée que l'autre.

Tableau 51 : Fréquences de quantification, moyenne et écart-type pour les concentrations en azoles supérieures à la LQ dans le plasma de merles noirs et de mésanges charbonnières capturés en juin et juillet 2019 sur les sites forestier et viticole

	<b>Forêt</b>			
	<b>Merles noirs (n = 2)</b>		<b>Mésanges charbonnières (n = 8)</b>	
	<b>F<sub>q</sub></b>	<b>M ± SD (pg/g plasma)</b>	<b>F<sub>q</sub></b>	<b>M ± SD (pg/g plasma)</b>
Cyproconazole	0% (0/2)	< LQ	0% (0/8)	< LQ
Difénoconazole	0% (0/2)	< LQ	0% (0/8)	< LQ
Epoxiconazole	0% (0/2)	< LQ	0% (0/8)	< LQ
Fenbuconazole	0% (0/2)	< LQ	0% (0/8)	< LQ
Flusilazole	0% (0/2)	< LQ	0% (0/8)	< LQ
Flutriafol	0% (0/2)	< LQ	0% (0/8)	< LQ
Imazalil	0% (0/2)	< LQ	0% (0/8)	< LQ
Metconazole	0% (0/2)	< LQ	0% (0/8)	< LQ
Penconazole	0% (0/2)	< LQ	0% (0/8)	< LQ
Prochloraze	0% (0/2)	< LQ	0% (0/8)	< LQ
Propiconazole	0% (0/2)	< LQ	0% (0/8)	< LQ
Prothioconazole	0% (0/2)	< LQ	0% (0/8)	< LQ
Tébuconazole	0% (0/2)	< LQ	13% (1/8)	22,5
Tétraconazole	0% (0/2)	< LQ	0% (0/8)	< LQ
Triadiméfon	0% (0/2)	< LQ	0% (0/8)	< LQ
Triadiménol	0% (0/2)	< LQ	0% (0/8)	< LQ



	Viticole			
	Merles noirs (n = 13)		Mésanges charbonnières (n = 18)	
	F <sub>q</sub>	M ± SD (pg/g plasma)	F <sub>q</sub>	M ± SD (pg/g plasma)
Cyproconazole	0% (0/13)	< LQ	0% (0/18)	< LQ
Difénoconazole	8% (1/13)	23,7	33% (6/18)	29,6 ± 20,4
Epoxiconazole	0% (0/13)	< LQ	0% (0/18)	< LQ
Fenbuconazole	15% (2/13)	40,1 ; 55,3	17% (3/18)	44,5 ± 20,1
Flusilazole	0% (0/13)	< LQ	6% (1/18)	10,8
Flutriafol	0% (0/13)	< LQ	0% (0/18)	< LQ
Imazalil	0% (0/13)	< LQ	0% (0/18)	< LQ
Metconazole	0% (0/13)	< LQ	0% (0/18)	< LQ
Penconazole	0% (0/13)	< LQ	0% (0/18)	< LQ
Prochloraze	0% (0/13)	< LQ	0% (0/18)	< LQ
Propiconazole	0% (0/13)	< LQ	0% (0/18)	< LQ
Prothioconazole	0% (0/13)	< LQ	0% (0/18)	< LQ
Tébuconazole	31% (4/13)	32,8 ± 7,6	28% (5/18)	74,1 ± 82,1
Tétraconazole	100% (13/13)	1565,1 ± 2408,4	83% (15/18)	205,5 ± 252,2
Triadiméfon	0% (0/13)	< LQ	0% (0/18)	< LQ
Triadiménol	0% (0/13)	< LQ	0% (0/18)	< LQ

F<sub>q</sub> : Fréquence de quantification, LQ : Limite de Quantification, M ± SD : moyenne ± écart-type

Les boîtes à moustaches illustrées Figure 58 permettent de rendre compte de cette potentielle différence. Des concentrations bien plus élevées en plasma de merles noirs que mésanges charbonnières sont observées pour le tétraconazole.

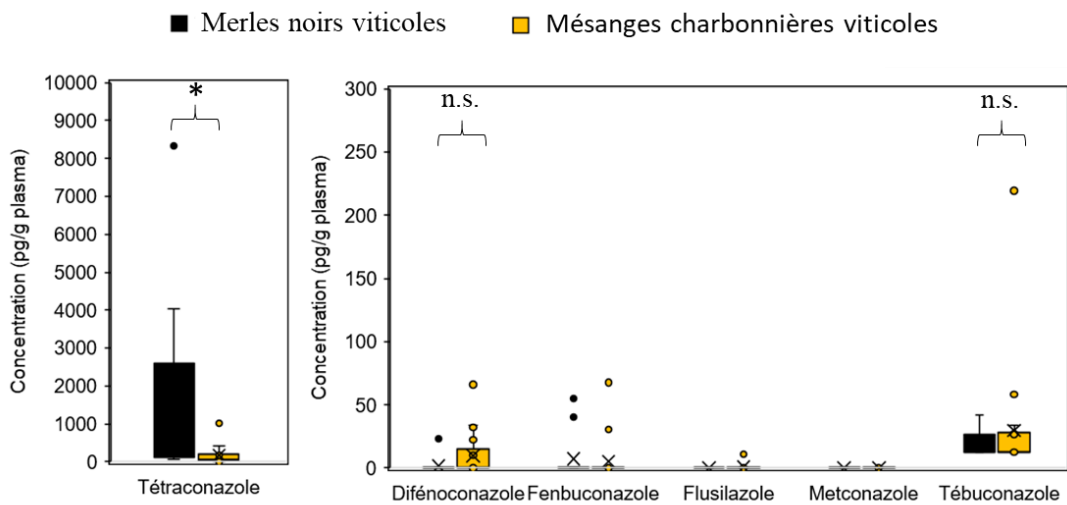


Figure 57 : Boîtes à moustaches des concentrations en azoles quantifiés chez les merles noirs et mésanges charbonnières viticoles des mois de juin/juillet 2019. Test statistique Kruskal-Wallis (\* indique p-value < 5 %, \*\* < 1 % et \*\*\* < 0,1 %, n.s. : non significatif)

Les tests de comparaisons Mann-Whitney ont été réalisés pour les trois molécules ayant une fréquence de quantification supérieure à 20 % chez au moins l'une des deux espèces en milieu viticole à savoir : le difénoconazole, le tébuconazole et le tétraconazole. La fréquence est donc trop faible pour le fenbuconazole et le flusilazole pour pouvoir réaliser un test statistique.

Aucune différence significative n'a été observée entre ces deux espèces pour le difénoconazole (p-value = 0,06 / Z = -1,88) et le tébuconazole (p-value = 0,885 / Z = 0,14).

En revanche, une différence significative a été calculée pour le tétraconazole ( $p$ -value = 0,013) où la valeur positive de  $Z$  de 2,49 informe que ceux sont les concentrations plasmatiques chez le merle noir qui sont supérieures à celles chez la mésange charbonnière. Cette différence est bien visible sur les boîtes à moustaches.

Pour expliquer cette différence plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. La différence pourrait tout d'abord s'expliquer par l'échantillonnage non homogène. En effet, le nombre de chaque espèce capturée par jour n'est pas équivalent. Les plasmas de merles noirs auraient pu être prélevés les jours d'application du tétraconazole. Sachant qu'il a été prouvé que le tétraconazole ne s'accumule pas dans le plasma et se distribue rapidement dans les organes (Gross et al., 2020), la concentration plasmatique imprègne bien la temporalité des traitements.

La deuxième hypothèse porte sur la métabolisation. En effet, il a été prouvé que le métabolisme des mésanges est plus élevé que celui des merles noirs (Daan et al., 1990). C'est le taux métabolique de base (BMR en anglais pour Basal Metabolic Rate) correspondant à la consommation de dioxygène au repos qui permet de quantifier le métabolisme d'une espèce. La valeur du BMR normalisée par la masse de l'espèce est de 0,019 pour les mésanges charbonnières contre 0,011 pour les merles noirs. Les molécules peuvent alors être dégradées plus rapidement générant donc des concentrations en natifs plus faibles dans le plasma de mésange charbonnière. Le métabolisme est également plus élevé chez les juvéniles puisqu'ils sont en plein stade de croissance.

La différence pourrait également provenir d'une nourriture variant entre les deux espèces bien qu'elles aient été capturées sur un même site viticole. Si elles mangeaient de manière proportionnelle à leur masse en supposant que leur métabolisme soit égal, la concentration plasmatique devrait être similaire. Les deux espèces se nourrissent d'insectes et de graines au sol pouvant être contaminés (Cruz, 2015; Guarda et al., 2020; Pelosi et al., 2021; Pierdet, 2020). Le merle noir est une espèce plus opportuniste qui pourrait alors manger une nourriture plus contaminée dont les vers de terre (Daniele et al., 2018) (Pelosi et al., 2021). Les mésanges charbonnières, elles, pourraient avoir une zone de prospection de nourriture plus restreinte et donc moins proche des vignes.

iii. Cigognes blanches

Deux sites peuvent être comparés pour les cigognes blanches où le Tableau 52 résume les fréquences et les concentrations obtenues sachant que les données brutes en azoles sont inscrites dans la sous-partie (i) de l'Annexe 7.

Tableau 52 : Fréquences de détection et de quantification, moyenne et écart-type pour les concentrations en azoles supérieures à la LQ dans le plasma de cigognes blanches

Cigognes blanches (n = 31)						
Brouage (n = 11)			Estuaire de la Gironde (n = 20)			
	F <sub>d</sub>	F <sub>q</sub>	M ± SD (pg/g plasma)	F <sub>d</sub>	F <sub>q</sub>	M ± SD (pg/g plasma)
Cyproconazole	0% (0/11)	0% (0/11)		0% (0/20)	0% (0/20)	
Difénoconazole	0% (0/11)	0% (0/11)		5% (1/20)	0% (0/20)	
Epoxiconazole	0% (0/11)	0% (0/11)		0% (0/20)	0% (0/20)	
Fenbuconazole	0% (0/11)	0% (0/11)		5% (1/20)	0% (0/20)	
Flusilazole	0% (0/11)	0% (0/11)		0% (0/20)	0% (0/20)	
Flutriafol	0% (0/11)	0% (0/11)		0% (0/20)	0% (0/20)	
Imazalil	0% (0/11)	0% (0/11)		0% (0/20)	0% (0/20)	
Metconazole	0% (0/11)	0% (0/11)		0% (0/20)	0% (0/20)	
Penconazole	0% (0/11)	0% (0/11)		0% (0/20)	0% (0/20)	
Prochloraze	0% (0/11)	0% (0/11)		0% (0/20)	0% (0/20)	
Propiconazole	0% (0/11)	0% (0/11)		0% (0/20)	0% (0/20)	
Tébuconazole	0% (0/11)	0% (0/11)		10% (2/20)	10% (2/20)	29,0 ; 55,9
Tétraconazole	0% (0/11)	0% (0/11)		5% (1/20)	20% (4/20)	140,6 ± 172,7
Triadimérol	0% (0/11)	0% (0/11)		0% (0/20)	0% (0/20)	

F<sub>d</sub> : Fréquence de détection, F<sub>q</sub> : Fréquence de quantification, LQ : Limite de Quantification, M ± SD : moyenne ± écart-type

Aucun azole n'a été ni détecté ni quantifié sur le site Brouage. En revanche, dans le site de l'estuaire de la Gironde, le difénoconazole, fenbuconazole, tébuconazole ainsi que tétraconazole sont détectés mais seulement les deux derniers sont quantifiés. Le tétraconazole est la molécule la plus souvent quantifiée avec également des concentrations supérieures aux autres molécules (Figure 59) tout comme chez les autres espèces merles noirs et mésanges charbonnières.

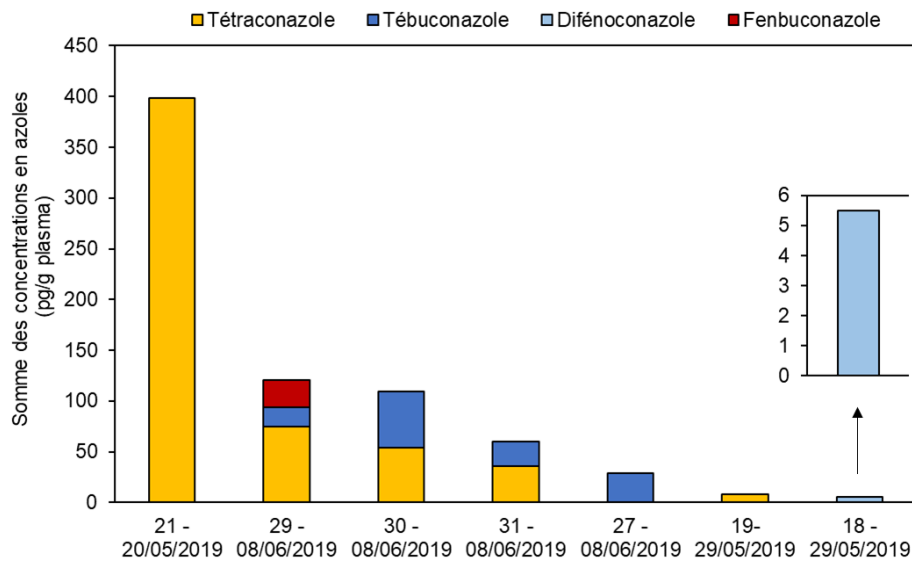


Figure 58 : Somme des concentrations en azoles (toutes les valeurs sont prises et pas seulement celles supérieures à la LQ) par individu de cigognes blanches de l'estuaire de la Gironde

Les localisations précises des individus de cigognes blanches capturés le long de l'estuaire de Gironde mentionnés sur la Figure 60 peuvent permettre de comprendre la dynamique. Quand au moins un azole est quantifié on peut repérer la présence d'un site viticole. En revanche la réciproque n'est pas avérée. En effet, bien que les sites de capture 14, 15 et 20 sont proches de sites viticoles, aucun azole n'a pourtant été quantifié. Plusieurs hypothèses justifient ces différences à savoir la provenance de la nourriture. En effet, bien que les sites 17/18 et 29/30/31 soient séparés de seulement 700 m les lieux de nourriture sont différents. Il a été observé sur le terrain que les individus 17/18 se nourrissent à proximité d'un canal récoltant les eaux de ruissellement y compris celles des zones viticoles. En revanche les individus 29/30/31 ont des zones d'alimentation vers des prairies humides. On pourrait s'attendre à de plus fortes concentrations chez le plasma des individus 17/18 or ce n'est pas le cas. Les dates d'échantillonnage peuvent alors justifier les principales différences. En effet, aucun azole n'a été quantifié dans les échantillons 14/15 prélevés le 21/05/2019. Puis, un azole a été quantifié dans le plasma de l'individu 18 capturé le 29/05/2019. Et enfin des azoles en plus fortes concentrations ont été obtenus dans les plasmas des individus 29/30/31 capturés plus tardivement le 08/06/2019. Il se peut qu'ils aient donc été capturés juste après une application d'azoles contrairement aux précédentes cigognes blanches.

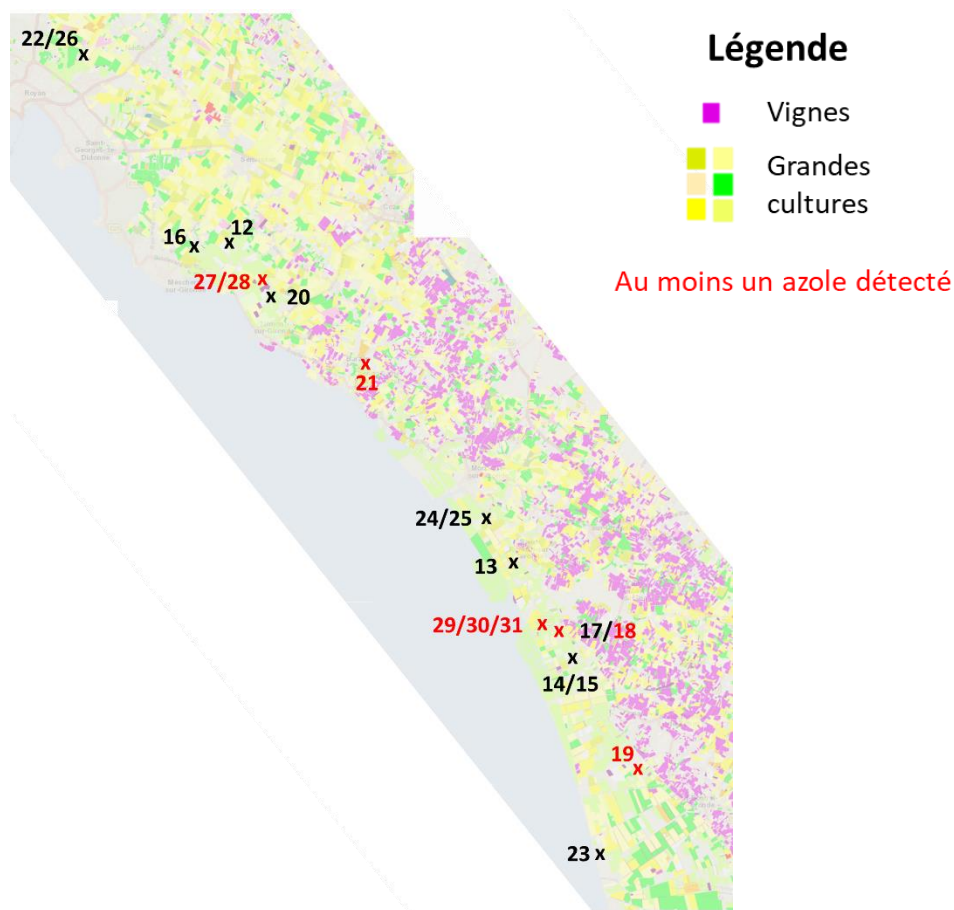


Figure 59 : Localisation des sites de capture des cigognes blanches en estuaire de la Gironde accompagnée du registre parcellaire 2019 (Géoportail)

*iv. Autres espèces*

Aucun azole n'a été quantifié dans les plasmas de goélands que ce soit en goélands bruns des deux années confondues 2017 et 2018 ou les goélands marins de 2018 dont les données brutes sont mentionnées en sous-partie (i) de l'Annexe 8.

Aucun azole n'a été quantifié non plus dans les quelques échantillons de plasma de crapauds épineux (Annexe 9 sous-partie (i)). Les azoles étant généralement appliqués d'avril à août comme décrit dans le chapitre 3, ces dates printanières (mars) et automnales (octobre) ne coïncident pas avec celles de capture des crapauds épineux. Pour étudier l'exposition des invertébrés aux azoles il faudrait privilégier des espèces capturables pendant la période d'application des azoles. Etant plus facilement capturables autour des mares durant leur période de reproduction, certaines espèces seulement peuvent être ciblées.

Pour ces deux espèces, aucun autre échantillon supplémentaire n'a été analysé.

**b. Néonicotinoïdes**

*i. Vertébrés (synthèse des résultats de la publication n°3 page 273)*

Les néonicotinoïdes ont été analysés dans ces mêmes échantillons où les résultats des azoles ont été précédemment décrits. Les données brutes en néonicotinoïdes sont inscrites dans les sous-parties (ii) de l'Annexe 5 pour les merles noirs, de l'Annexe 7 pour les cigognes blanches et de l'Annexe 8 pour les goélands. A partir de la méthode analytique SPE en ligne des azoles, une méthode légèrement différente a été employée. Dans cette publication n°3, les performances et techniques analysées sont comparées avec la littérature. Il s'agit du Tableau 50 préalablement exposé dans la partie développement de ce chapitre. Des LQ comprises entre 4 et 600 pg/g de plasma ont été obtenues avec une prise d'essai de 25 µL. Notre étude est la seule mentionnant l'analyse du plasma à l'aide de la technique analytique SPE en ligne installée en amont de la LC-MS/MS.

Les plasmas de merles noirs de 2016 (n = 21) et 2019 (n = 15), de cigognes blanches de 2019 (n = 31) puis de goélands pour les trois espèces (goélands marins n = 8, goélands bruns n = 52 et goélands argentés n = 27) des années 2016 à 2020 ont été analysés en néonicotinoïdes. Les néonicotinoïdes ont connu des restrictions d'usage en France à partir de 1<sup>er</sup> septembre 2018. Les résultats ont été séparés entre ceux des individus capturés avant cette date d'interdiction et ceux après. La séparation a également été réalisée pour les trois types d'habitat des merles noirs et des deux types pour les cigognes blanches.

La Figure 61, constituant le résumé graphique de la publication n°3, résume les fréquences de détection et quantification chez ces espèces d'oiseaux étudiées.

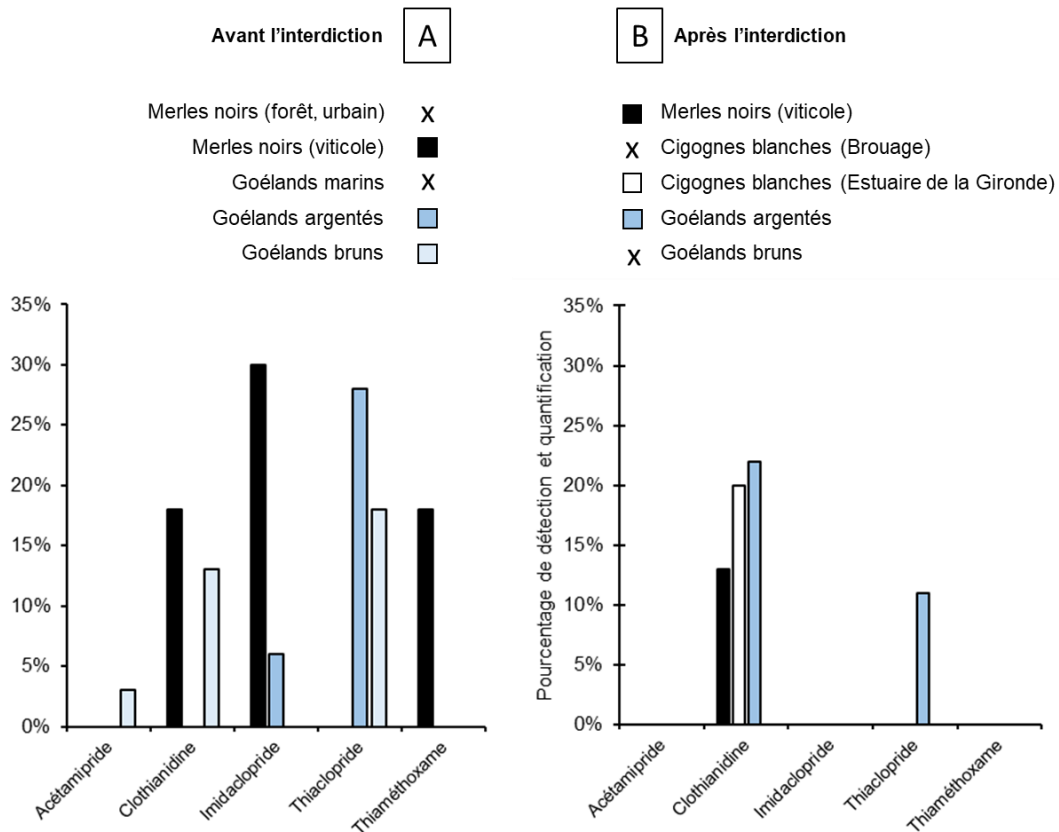


Figure 60 : Fréquences de détection et quantification des néonicotinoïdes chez les merles noirs, les cigognes blanches et les goélands (marins, argentés et bruns)

Le cycloxapride, le dinotéfurane, le flupyradifurone le nitenpyrame et le sulfoxaflor n'ont pas été détectés dans les plasmas de ces différentes espèces. A contrario, l'acétamipride, la clothianidine, l'imidaclopride, le thiachlopride et le thiaméthoxame ont été détectés. Cette distinction de présence de molécules coïncide bien avec celles qui ont été autorisées en France.

Aucun néonicotinoïde n'a été détecté dans le plasma d'individu provenant de sites non agricoles tels que la ville et la forêt pour les merles noirs, les marais de Brouage pour les cigognes blanches et les goélands marins se nourrissant plus à proximité de la côte.

Pour les merles noirs capturés avant l'interdiction en site viticole, les molécules suivantes ont été détectées voire quantifiées : la clothianidine, l'imidaclopride et le thiaméthoxame. Chez les deux autres espèces de goélands, bruns et argentés, l'acétamipride, la clothianidine, l'imidaclopride et le thiachlopride ont été détectés voire quantifiés. Ces espèces se nourrissant aussi bien en zone littorale qu'en zone agricole seront plus à même d'être exposées à ces insecticides.

Après l'interdiction des néonicotinoïdes et pour les trois espèces d'oiseaux, la clothianidine a été détectée et/ou quantifiée. Le taux s'élève à 20 % des cigognes blanches capturées le long de l'estuaire de Gironde. Ce site est bordé de grandes cultures et de vignes comme l'a montré précédemment la Figure 60. Le thiachlopride a été quantifié chez un seul individu de goéland argenté.

Pour tous les échantillons réunis, c'est la clothianidine qui est présente à de plus fortes concentrations que ce soit avant ou après l'interdiction. Deux échantillons de goélands bruns, un en 2017 et l'autre en 2018, ont des taux très élevés pour cette molécule. Sachant qu'il n'est pas vendu sur les sites d'étude il ne peut provenir de son application agricole. Sa présence pourrait être justifiée par la métabolisation du thiaméthoxame (Nauen et al., 2003). De plus, la persistance des néonicotinoïdes dans les eaux ou dans les sols (Schaafsma et al., 2015) a été prouvée notamment pour le thiaméthoxame (Hladik et al., 2017). La valeur maximale du temps de demi-vie dans le sol parmi les néonicotinoïdes est obtenu pour la clothianidine avec 545 jours d'après la base PPDB ou encore 19 ans d'après Rexrode et al. (2003). Tout ceci suggère une continuité de l'exposition aux néonicotinoïdes pour la faune sauvage, y compris des années après leur interdiction.

Les valeurs de concentrations ont ensuite été comparées avec celles présentes dans la littérature sachant que ces dernières ont toutes été recueillies avant l'interdiction des néonicotinoïdes. Elles sont pour toutes les molécules dans le même ordre de grandeur excepté pour la clothianidine qui a été quantifiée à des concentrations maximales de 69300 ng/g plasma (Lennon et al., 2020b) contre 1,3712 ng/g plasma dans le cas de notre étude. Les fortes concentrations référencées dans la publication de Lennon et al. (2020b) peuvent être justifiées par la capture des différentes espèces d'oiseaux (par exemple : bruant jaune, moineau domestique, ...) juste après l'application sur les champs de graines enrobées au clothianidine.

Dans une dernière partie, les valeurs de concentrations maximales recueillies dans l'environnement ont été mises en relation avec les valeurs de DL50 et NOEC des molécules en question. Ce calcul est possible grâce aux études cinétiques de transfert de l'imidaclopride (Eng et al., 2021) (Kapoor et al., 2014) ou thiaméthoxame (Bednarska et al., 2013) dans le plasma en connaissant la dose ingérée. Pour l'unique valeur quantifiable de 202,2 pg/g plasma en imidaclopride cela équivaldrait, si l'oiseau a été exposé à une unique dose, à 0,009 %NOEC ou 0,003 %DL50. Des études ont relevé des effets sur les conditions physiologiques, comportementales et ou sexuels après exposition de faibles doses chez les oiseaux : 0,5 %DL50 (Zgirski et al., 2021) ou 4 et 8 %DL50 (Eng et al., 2019, 2017) voire la plus faible de 0,07 %DL50 (Humann-Guillemot et al., 2019). Finalement, le taux obtenu dans notre étude n'est pas éloigné de ceux reportés dans les études. En supposant que le taux de transfert dans le plasma soit identique à celui de l'imidaclopride pour les autres molécules quantifiées, ces pourcentages pour %NOEC et %DL50 ont été obtenus :  $4 \cdot 10^{-5}$  et  $4 \cdot 10^{-4}$  pour l'acétamipride, 0,009 et 0,001 pour la clothianidine, 0,008 et  $9 \cdot 10^{-4}$  pour le thiaclopride,  $2 \cdot 10^{-5}$  et  $3 \cdot 10^{-4}$  pour le thiaméthoxame avec une concentration fixée à sa LQ divisée par deux comme ils ont été détectés mais non quantifiés. Les taux les plus élevés sont obtenus pour la clothianidine qui est pourtant la molécule ayant des valeurs de NOEC et DL50 les plus faibles.

Pour conclure, la matrice plasma permet bien de détecter de faibles signaux. De plus, ils représentent les différents types d'habitats des espèces d'oiseaux étudiées avec des détections uniquement en zones agricoles. L'effet de l'interdiction des néonicotinoïdes en France est visible avec cette matrice bien que la clothianidine soit encore quantifiée. Un intérêt majeur doit être porté pour la clothianidine y compris des années après les restrictions.

*i. Merles noirs*

Comme vu au sein de la précédente publication n°3, les molécules suivantes ont été détectées voire quantifiées dans le plasma de merle : la clothianidine, l'imidaclopride ainsi que le thiaméthoxame. Tous les échantillons de merles n'ont pas été analysés en néonicotinoïdes. Les détails fournis par cette analyse engendrent une interprétation des résultats moins approfondies. Les échantillons ont été sélectionnés de façon à couvrir toute la période d'échantillonnage de mars à juillet. Les résultats obtenus peuvent donc être superposés avec ceux obtenus pour l'analyse des mousses PUF sur le même site n°6 viticole (Figure 62) dont les résultats sont exposés dans le chapitre 3 précédent.

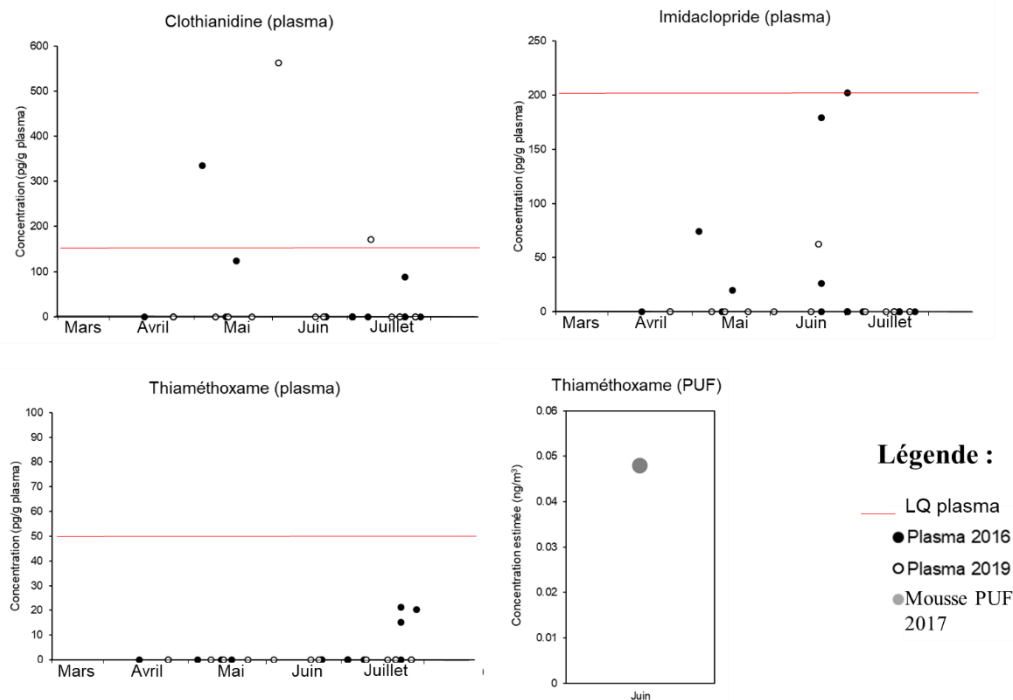


Figure 61 : Concentrations plasmatiques en néonicotinoïdes chez les merles noirs viticoles des deux années 2016 et 2019 superposées avec la concentration quantifiée dans une mousse PUF de 2017

Ni la clothianidine ni l'imidaclopride n'ont été quantifiés en mousse PUF échantillonnant l'air d'où leur non insertion dans les graphiques. Le thiaméthoxame lui a été quantifié sur les dates précédents la détection du thiaméthoxame dans le plasma. Il s'agit d'une détection et non d'une quantification dans cette matrice biologique puisque les valeurs sont comprises entre la LD et LQ. L'échantillonnage du compartiment air n'a pas été réalisé au-delà du 188<sup>ème</sup> jour de 2017. Le décalage observé entre la détection dans l'air et celle dans le plasma peut provenir d'une différence de date d'application du thiaméthoxame puisque l'année est différente. En effet, les conditions météorologiques différentes influent sur les dates de traitement et également les concentrations retrouvées dans l'air (Schummer et al., 2010).

Quoiqu'il en soit le mois d'application coïncide avec les concentrations retrouvées dans le plasma de merles noirs. Avec un nombre d'échantillons positifs en néonicotinoïdes, le détail d'informations est moindre que pour l'analyse des azoles.



## ii. Goélands

Plus d'interprétations des résultats peuvent être réalisées sur les goélands puisque d'autres données sont disponibles.

Les suivis GPS (collaboration entre le CEBC et la LPO) ont pu être extraits pour les goélands bruns. La proportion d'habitation marine ou terrestre est ainsi connue pour chacun de ces individus munis d'une balise (n = 10 en 2017, n = 10 en 2018, n = 1 en 2019). Ces proportions sont mises en corrélation avec la quantification ou non d'au moins un néonicotinoïde (Figure 63).

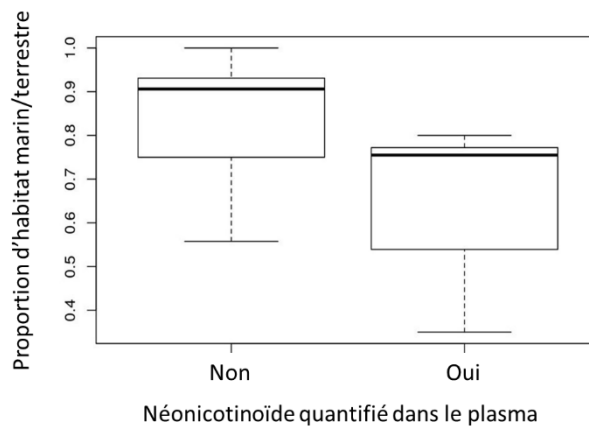


Figure 62 : Proportion d'habitat marin ou terrestre quand les néonicotinoïdes ont été quantifiés ou non chez les goélands bruns munis d'une balise GPS

Ce diagramme à moustaches prouve que les individus pour lesquels aucun néonicotinoïde n'a été quantifié dans le plasma ont une plus forte proportion d'habitat marin. A contrario, ceux où au moins un néonicotinoïde a été quantifié dans le plasma ont des proportions d'habitation terrestre plus élevées que ceux où aucun néonicotinoïde n'a été quantifié. Ceci coïncide bien avec le lieu d'application des pesticides dans les zones agricoles terrestres. D'autres paramètres, analysés au LIENSs, permettent de relier avec l'habitat tels que certains isotopes stables analysés dans le sang total. De nombreuses études ont été réalisées pour étudier les habitats des oiseaux au travers les valeurs des isotopes du carbone et de l'azote (Hobson et al., 1993; Rubenstein et Hobson, 2004).

La signature isotopique du carbone 13 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) informe sur l'origine géographique de la matière organique consommée par un organisme (Vander Zanden et al., 1999). Les environnements marins sont plus enrichis que les terrestres (Kelly, 2000).

La valeur  $\delta^{15}\text{N}$  permet d'informer du niveau trophique d'un consommateur au sein de son réseau (Minagawa et Wada, 1984) (Deniro et Epstein, 1981). Les goélands marins sont des espèces plus spécialistes de proies marines contre des proies généralistes pour les goélands bruns et argentés (Hobson, 1999). Les goélands marins étant donc de plus haut niveau trophique que les deux autres espèces (Binkowski et al., 2021).

Et enfin, l'isotope 34 du soufre ( $\delta^{34}\text{S}$ ) indique la provenance marine ou terrestre de la nourriture (Rubenstein et Hobson, 2004). Il peut donc être un témoin de l'habitat.

La somme des concentrations en néonicotinoïdes, présentée sous forme de logarithme de façon à diminuer la dispersion des valeurs, est comparée avec ces données isotopiques (Figure 64).

Les corrélations n'ont pas été faites dans ces cas particuliers car la majorité des points étaient similaires en termes de concentrations de néonicotinoïdes. Cette absence de variance n'a donc pas permis de réaliser ces tests de corrélation.

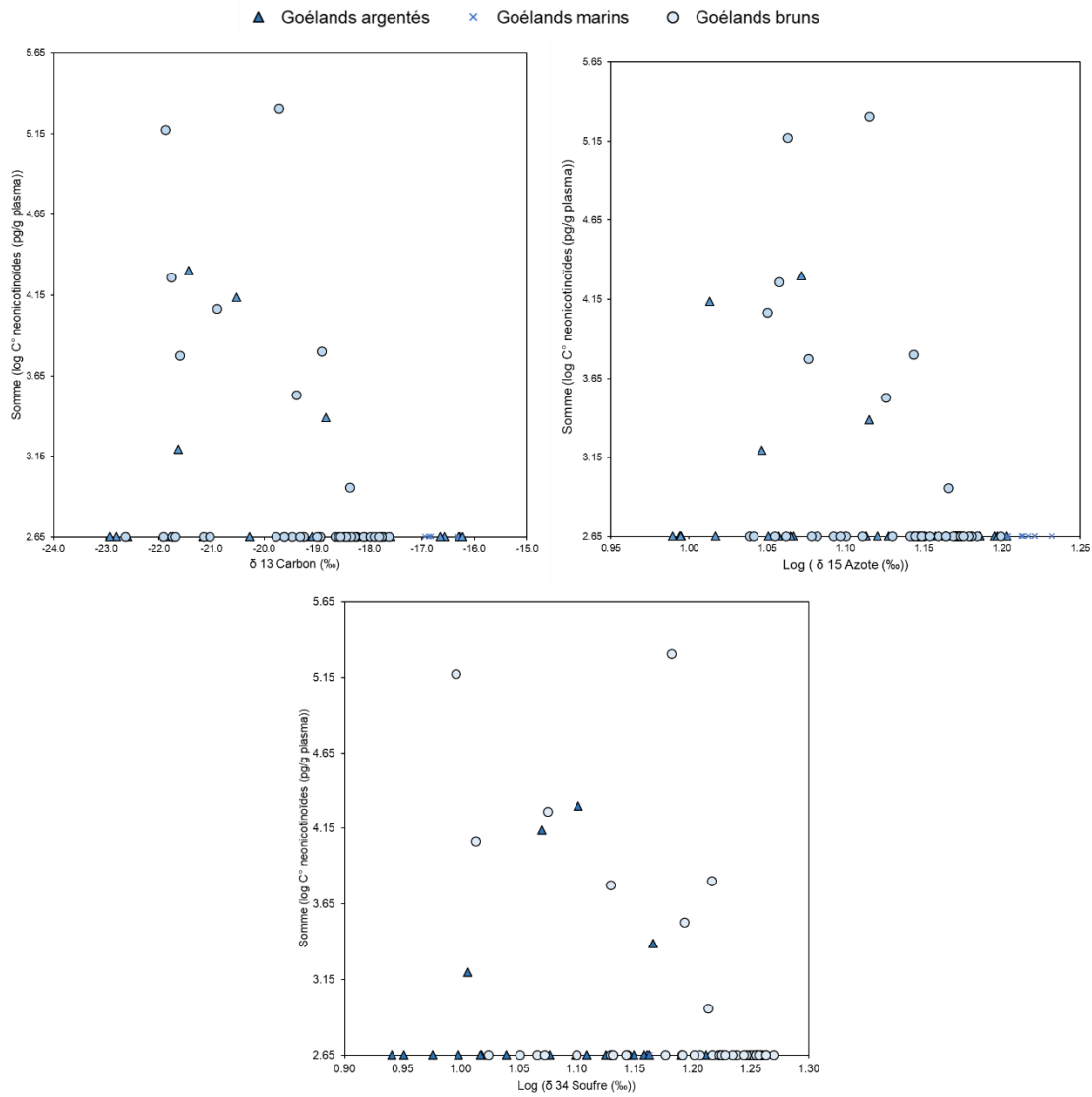


Figure 63 : Relation entre la somme des concentrations en néonicotinoïdes avec différentes signatures isotopiques pour les trois espèces de goélands

### iii. *Autres espèces*

Les données brutes réalisées pour les crapauds épineux printemps 2018 (mars) et automne 2019 (octobre) sont présentées en sous-partie (ii) de l'Annexe 9. Toutes les concentrations obtenues sont inférieures à la LQ. D'après la figure Figure 45 du chapitre n°3 qui retrace le calendrier d'application des néonicotinoïdes, ils peuvent être appliqués pendant le mois d'octobre date à laquelle certains ont été quantifiés dans les mousses PUF à de faibles concentrations ( $< 1,8 \cdot 10^{-2}$  ng/m<sup>3</sup> en concentration estimée). Néanmoins, en octobre 2019, les néonicotinoïdes ont été déjà interdits depuis un an. Le crapaud épineux ne semble pas être une espèce adéquate pour retracer l'exposition des néonicotinoïdes à cette échelle locale et aucun autre échantillon supplémentaire n'a été analysé pour cette espèce.

### c. *Corrélation entre azoles et néonicotinoïdes*

Afin de compléter les approches séparées par famille de molécules précédemment développées, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée (Figure 65). Cette représentation permet de réunir sur un même graphique les données des différentes espèces.

Toutes les valeurs inférieures à la LQ ont été remplacées par la moitié de celle-ci. Puis, toutes les valeurs ont subi une transformation logarithmique à base 10 et ont été centrées réduites. La transformation logarithmique permet de réduire les forts écarts de concentrations. Quant à la transformation centrée et réduite, elle permet une contribution équivalente pour chaque molécule bien que leurs valeurs de LQ soient différentes.

Seuls les échantillons où les deux familles ont été analysées ont été incluses dans l'ACP, cela concerne donc les individus suivants : merles noirs (n = 36), cigognes blanches (n = 31), goélands bruns (n = 20), goélands marins (n = 8). Les molécules où aucun échantillon n'a été quantifié ont été supprimées à savoir pour les azoles : l'époxiconazole, le flutriafol, l'imazalil, le penconazole, le prochloraze, le triadiménol et pour les néonicotinoïdes : le cycloxypride, le dinotéfurane, le nitenpyrame, le sulfoxaflor et le thiaméthoxame. Les molécules non validées pour toutes les espèces n'ont pas été insérées (le prothioconazole, le triadiméfon et le flupyradifurone).

La première dimension, l'axe x qui explique 27,7 % de la variabilité, est principalement construite avec une contribution positive des trois molécules suivantes : le cyproconazole, le flusilazole et le metconazole. Cette contribution positive est essentiellement apportée par trois individus de merles noirs. Un de ces individus provient du site n°4 forestier où le cyproconazole a été quantifié. Il s'agit d'un individu échantillonné en bordure de forêt ce qui pourrait expliquer sa contamination. De plus, le cyproconazole a été quantifié dans une mousse PUF exposée dans ce même site forestier ce qui justifie sa présence et potentielle exposition pour les individus forestiers. Les deux autres merles noirs proviennent du site n°6 viticole avec le metconazole quantifié chez un et un assemblage du flusilazole et metconazole chez l'autre. La contamination du flusilazole ne peut s'expliquer par les données du chapitre précédent. En effet, elle n'a ni été vendue dans ces départements en 2017 ni été quantifiée dans le compartiment air. En revanche, elle a été achetée en 2018 et donc cette contamination pourrait être due à l'éventuelle persistance de la molécule dans différents compartiments environnementaux. Le cyproconazole, lui, a été fortement vendu et appliqués en grandes cultures. Il a d'ailleurs été retrouvé dans le compartiment aérien de ce même site. Les molécules tébuconazole et tétraconazole participent également à la dimension x avec une contribution positive avec cette même espèce merles noirs.

Sur ce même axe horizontal, les contributions négatives sont très faibles où le fenbuconazole et le difénoconazole constituent les principaux apports.

La dimension 2, l'axe vertical y, explique seulement 19,3 % de la variation qui est du même ordre de grandeur que la dimension 1. Elle est essentiellement régie de manière positive pour les molécules azoles telles que le tétraconazole, le tébuconazole, le difénoconazole et le fenbuconazole. Celles-ci sont toutes employées dans les zones viticoles où les individus concernés sont bien les merles noirs. Puis, une faible contribution négative de cet axe est apportée par trois néonicotinoïdes : l'acétamipride, la clothianidine ainsi que le thiaclopride. Les goélands bruns et cigognes sont les espèces concernées par cette direction. Seuls les néonicotinoïdes ont été quantifiés chez les goélands bruns d'où leur position tout en bas du graphique. Chez les cigognes blanches aussi bien des azoles que des néonicotinoïdes ont été quantifiés d'où leur position proche du centre. En ce qui concerne les goélands marins, ils se situent au centre du graphique puisqu'aucune molécule n'a été quantifiée dans leur plasma.

Pour conclure, cette représentation illustre une projection des individus plus dispersée pour les merles noirs qui est essentiellement dirigée par la famille des molécules azolées. Sur l'axe y positivement il s'agit des molécules azoles employées en zones viticoles et sur l'axe x, toujours positivement, des azoles employés uniquement dans les grandes cultures. La projection des résultats des néonicotinoïdes est plus restreinte et concerne essentiellement les goélands bruns ainsi que quelques individus de cigognes blanches. Toutes ces remarques confirment bien les précédentes conclusions sur le succès d'employer ces molécules comme marqueurs d'habitats.

Cette représentation graphique présente l'avantage de regrouper les deux familles de molécules ainsi que les différentes espèces étudiées. En revanche, le résultat présente un biais puisque toutes les espèces ne sont pas représentées dans tous les habitats. Il est normal d'observer une corrélation entre les merles noirs et les azoles puisque leur habitat viticole correspond à l'usage de cette famille de molécules. Idéalement, il faudrait pouvoir comparer différentes espèces au sein d'un même habitat ainsi que différents habitats pour une même espèce.

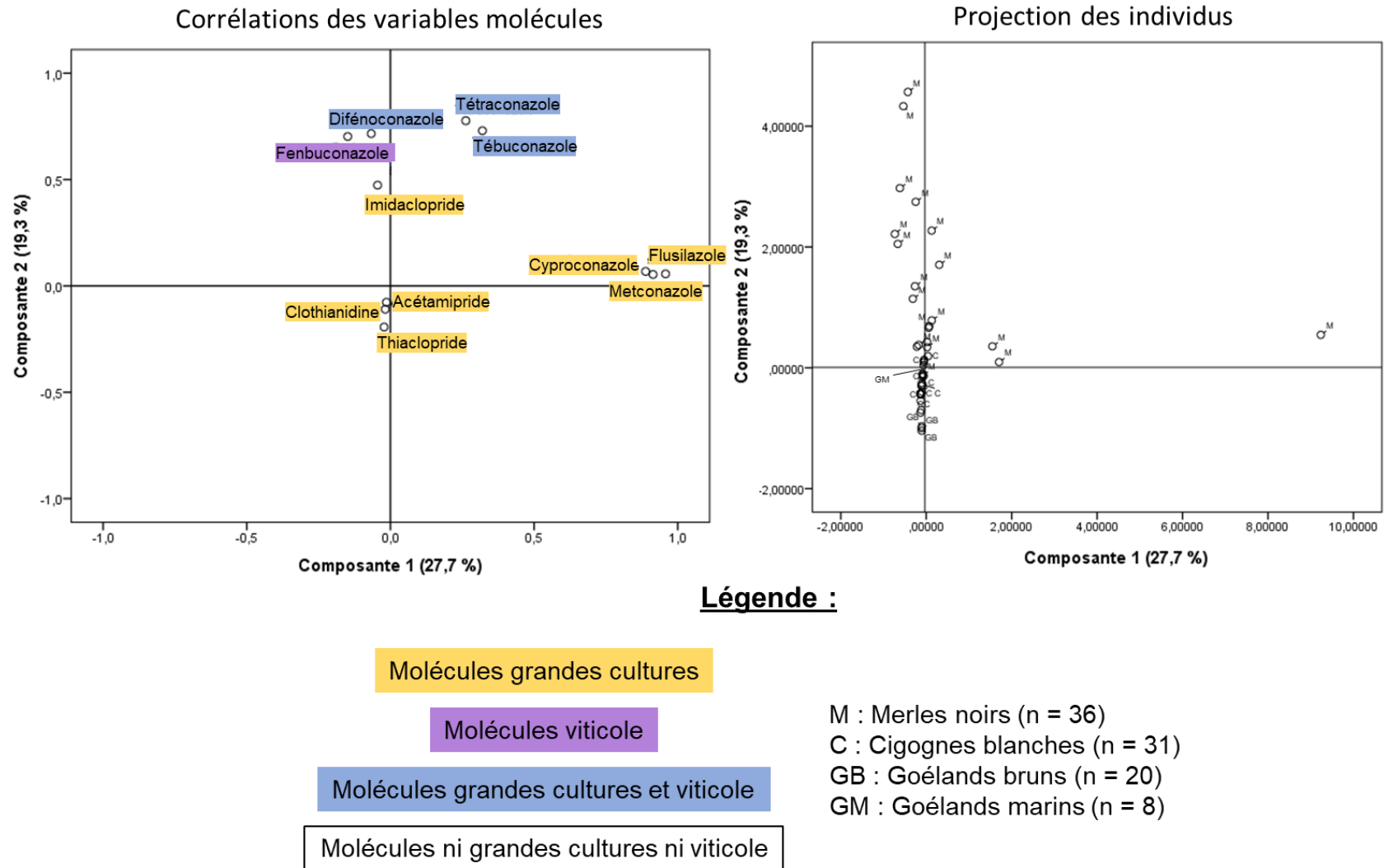


Figure 64 : Analyse en composantes principales sur les azoles et néonicotinoïdes quantifiés en matrice plasma de quatre espèces d'oiseaux

d. Néonicotinoïdes métabolites

Ces résultats en métabolites des néonicotinoïdes n’ont pas été intégrés à la publication n°3 puisque les informations qu’ils contiennent sont minimales. Ils sont donc présentés ici (Figure 66) pour toutes les espèces confondues. Aucun métabolite des néonicotinoïdes n’a été quantifié dans le plasma de cigognes blanches. L’imidaclopride urée n’apparaît pas dans cette figure puisqu’il n’a jamais été quantifié dans le plasma des différentes espèces d’oiseaux.

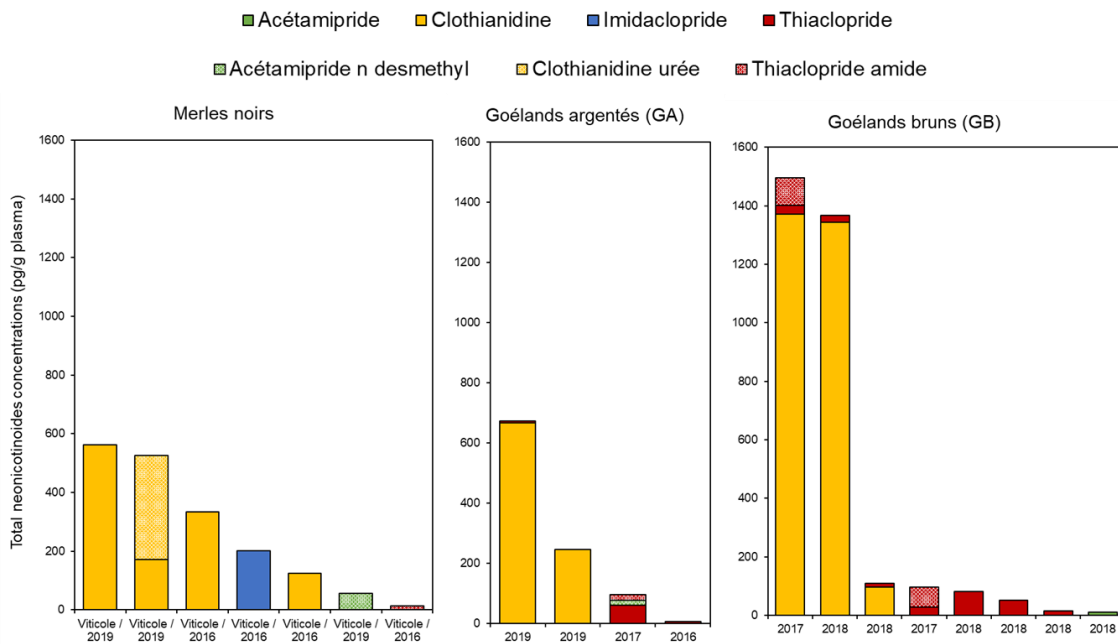


Figure 65 : Concentrations cumulées en néonicotinoïdes et leurs métabolites chez les merles noirs, goélands argentés et goélands bruns

Il est difficile d’observer une tendance pour ces métabolites présents à faibles fréquences de quantification et concentrations. La concentration la plus forte en métabolite est obtenue pour la clothianidine urée chez un plasma de merles noirs viticoles. On ne peut pas affirmer que le métabolite d’un natif est plus souvent quantifié lorsque son natif l’a été. Chez les merles noirs viticoles, deux échantillons ont été positifs en métabolites alors qu’aucune molécule parent n’a été quantifiée.

Pour justifier ces résultats peu fructueux plusieurs hypothèses sont possibles. Dans un premier temps ces métabolites peuvent se dégrader rapidement. Cette hypothèse est plausible puisqu’il s’agit du but des métabolites : transformer la molécule parent afin qu’elle soit plus rapidement excrétée hors de l’organisme. La clothianidine, qui peut être un métabolite du thiaméthoxame, est présente à fortes concentrations, alors qu’elle n’est pas appliquée, permet de valider cette hypothèse. De plus, le thiaméthoxame n’a pas été quantifié alors que la clothianidine l’a été (Nauen et al., 2003).

Il se peut également que les métabolites suivis ne soient pas ceux ayant le plus d’intérêt. En effet, l’imidaclopride oléfine a été prouvé être un métabolite d’intérêt de l’imidaclopride mais n’a pu être validé avec cette méthode analytique (Bean et al., 2019).

### 3. Expériences d'exposition en laboratoire

#### a. Tébuconazole, azole

L'expérience d'exposition a été menée avec des moineaux domestiques (*Passer domesticus*) maintenus en captivité au CEBC, par le biais d'une contamination de l'eau de boisson au tébuconazole à 1 mg/L. Cette concentration en eau de boisson est supérieure à celle retrouvée dans les eaux environnementales. Comme vu dans le chapitre bibliographie, le tébuconazole a pu être quantifié dans les eaux à des concentrations allant de 0,001 à 0,200 µg/L (De Gerónimo et al., 2014; Guarda et al., 2020; Peng et al., 2018). Plus spécifiquement en France et dans la région Nouvelle-Aquitaine, les concentrations cumulées pour tous les pesticides varient de 0,12 à 4,44 µg/L a été quantifiée. La concentration spécifique en tébuconazole n'est pas connue mais soit il n'est pas quantifié soit sa concentration est inférieure à ces valeurs cumulées pour tous les pesticides.

La concentration dans l'eau de boisson a volontairement été sélectionnée plus élevée à celle retrouvée dans l'environnement de façon à mimer l'exposition totale de l'environnement naturel (le sol et la nourriture peuvent également être contaminés). Dans le cadre de cette thèse, il s'agit ensuite de quantifier les concentrations obtenues dans les matrices étudiées de l'oiseau. Pour ce chapitre, les résultats obtenus en matrice plasma seront détaillés. Les effets de l'exposition de cette molécule ne seront donc pas précisés dans ces travaux.

Le tébuconazole a bien été quantifié dans le plasma du groupe exposé depuis six mois via l'eau de boisson avec une concentration obtenue de 59,7 pg/g plasma. Le tébuconazole n'a pas été quantifié dans le plasma provenant du groupe témoin (non exposé) et a donc une concentration inférieure à la LQ toujours fixée à 25 pg/g plasma. Ces résultats démontrent le transfert du tébuconazole dans le plasma via une administration par voie orale avec de l'eau de boisson.

Mais, finalement, la concentration moyenne pour les merles viticoles des deux années 2016 et 2019 confondues (n = 62) est de :  $149,2 \pm 143,4$  pg/g plasma et est du même ordre de grandeur que la concentration quantifiée dans l'expérience. Cela laisserait suggérer que la concentration d'exposition sélectionnée représente finalement bien l'environnement avec toutes ses sources de contamination confondues. L'eau de boisson n'est donc pas l'unique vecteur de transfert. Les voies transtégumentaires, respiratoires, et trophiques y compris via l'alimentation (Klaassen et al., 2013) ne sont pas à négliger. Comme indiqué dans une partie précédente, la nourriture peut être contaminée. De plus, en effet la phase air peut être un vecteur de contamination comme les azoles y ont été quantifiés d'après les études de Phyto-Atmo Nouvelle-Aquitaine ou encore plusieurs publications (Schummer et al., 2010) (Coscollà et al., 2010) et thèse (Cruz, 2015). Les résultats concernant le compartiment aérien exposés au chapitre 3 ont vérifié cette hypothèse.

Il s'agit ensuite de relier les concentrations environnementales avec les doses : DL50 orale de 1988 mg/kg p.c. et la NOEL de 5,8 mg/kg.p.c.jour obtenues chez l'espèce d'oiseau le colin de Virginie (*Colinus virginianus*) ("Pesticide properties database (PPDB)," 2021) pour le tébuconazole. La publication (Gross et al., 2020) recense une étude cinétique où le tébuconazole a été analysé dans le plasma 1 h après ingestion de graines de blé traitées. Deux doses, une faible avec l'ingestion de 10 graines traitées soit l'équivalent de 0,0308 mg/kg p.c. (0,002 % DL50) et une haute avec 30 graines soit 0,0925 mg/kg p.c. (0,005 % DL50), ont été testées chez la caille du Japon (*Cortunix japonica*). A faible dose et au bout d'une heure, le tébuconazole n'a pas été détecté dans le plasma avec une LD de 0,2 µg/L. Le transfert plasmatique très rapide après administration avait été prouvé également pour le triadiméfon (Li

et al., 2017). A forte dose, la concentration médiane plasmatique du tébuconazole, où le nombre d'individus exposés est de 31, est également inférieure à la limite de détection. La fréquence de détection du tébuconazole dans le plasma avec la forte dose est de 9 % correspondant à 3 individus avec concentration maximale de 45,8 µg/L qui prouve la forte variabilité des résultats. Cette forte dose génère donc un rapport maximal de 2020 g plasma/kg p.c.. Avec la concentration maximale dans l'environnement de 222,2 pg/g plasma quantifié chez un merle viticole capturé en juillet 2019, la dose équivalente de  $5 \cdot 10^{-4}$  mg/kg.p.c. est calculée et représente 0,00002 %DL50 ou 0,009 %NOEL.

Le calcul de relation entre concentration plasmatique et dose d'exposition ne peut pas être comparée avec celle de l'expérience des moineaux domestiques. En effet, ce calcul ne peut être réalisée pour l'expérience ne connaissant pas la dose d'exposition journalière. Il faudrait idéalement connaître la quantité d'eau bue par un individu puisque la concentration de celle-ci est connue.

Finalement, cette expérience d'exposition prouve le transfert du tébuconazole via l'eau de boisson vers le plasma des vertébrés étudiés.

## b. Imidaclopride, néonicotinoïde

### i. Analyse de l'imidaclopride

L'imidaclopride a été analysé dans 3 groupes de plasma de diamant mandarin (*Taeniopygia guttata*) exposés à cette molécule par voie orale à 0,5 %DL50 (fixée à 50 mg/kg p.c.) pendant 30 jours à partir du 4<sup>ème</sup> jour. Finalement, avec une LQ fixée à 10 pg/g plasma, les concentrations suivantes ont été quantifiées (Zgirski et al., 2021) :

- Dans le groupe témoin non exposé : 83 pg/g plasma (dont 10 échantillons regroupés)
- Dans le groupe exposé à J30 du premier jet : 7917 pg/g plasma (dont 10 échantillons regroupés)
- Dans le groupe exposé à J30 du deuxième jet : 4192 pg/g plasma (dont 10 échantillons regroupés)

On note que les groupes expérimentaux montrent des concentrations très supérieures à celles mesurées dans le groupe témoin. Ce dernier, non exposé, est malgré tout légèrement contaminé. Cette contamination peut éventuellement provenir de la nourriture étant de l'huile de maïs. Pour vérifier cette hypothèse, il aurait fallu l'analyser. Par manque de temps, ceci n'a pu être réalisé. En effet, c'est tout un développement qu'il aurait fallu mener ne pouvant pas l'analyser tout simplement avec le même protocole plasma puisque les matrices diffèrent.

Pour revenir aux concentrations de l'expérience obtenues, elles sont bien supérieures à celles retrouvées dans l'environnement. En effet, une unique concentration en imidaclopride a été quantifiée dans un échantillon de plasma de merles noirs en 2016 à une concentration de 202,2 pg/g plasma. La cinétique des néonicotinoïdes y compris de l'imidaclopride dans le sang et plasma étant très rapide (Eng et al., 2021; Kapoor et al., 2014), il est compliqué de comparer ces deux valeurs ne sachant pas le délai entre la dose ingérée ou exposée et le prélèvement. Dans ces deux publications le rapport entre la dose ingérée en mg/kg p.c. et la concentration plasmatique maximale en pg/mL oscille entre 4005 et 6245 g plasma/kg. p.c. Au jour 30 de l'exposition de laboratoire, la dose finale ingérée est de 250 µg/kg p.c. en considérant un poids moyen de 10 g du diamant mandarin. Cette dose génère donc un rapport de 31578 et de 59637 g plasma/kg p.c. pour les deux concentrations des deux jets d'expérience qui sont bien



supérieures à celles de la littérature. Les concentrations plasmatiques de l'expérience sont bien inférieures à celles maximales attendues. Trois hypothèses peuvent expliquer cette différence : soit le plasma à J30 n'a pas été prélevé 1 h après la dernière dose lorsque la concentration plasmatique est maximale, soit l'exposition répétée tous les jours n'est pas équivalente à une dose unique où la dose totale ingérée ne peut pas être additionnée soit la solution d'imidaclopride avec laquelle les oiseaux ont été gavés se serait dégradée. Ces hypothèses peuvent être complémentaires et prouvent la forte variation d'un facteur presque égal à 2 entre les deux jets de l'expérience.

Finalement, cette expérience d'exposition prouve le transfert de l'imidaclopride via l'alimentation vers le plasma des vertébrés étudiés.

### *i. Analyse des métabolites*

Les différents métabolites validés avec le protocole ont été recherchés dans ces mêmes échantillons plasmatiques de l'expérience laboratoire sur le diamant mandarin à savoir l'acétamipride N desmethyl, la clothianidine urée, l'imidaclopride urée et le thiaclopride amide. Aucun d'entre eux n'a été quantifié dans les trois groupes de plasma. On aurait pu s'attendre à quantifier de l'imidaclopride urée étant un des nombreux métabolites de l'imidaclopride (Van Lexmond et al., 2015). Cette concentration faible voire éventuellement nulle pourrait témoigner d'une métabolisation rapide ou encore que la molécule parent ne subit aucune étape de métabolisation puisqu'elle serait facilement excrétée de l'organisme sans modification particulière. Néanmoins, cette dernière hypothèse est rejetée puisque l'imidaclopride urée ainsi que d'autres métabolites ont été quantifiés, après ingestion d'imidaclopride, dans les matrices : végétales (Seifrtova et al., 2017), alimentaires dans le miel, animales telles que chez les abeilles (Séverine Suchail et al., 2004). En revanche, il semblerait que ce métabolite ne serait pas le meilleur à suivre dans les matrices biologiques puisqu'il peut ne pas être détecté dans le plasma à contrario de l'imidaclopride oléfine qui serait un meilleur traceur (Bean et al., 2019). Les concentrations en métabolites pouvant être aussi bien plus élevées que celles du natif (Roy et al., 2020) ou inférieures (Kapoor et al., 2014) en fonction de la date d'exposition.

## 4. Bilan des concentrations plasmatiques

Les concentrations plasmatiques ont été obtenues à l'aide de la SPE en ligne couplée en amont de la LC-MS/MS. Il s'est avéré que la technique employée associée à la cartouche sélectionnée n'a pas été complètement compatible pour les néonicotinoïdes et leurs métabolites. Des résultats avec de faibles sensibilités pour certaines molécules ont malgré tout été obtenues. D'autres procédures, mentionnées dans la bibliographie, aurait pu apporter de meilleures sensibilités. Néanmoins ces techniques auraient été plus consommatrice de solvant, de matériel et également de temps. En effet, les étapes de purifications en amont prennent du temps. Comme le plasma est une matrice complexe, elles auraient sûrement été indispensables.

Cette complexité de la matrice s'est vérifiée au travers l'analyse des pesticides étudiés. En effet, pour l'analyse des azoles, les critères qualités ont dû être multipliés à plusieurs niveaux. De plus, des différences d'effet matrice selon les espèces de vertébrés ou d'amphibiens ont été observées avec les étalons internes. Il a fallu vérifier les LQ pour chacune des matrices en réalisant un dopage à la LQ sur un échantillon sans molécule initialement quantifiée.

Finalement, les LQ varient de 10 à 5000 pg/g plasma pour les azoles, de 4 à 600 pg/g plasma pour les néonicotinoïdes et de 10 à 150 pg/g plasma pour les quelques métabolites analysés.

Finalement, de faibles fréquences de détection et de quantification ont été obtenues pour ces trois familles. Néanmoins, pour les substances actives vendues et retrouvées dans l'air, les molécules quantifiées coïncident en termes de saisonnalité. Les faibles signaux en plasma sont essentiellement dû à la cinétique rapide dans cette matrice comme il s'agit d'un fluide relié aux organes. Bien que les fréquences soient faibles, elles permettent bien de représenter les différents habitats. Quand le nombre de données a été suffisant, cela a été appuyé par des tests statistiques. Les concentrations plasmatiques obtenues permettent de mettre en lumière ces différences d'habitats mais également des variations entre les espèces potentiellement liées à la saisonnalité de capture, des zones de prospection de nourriture différentes ou encore des mécanismes de métabolisations distincts.

Pour les azoles, quatre molécules ont été mises en évidence en milieu viticole par les merles noirs et les mésanges charbonnières. Il s'agit du fenbuconazole, du difénoconazole, du tébuconazole et du tétraconazole. Les concentrations pour cette dernière molécule ont été les plus élevées alors que le tébuconazole est normalement plus vendu pour application en zone viticole. Leur propriété physico-chimique en termes de polarité sont semblables. Le tétraconazole est plus soluble et moins volatil ce qui pourrait justifier de plus fortes concentrations aqueuses sachant que le plasma est composé principalement d'eau.

En ce qui concerne les néonicotinoïdes, une différence en termes de fréquences de détection et de quantification a été observée par rapport à la date de leur interdiction. La clothianidine se retrouve encore dans la matrice plasma après interdiction. Il serait alors intéressant de continuer à analyser les néonicotinoïdes dans l'environnement bien qu'ils soient interdits. En revanche, les résultats obtenus pour les métabolites des néonicotinoïdes n'ont pas été très fructueux.

La comparaison entre les espèces est difficilement réalisable puisque leurs habitats varient également. Il faudrait idéalement échantillonner plusieurs espèces dans un même milieu pour réaliser cette comparaison (comme cela a été réalisé entre le merle noir et la mésange charbonnière). De la même manière et de façon à comparer différents milieux, le plasma d'une même espèce ubiquiste pourrait être échantillonné dans différents habitats (comme cela a été réalisé pour le merle noir et la mésange charbonnière).

Les données environnementales ont été comparées aux concentrations reportées dans les études de cinétiques et d'expérimentation en laboratoire. Bien que les doses estimées sur les concentrations environnementales sont lointaines des DL50 pour la plupart des molécules, elles peuvent s'en rapprocher ainsi que de leur NOEC. Il faut d'ailleurs se méfier puisque les doses estimées peuvent être largement sous-estimées puisque la concentration plasmatique quantifiée dans l'environnement n'est sûrement pas la concentration maximale. Il faudrait être certain d'échantillonner l'individu que très peu de temps après l'application de la substance active sur la culture. Les concentrations retrouvées pourraient donc induire des perturbations endocrines.

Publication n°1 : Development of a method to analyse selected azoles fungicides in the plasma of free-living birds using LC-MS/MS combined with on-line SPE

## Title

Development of a method to analyse selected azoles fungicides in the plasma of free-living birds using LC-MS/MS combined with on-line SPE

## Names

Louise Prouteau <sup>a,b</sup>, Frédéric Angelier <sup>a</sup>, Olivier Chastel <sup>a</sup>, Patrick Pardon <sup>b</sup>, François Brischoux <sup>a</sup>, Hervé Lormée <sup>c</sup>, Marie-Hélène Devier <sup>d</sup>, Hélène Budzinski <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Centre d'Etudes Biologiques de Chizé (CEBC), UMR 7372- CNRS-Université La Rochelle, Villiers-en-Bois F-79360, France

<sup>b</sup> University of Bordeaux, EPOC, UMR 5805, LPTC Research Group, Talence F-33400, France

<sup>c</sup> Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS), Villiers-en-Bois F-79360, France

<sup>d</sup> CNRS, EPOC, UMR 5805, LPTC Research Group, Talence F-33400, France

## Abstract

In this study, a method was developed to analyse 16 azoles fungicides currently used in vineyards including 14 triazoles (cyproconazole, difenoconazole, epoxiconazole, fenbuconazole, flusilazole, flutriafol, metconazole, penconazole, propiconazole, prothioconazole, tebuconazole, tetraconazole, triadimefon, triadimenol and 2 imidazoles (imazalil and prochloraz) in bird plasma samples. Azoles were extracted using a rapid and simple preparation step including protein precipitation with acetonitrile. Final extracts diluted with Milli-Q water were loaded on-line Solid Phase coupled to high performance liquid chromatography with tandem spectrometry detection (LC-MS/MS) in positive electrospray mode.

Optimizations were conducted along the analytical chain using model matrices (Milli-Q water, reference plasmas or blackbird plasma samples). Method validation was performed taking into account: linearity, quantification limit (LOQ), extraction recoveries, intraday and interday precision, conservation extracts and matrix effects. Although the plasma intake volume was low (25  $\mu$ L), LOQ were ranged between 10 to 1500  $\text{pg.g}^{-1}$  plasma except for the less sensitive compound (prothioconazole) with 5000  $\text{pg.g}^{-1}$  plasma. Azole concentrations were calculated by internal calibration. Finally, this method was successfully applied to 33 Eurasian blackbird plasma samples sampled in different locations (city, forest, vineyards). As expected, azoles concentrations were dependent on the sampling location and were especially elevated in vineyards where these fungicides are massively used.

## Keywords

Azoles

Pesticides

Bird plasma

On-line solid phase extraction

LC-MS/MS

Method validation



## 1. Introduction

Fungicides are widely used in agricultural and vineyards across the European Union. Twenty pesticide treatments are used by average every year in French vinegrowing areas, and among those, 16 treatments are antifungal [1]. Fungicides are sprayed for preventive and curative purposes against leaf spot diseases, including powdery mildew and black rot for grape. Among the organic fungicides family, azoles are increasingly used and new molecules have been developed in the last few years. Azoles are part of demethylation inhibitors class (DMI) and contain two chemical families: triazoles and imidazoles with the same molecular mechanism. They inhibit the activity of the enzyme lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) which is responsible of the ergosterol synthesis. As this sterol is an essential component of the fungal cell wall, azoles trigger the death of cells [2] and helps prevent fungal diseases in crops. Parts of the CYP51 structure are also expressed in vertebrate DNA including human [3], mice [4] and chicken [5]. Thus, the use of these fungicides in crops could affect non-target species that are exposed to these fungicides during the treatments or through the food chain. Previous experimental work has demonstrated that azoles can block the synthesis of aromatase enzymes with important consequences on androgens and oestrogens homeostasis. Several studies have shown that conazole can disrupt the endocrine system [6] and alter reproduction [7] [8] or development [9] [10], especially in birds [11]. In these laboratory experiments, the impact of azoles were monitored but azoles concentrations were generally not quantified in animal tissues.

The occurrence of azoles in wildlife tissues is actually still poorly documented while few studies have investigated human exposure in agricultural workers' urine [12], hairs [13] [14] to assess their dermal exposure [15]. Free-living birds have been proved to be relevant bioindicators of environmental pollution [16] [17] and they could potentially provide useful information regarding the potential contamination of wild animals by triazole and imidazoles living in wide diversity of habitats. In order to minimize the stress of animals and to protect their physical integrity and for obvious ethical reasons, it is now recommended to use minimally invasive techniques to monitor the contamination of animals by pesticides. In that context, a growing number of studies rely on the collection of blood, hair or feathers samples [18]. It has already been demonstrated that blood is adequate to measure organic contaminants such as organochlorines [19] polyfluoroalkyl substances [20] or neonicotinoids pesticides [21], suggesting that azoles could also be measured in blood samples. Whatever the exposure pathway (dermal contact, inhalation or ingestion), contaminants are transported and distributed throughout the body via the blood. As half lives are shorter in this biological matrix, pollutant concentrations usually reflect the short term exposition [18]. Analytical extraction of blood can moreover be automated thanks to an on-line SPE system. Indeed, azoles as antifungal drug are usually measured in human plasma [22] [23] using on-line SPE with low intake volumes (20-100  $\mu$ L).

Azoles are always analysed with the high sensitivity and selectivity of Liquid Chromatography (LC) – in tandem Mass Spectrometry (MS/MS) system. The aim of this study is to develop a sensitive analytical method to quantify fungicides azoles in bird plasma using on-line SPE coupled to LC-MS/MS. The study species is the Eurasian Blackbird (*Turdus merula*) a common and widespread song bird. As most birds are relatively small biological models, the low available plasma volumes should allow the lowest possible LOQ. LOQ in  $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$  plasma are expected as already obtained for neonicotinoids pesticides with 50  $\mu$ L of songbird plasma [24].

More specifically, we report here the development and validation of on-line SPE coupled with LC-MS/MS method to quantify 16 azoles fungicides (14 triazoles and 2 imidazoles) and 3 Isotope-Labelled Internal Standards (ILISs) in bird plasma. Optimizations along the analytical

chain were developed starting with LC separation, then on-line SPE conditions and sample pretreatment (only 25  $\mu\text{L}$  plasma intake). Different parameters were tested in triplicate using model matrices (Milli-Q water and chicken plasma matrix supplemented with targeted pesticides). ILISs and plasma were weighed in order to calculate concentrations in  $\text{pg/g}$  by internal calibration. The methodology was then validated by checking LOQ, linearity range, accuracy and performance. Once all these assay performance metrics were recorded, real bird samples were analysed. More specifically, azole concentrations of 33 blackbirds living in different habitats with different use of azole fungicides were analysed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and standards

Triazoles (difenoconazole, epoxiconazole, fenbuconazole, flusilazole, flutriafol, metconazole, penconazole, propiconazole, prothioconazole, tebuconazole, tetraconazole, triadimefon, triadimenol) and imidazoles (imazalil and prochloraz) were purchased from Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-La-Grande, France). Cyproconazole was acquired from Techlab (Saint-Julien-lès-Metz, France). All the compounds standards had high chemical purities ( $> 94.5\%$ ). ILIs: fenbuconazole d5, propiconazole d5, tebuconazole d6 were obtained from Cluzeau Info Labo Dr. Ehrenstorfer (Sainte-Foy-La-Grande, France). A stock solution containing the 16 native target compounds was prepared in methanol at  $2\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  and  $20\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  for the prothioconazole. Another stock solution with the 3 ILIs was also prepared in methanol at  $1\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . These solutions were stored at  $-20\ ^\circ\text{C}$  and allowed to reach room temperature before use.

Acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) with both HPLC grade quality were supplied by Atlantic Labo (Bruges, France). Ammonium acetate was from Atlantic Labo (Bruges, France) while ammonium formate from Agilent Technologies (Les Ulis, France). Acid formic was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Milli-Q grade water was prepared in the laboratory from a Milli-Q system (Millipore SA, St Quentin les Yvelines, France). Chicken plasma and other reference plasmas (bovine, cat, pig, rat) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

### 2.2. Consummables

1.5 mL click-fit microtubes were purchased from Dutscher (Brumath, France). 2 mL polypropylene centrifuges tubes with  $0.22\ \mu\text{m}$  nylon filter were obtained from Corning Incorporated (Salt Lake, USA).

### 2.3. Sample collection

From April to July 2016, during which triazoles and imidazoles were sprayed in vineyards (DRAAF 2019), 75 blackbirds were captured by using mist-nets in the Region of Nouvelle-Aquitaine, France. Blackbirds were sampled in three different habitats that vary in the use of triazoles and imidazole: city parks in the town of Niort, forest and woodlands located in the Chizé forest and vineyards in the Cognac area. Following capture, a small blood sample was taken from the alar vein with a needle and heparinized capillary tubes (200-600  $\mu\text{L}$ ).

Blackbirds were ringed with plastic rings to avoid recapture and resampling of the same individuals. The birds were immediately released after blood collection. Blood samples were stored in a cooler in the field. After centrifugation in the laboratory, plasma was collected and stored at  $-20\ ^\circ\text{C}$  until further analysis.

## 2.4. Sample preparation

Into 1.5 mL microtube, 25  $\mu\text{L}$  of quality control (chicken plasma) or plasma sample were weighed. 30  $\mu\text{L}$  of ILIS solution was added under gravimetric control (1  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  prepared in the precipitation solvent acetonitrile). More selected precipitation solvent was added to have 150  $\mu\text{L}$  solvent in total.

After a simple centrifugation step (14,000 g for 10 minutes), the supernatant was transferred to 2 mL LC-MS glass vials and diluted with 1025  $\mu\text{L}$  of Milli-Q water. The extracts final volume was 1200  $\mu\text{L}$ .

An intermediate filtration step can be performed before adding the water. The supernatant was then transferred to 2 mL centrifuge tubes with 0.22  $\mu\text{m}$  nylon filter. Filtration was carried out by centrifugation for 3 minutes at 7,000 g.

If the analysis was performed later, extracts were stored in vials at  $-20^{\circ}\text{C}$  and Milli-Q water was then added just before analysis.

## 2.5. Instrumental conditions

Analytes were analysed by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) using an Agilent 1290 Infinity LC system combined with an Agilent 6490 Triple Quad mass spectrometer. Sample enrichment was achieved by on-line Solid-Phase Extraction (SPE) platform composed by a 1260 Infinity ALS as autosampler, 1260 Infinity quaternary pump, 1200 switch valve and a 1200 on-line SPE column support with 6 positions selection valve. All these modules were controlled via the Agilent Mass Hunter software.

Extract was loaded during few minutes onto a cartridge at  $1000\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  with Milli-Q water as eluent. Three on-line SPE cartridges were tested: Poroshell 120 SB C18 guard column (5 mm length x 2.1 mm internal diameter, 2.7  $\mu\text{m}$  particle size) (Agilent), PLEXA (12.5 mm x 2.1 mm) (Agilent), OASIS HLB home made with holder (20 mm x 2.1 mm) (BGB Analytic) of Oasis HLB phase (Waters, 25-35  $\mu\text{m}$  particle size). Homemade cartridge have 20 mg phase and around 10 mg for others cartridges. Between each load, cartridge is washed for 1 min with acetonitrile and then equilibrated with water during 3.5 min.

Analytes were then eluted in backflush mode with the mobile phase onto the analytical column. The chromatographic separation was performed on a chromatographic column preceded by a Poroshell 120 SB-C18 guard column (5 mm x 2.1 mm x 2.7  $\mu\text{m}$ ) which both are kept at  $35^{\circ}\text{C}$ . Three analytical columns were tested: Kinetex C18 (100 mm x 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex), Poroshell Phenyl-Hexyl column (100 mm x 2.1 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ) (Agilent) and Poroshell 120 SB-C18 (100 mm x 2.1 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ) (Agilent).

Water with 5 mM buffer solution (ammonium acetate or ammonium formate) plus 0.1 % acetic or formic acid (A) and methanol with 0.1 % acetic or formic acid (B) were used as the mobile phases. The solvent flow rate was  $0.3\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The mobile phase gradient program started at 100 % A then decrease to 0 % at 18 min, held for 0.5 min. The mobile phase returned to the initial composition at 19 min and equilibrated for another 3 min before the next injection.

The MS source was operated in positive electrospray mode (ESI+) to obtained  $[\text{M}+\text{H}]^{+}$  ion with different parameters exposed in Appendix, Table A1.

The data acquisition was in dynamic multiple reactions monitoring (dMRM) mode with a cycle time of 800 ms and a 2 minutes window. Two transitions at wide resolution were chosen for



each analytes: one for the quantification (TQ) and the second for the confirmation (TC). MS/MS transition conditions are summarized in Appendix, Table A2.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Optimization of LC-MS/MS parameters

##### MS parameters

The MS transitions were selected with a Flow Injection Analysis (FIA) of individual standard solutions. Once the two more abundant product ions from the main precursor ion were identified in ESI<sup>+</sup>, different mass parameters were optimised. First of all, collision energy (CE) were found thanks Optimizer Agilent Software. Optimal Cell Accelerated Voltage (CAV) in range 4 to 7 V (in 1 V increment) were selected regarding the best sensitivity for each transition in dMRM. CE and CAV values are shown in the A1 in Appendix.

##### Column chromatographic

To optimize chromatographic resolution, peak sharpness and signal intensity, a variety of LC analytical columns, including the Kinetex C18 and two Poroshell technology columns (C18 and Phenyl Hexyl) were evaluated. Poroshell technology allows equal performance to Kinetex technology by working at lower pressures, which is more compatible with on-line SPE system.

Sensitivities are slightly better with Poroshell Phenyl Hexyl column Fig. 1. C18 stationary phase is usually used to analyse triazoles by LC-MS/MS [12] [14] [15] [25] [26] [27] but the Poroshell Phenyl Hexyl phase is also suitable for the analysis of multiple pesticides including azoles [28].

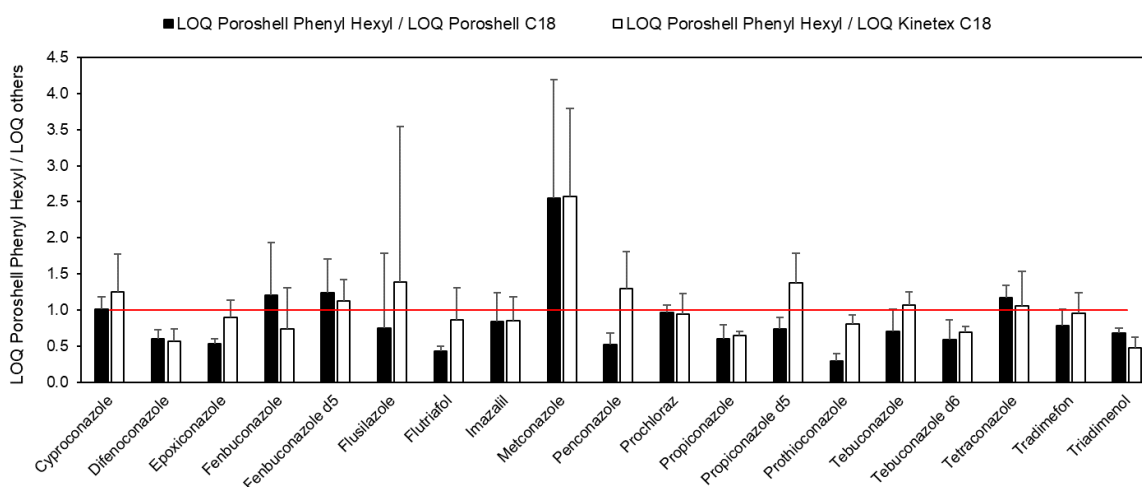


Fig. 1. Mean of extrapolated Limit of Quantification in pg injected with 3 injected volume (5, 40 and 100  $\mu$ L) for 3 chromatographic columns and standard deviation (n = 3).

This column was selected despite a co-elution of an interference with the internal standard fenbuconazole d5. The best resolution (1.1) between these two peaks is obtained with the elution ramp described in the material and method part.

### Mobile phase and flow rate

With 0.1 % acid formic in aqueous phase + 5 mM ammonium acetate as buffer: the pH obtained is around 3.2. Acid formic could promote the molecular ion formation  $[M+H]^+$  and then produce a higher signal. Increasing this percentage to 0.3 % causes a decrease in pH around 2.4. As most targeted molecules have a pKa close to 2 (0.7 to 6.9 range), they will be in ionic form at this pH. They will neither be completely retained by the different stationary phases nor ionized in the spectrometer. For the same reason, the extracts will not be acidified (pH = 6 without).

Two buffer solutions were also compared: ammonium formate and ammonium acetate both at 5 mM in aqueous phase. No significant differences were observed between them and ammonium acetate was kept although ammonium formate was generally used [23] [29] [30]. By increasing the phase flow rate from 0.3 mL.min<sup>-1</sup> to 0.5 mL.min<sup>-1</sup>, the background noise was on average 2.5-fold higher for all targeted azoles with 30 % signal loss. 0.3 mL.min<sup>-1</sup> was the selected flow rate.

### 3.2. Analytical method optimization SPE on line

On-line SPE was connected upstream the LC-MS/MS system and allowed an automatic concentration and purification of the extracts. Sensitivities of three cartridges made up of different sorbents were compared in Fig. 2.

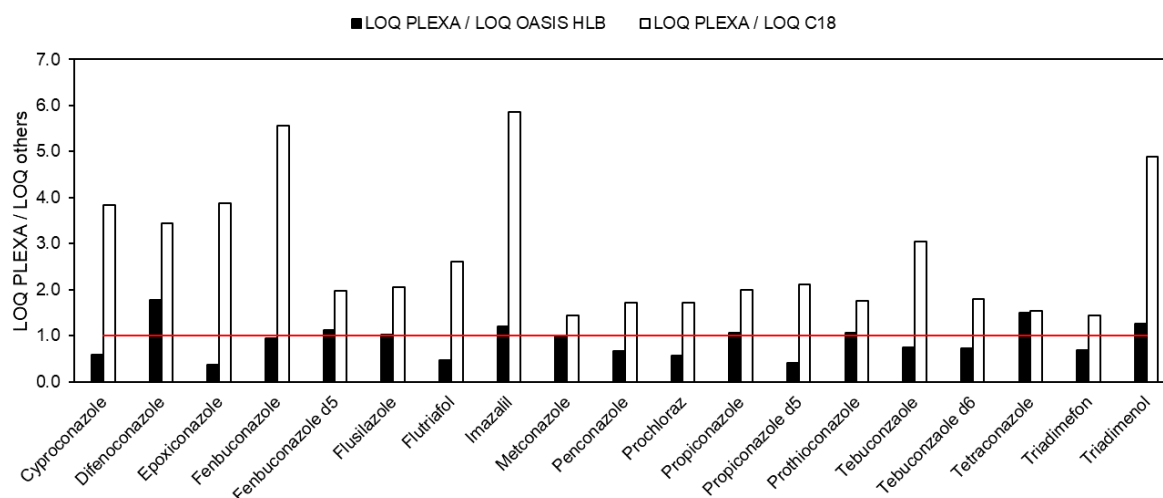


Fig. 2. Effect of on-line SPE cartridge on sensitivities. PLEXA cartridge compared with OASIS HLB sorbent. PLEXA cartridge compared with C18 sorbent.

Difference between PLEXA and homemade Oasis HLB cartridges were first evaluated [23] [29]. LOQ obtained with PLEXA sorbent were slightly better. This phase was moreover used by Agilent in off-line SPE to extract antifungal triazoles in human plasma [31]. PLEXA was then compared with the C18 guard column applied as cartridge. LOQ generated with C18 guard column were two times up to six times lower. This significant improvement was achieved thanks to thinner chromatographic peaks making an increase in signal. This guard column C18 was then the selected cartridge.

A final extract volume of 1200  $\mu\text{L}$  was obtained. The injection loop can load up to 900  $\mu\text{L}$ . Four injection volumes of a 0.05  $\mu\text{g.L}^{-1}$  in Milli-Q water with 12.5 % of acetonitrile (ACN)

( $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for prothioconazole) were tested with the selected cartridge C18 guard column:  $100 \mu\text{L}$ ,  $300 \mu\text{L}$ ,  $600 \mu\text{L}$  and  $900 \mu\text{L}$ . Signals were linear to injected volume up to  $600 \mu\text{L}$ . Moreover, as the background noise increased with injected volume, the extrapolated LOQ were not linear with volume as shown in Fig.3. An extension seat capillary could be added in order to load all the  $1200 \mu\text{L}$  extracts volume. As no significant enhancement was observed by loading  $900 \mu\text{L}$  compared to  $600 \mu\text{L}$  explained of the non-proportionality plus the noise increasing: it is therefore unnecessary to install this extension. To conclude:  $600 \mu\text{L}$  was the best compromise between sensitivity and remaining volume in the case of analytic problem with  $600 \mu\text{L}$  available to reinject the extract.

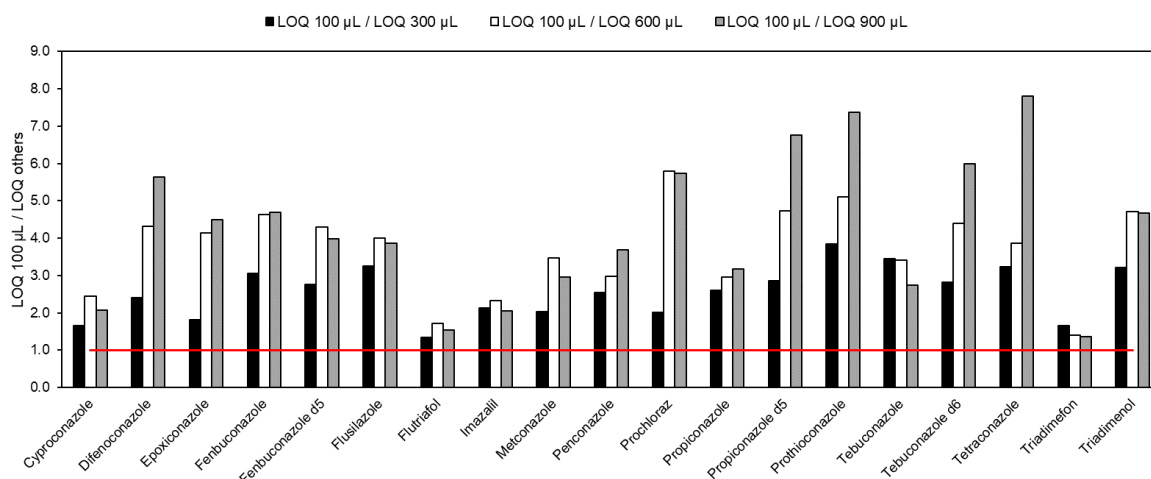


Fig.3. Injection volume influence on sensitivities ( $n = 3$  for each volume). LOQ are normalized to  $100 \mu\text{L}$  injected LOQ.

$600 \mu\text{L}$  were loaded at  $1000 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , a minimum of 0.6 minute wait was needed. The loading time was optimized and different values were tested from 1 minute to 10 minutes wait with 1 minute step. Sensitivity compromise including all molecules was obtained with 2 minutes according to Fig.4. Time wait during loading should not be too long with a risk of loss. As off-line, on-line cartridges have retention capacities and leakage volume to evaluate.  $500 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  as loading speed was also tested and the sensitivity was equal to  $1000 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . The loading speed  $1000 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  was kept to homogenise the value with the flow rate loading eluent.

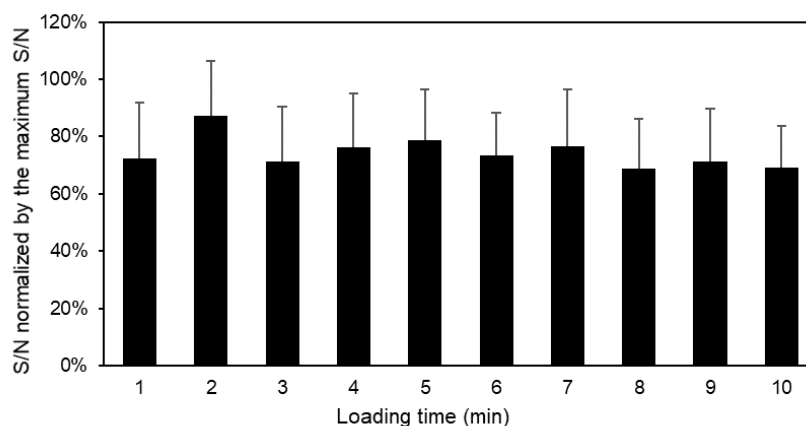


Fig.4. Influence of loading time wait on sensitivities. Average made all compounds including of normalized S/N ratio by the maximum value. Errors bars indicates standard deviation ( $n = 16$  for the molecules).

### 3.3. Preparation method optimization

Acetonitrile (ACN) [20] [30] [32] [33] [34] [35] [36] or methanol (MeOH) [23] [37] [38] are generally used to precipitate plasma proteins. Both were compared with 25  $\mu\text{L}$  non-spiked chicken plasma in triplicate. No significant difference was observed when divided the ACN-treated sample background noise by methanol noise:  $109 \pm 26\%$  for all molecules and replicate included. Generated signals were marginally higher with ACN when comparing with 0.1 ng/g solution prepared in Milli-Q water with 12.5 % of solvent. The influence of ACN percentage solvent in the extract was also studied while having a ratio solvent by plasma around 4 to ensure protein precipitation. For some molecules in Fig.5., the peak area decreased when the ACN percentage increased certainly due to non-retention within the cartridge.

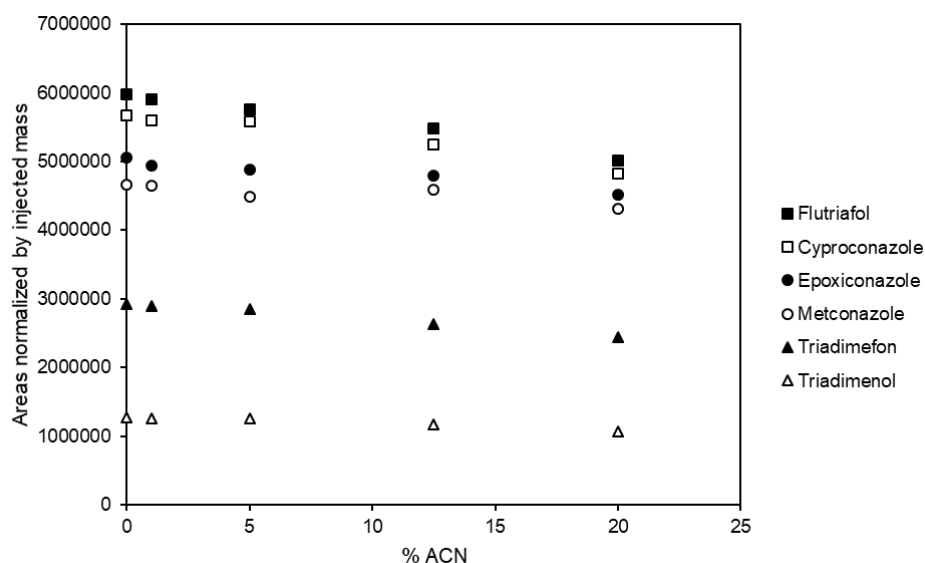


Fig.5. Influence of acetonitrile percentage in extract on normalized areas by injected mass for 6 compounds. Solutions were prepared in Milli-Q water. Errors bars indicates standard deviation ( $n = 3$ ).

In this method, with 150  $\mu\text{L}$  of ACN for 25  $\mu\text{L}$  of plasma diluted in 1200  $\mu\text{L}$  Milli-Q water: the ratio solvent by plasma was 6 with 12.5% of ACN in total.

Once centrifugation step conducted to precipitate protein, an additional filtration step could be added to avoid overpressure when loading on the SPE cartridge. Tests were conducted in both Milli-Q water and chicken plasma spiked at 1500 pg.g<sup>-1</sup> plasma and 15000 for prothioconazole. For all molecules without exception, non-filtered LOQ were lower than filtered LOQ explained by the signals as reported in Fig.6. The nylon filter was retaining molecules. As pressure was stable with the injection of non-filtered extracts, samples were not prepared with the filtration step.

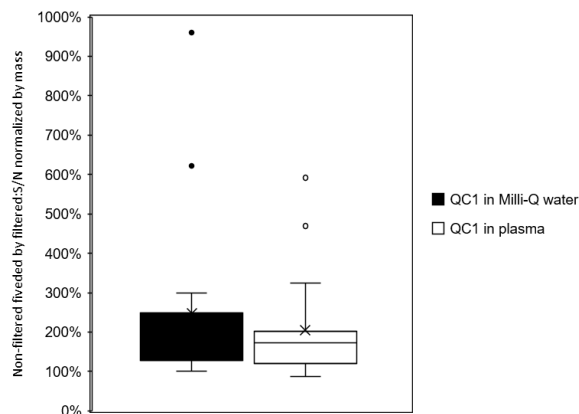


Fig.6. Influence of filtration on normalized signals by background noise for all molecules in Milli-Q water and plasma both spiked at QC1 (1500 pg.g<sup>-1</sup> plasma and 15000 for prothioconazole).

### 3.4. Method validation

#### Sensitivity and linearity range in Milli-Q water

There is a specific sensitivity for the LC-MS/MS system in direct injection and another by coupling the on-line SPE upstream (Table 1). Four criteria are required to qualify the LOQ. First, the compound signal (S) in TQ could be differentiated in the matrix signal (N) with a S/N ratio higher than 9. Calculated recoveries in internal calibration must be equal to 100 %  $\pm$  60 %. A margin of error of 60 % was permitted for the TQ/TC ratio comparing with the quality control. Moreover, the point must be included in the linearity range. Linearity ranges are checked with linear function as  $y = ax$  depending on TQ peak areas.

Finally, LOQ obtained in direct injection with 6490 or 6495B mass spectrometers are included between 0.02 and 0.5 injected pg for the main azoles. The two molecules with the least sensitive quantification transitions have LOQ of 2.50 for triadimefon and 7.00 injected pg for prothioconazole. All correlation coefficient ( $R^2$ ) are higher than 0.99.

Regarding on-line SPE, LOQ are almost equals to direct injection except for imazalil, prochloraz and prothioconazole. Correlation coefficients of affine curves are between 0.9 and 0.99 for only 3 molecules and higher 0.99 for the rest.

**Table 1**

System sensitivities and linearity ranges for direct injection with 5  $\mu\text{L}$  injected and for on-line SPE with 600  $\mu\text{L}$  injected. Concentrations (LOQ and the range) are expressed in pg injected and azole solutions are prepared in Milli-Q water

	Direct injection				On-line SPE			
	LOQ	Linearity range (number of levels in triplicate)	Slope	R <sup>2</sup>	LOQ	Linearity range (number of levels in triplicate)	Slope	R <sup>2</sup>
Cyproconazole	0.06	0.03-30 (12)	15155	0.9997	0.08	0.04-28 (10)	12924	0.9998
Difenoconazole	0.3	0.3-30 (8)	11185	0.9993	1	0.05-36 (10)	5360	0.9900
Epoxiconazole	0.07	0.07-35 (11)	13840	0.9969	0.05	0.05-33 (10)	10959	0.9999
Fenbuconazole	0.7	0.7-30 (6)	5836	0.9936	0.5	0.09-33 (9)	3825	0.9958
Flusilazole	0.7	0.7-30 (6)	17163	0.9993	0.8	0.04-32 (10)	11898	0.9955
Flutriafol	0.03	0.01-25 (15)	13484	0.9998	0.03	0.03-24 (10)	11788	0.9998
Imazalil	0.6	0.6-25 (6)	13889	0.9960	8	0.4-29 (6)	11442	0.9627
Metconazole	0.3	0.3-35 (9)	14194	0.9953	0.8	0.04-32 (10)	11124	0.9989
Penconazole	0.07	0.04-35 (12)	16505	0.9958	0.4	0.05-33 (10)	12937	0.9992
Prochloraz	0.7	0.4-30 (7)	10978	0.9985	3.4	0.89-23 (4)	4765	0.9930
Propiconazole	0.2	0.2-20 (8)	8707	0.9963	0.4	0.05-16 (9)	6401	0.9982
Prothioconazole	6.6	6.6-250 (6)	134	0.9960	30	31.4-307 (4)	62	0.9735
Tebuconazole	0.3	0.3-35 (9)	12766	0.9968	0.2	0.21-31 (8)	10330	0.9992
Tetraconazole	0.7	0.7-30 (6)	4181	0.9986	0.9	0.37-34 (7)	3166	0.9947
Triadimefon	0.3	0.3-40 (9)	6728	0.9995	0.3	0.11-38 (9)	5470	0.9997
Triadimenol	0.3	0.3-30 (8)	2485	0.9999	0.3	0.1-37 (9)	2198	0.9994

Sensitivity and linearity range in plasma matrix

Method performance in matrix plasma were evaluated with the whole protocol. Spiked chicken plasma was used to check the linearity with a minimum of three concentrations made in triplicate. Linearity range were calculated with the linear regression  $y = ax$  (Table 2) by internal calibration.

**Table 2**

Method sensitivity and linearity range obtained with spiked chicken plasma with 600  $\mu\text{L}$  injected. Concentrations are expressed in  $\text{pg.g}^{-1}$  plasma.

	LOQ	Linearity range (number of levels in triplicate)	Slope	R <sup>2</sup>
Cyproconazole	20	5-100000 (8)	1.34	0.9937
Difenoconazole	10	10-100000 (8)	0.60	0.9978
Epoxiconazole	160	160-100000 (4)	0.51	0.9974
Fenbuconazole	30	25-100000 (6)	1.08	0.9950
Flusilazole	10	10-100000 (8)	0.85	0.9766
Flutriafol	400	10-80000 (6)	0.80	0.9963
Imazalil	400	100-100000 (5)	0.44	0.9971
Metconazole	30	20-100000 (6)	0.78	0.9974
Penconazole	25	15-100000 (7)	0.75	0.9957
Prochloraz	25	25-100000 (6)	1.18	0.9993
Propiconazole	200	50-60000 (5)	1.61	0.9939
Prothioconazole	5000	5000-1000000 (4)	61.98	0.9879
Tebuconazole	25	20-100000 (6)	1.08	0.9954
Tetraconazole	20	20-100000 (6)	2.24	0.9968
Triadimefon	150	25-100000 (6)	1.75	0.9951
Triadimenol	1500	100-100000 (5)	3.72	0.9979

The same criteria were required to set the LOQ In matrix plasma, the TQ/TC criteria is the distinctive criterion because some interferences were present in the TC as shown with triadimenol example in Fig.7. The same difficulty with triadimenol TC sensibility was observed in literature [39]. Although areas were linear on the TQ, LOQ were increased.

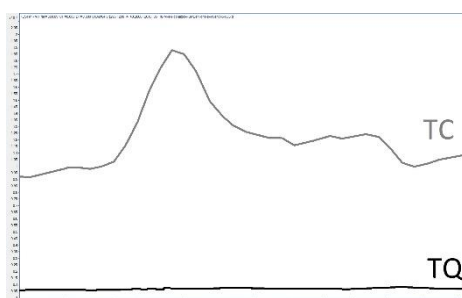


Fig.7. Triadimenol TQ (Quantification Transition) and TC (Confirmation Transition) for a blank protocol plasma

LOQ expressed in  $\text{pg.g}^{-1}$  plasma were ranged between 10 to 1500. Prothioconazole transitions were still the least sensitive and induced a LOQ at 5000  $\text{pg.g}^{-1}$  plasma. These LOQ can't be compared to another study because azoles as pesticides were never be analysed in plasma matrix. However, azoles as drugs have been analysed in plasma with less sensitive methods because individuals have been deliberately exposed within laboratory experiments [23] [36] [38]. Other molecules were previously developed in plasma and azoles were analysed in other matrixes as water or wine (Table 3 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). LOQ were similar comparing to other molecules analysed in plasma with low intake volume. Better azoles LOQ were obtained in water thanks high sample size with a matrix less complex.

**Table 3**

LOQ comparison of the present method in on line SPE with previously reported direct injection or on line SPE methods

Molécules	Matrix	Sample size (µL)	Analytical instrument	LOQ range		Reference
				Direct injection	On line SPE	
PFAS	Plasma	25	LC-MS/MS	-	3-100 <sup>1</sup>	[20]
PCB	Plasma	100	LC/TOF-MS	-	20-500 <sup>2</sup>	[40]
Neonicotinoid	Plasma	50	LC-MS/MS	2.3-177.7 <sup>2</sup> *	-	[24]
Neonicotinoid	Plasma	500	LC-MS/MS	2000-10000 <sup>2</sup>	-	[21]
Neonicotinoid	Plasma	20-50	LC-MS/MS	210 <sup>2</sup>	-	[41]
Neonicotinoid	Blood	100	LC-MS/MS	0.6-39 <sup>2</sup>	-	[42]
Neonicotinoid	Water	2000	LC-MS/MS	-	0.3-3 <sup>2</sup>	[43]
Azoles	Water	50000	LC-MS/MS	10-300 <sup>1</sup>	-	[27]
Pesticides including azoles	Water	5000	LC-HRMS	-	0.1-0.5 <sup>2</sup>	[44]
Azoles	Wine	10	LC-MS/MS	250-7500 <sup>2</sup>	-	[39]
Pesticides including azoles	Wine	2500	GC-MS/MS	-	30-100 <sup>1</sup> * (SPME)	[45]
Pesticides including azoles	Wine	2	GC-MS	940-960 <sup>1</sup>	-	[46]
Azoles	Plasma	25	LC-MS/MS	-	10-5000 <sup>1</sup>	Present study

<sup>1</sup> LOQ expressed in pg.g<sup>-1</sup> ; <sup>2</sup> LOQ expressed in pg.mL<sup>-1</sup> ; \*LOD instead of LOQ, SPME: Solid Phase Micro Extraction

#### Accuracy and method performance

Three-day triplicates were performed to evaluate the repeatability and accuracy at LOQ (in Milli-Q water, spiked pooled blackbird plasma previously analysed and proven without azole detected) and at higher concentration call Quality Control 1 (QC1) around 1500 pg.g<sup>-1</sup> plasma and 15000 pg.g<sup>-1</sup> plasma for prothioconazole (in spiked chicken plasma). Intraday and interday precision was also tested with areal blackbird sample. All these results are shown in Table 4. Recoveries were approached 100 % by varying between 64 and 149 % for LOQ in spiked blackbird plasma and between 77 and 141 % for QC1. Regarding variation coefficient, they were no higher than 54 % in spiked matrix and 29 % in real sample with the low concentration calculated. No significant differences were observed between intraday and interday analysis.



**Table 4**

Intraday and interday average recoveries (Avg Rec) and coefficients of variation (CV) for azoles in plasma (pool of blackbird plasma, chicken plasma or blackbird sample). Blackbird plasma spiked at LOQ for each compounds. Chicken plasma spiked at QC1 (1500 pg.g<sup>-1</sup> plasma except for prothioconazole at 15000 pg.g<sup>-1</sup> plasma).

Compounds	Intraday								Interday								
	Milli-Q water spiked at LOQ (n = 3)		Blackbird plasma spiked at LOQ (n = 3)		QC1 in spiked chicken plasma (n = 3)		Blackbird sample (n = 3)		Milli-Q water spiked at LOQ (n = 9)		Blackbird plasma spiked at LOQ (n = 9)		QC1 in spiked chicken plasma (n = 9)		Blackbird sample (n = 3)		
	Avg Rec (%)	CV (%)	Avg Rec (%)	CV (%)	Avg Rec (%)	CV (%)	Mean concentration calculated (pg.g <sup>-1</sup> plasma)	CV (%)	Avg Rec (%)	CV (%)	Avg Rec (%)	CV (%)	Avg Rec (%)	CV (%)	Avg Rec (%)	CV (%)	Mean concentration calculated (pg.g <sup>-1</sup> plasma)
Cyproconazole	114	2	126	10	89	6	< LOQ		92	10	139	12	92	10		< LOQ	
Difenoconazole	100	8	87	54	141	9	32.5 ± 8.2	25	120	21	99	29	120	21		32.2 ± 3.8	12
Epoxiconazole	99	2	136	18	110	30	< LOQ		117	13	137	12	117	13		< LOQ	
Fenbuconazole	99	2	72	18	106	2	39.8 ± 5.6	14	101	6	89	19	101	6		28.8 ± 8.3	29
Flusilazole	118	12	82	16	89	6	< LOQ		81	24	77	11	81	24		< LOQ	
Flutriafol	91	1	71	9	89	4	< LOQ		91	12	81	16	91	12		< LOQ	
Imazalil	105	3	78	12	98	7	< LOQ		93	9	92	22	93	9		< LOQ	
Metconazole	111	5	122	12	95	4	< LOQ		101	10	119	17	101	10		< LOQ	
Penconazole	96	11	106	7	77	10	< LOQ		83	17	101	8	83	17		< LOQ	
Prochloraz	92	3	64	9	93	16	< LOQ		99	33	80	18	99	33		< LOQ	
Propiconazole	71	1	76	13	103	3	< LOQ		100	5	76	9	100	5		< LOQ	
Prothioconazole	41	5	64	12	90	14	< LOQ		121	33	152	49	121	33		< LOQ	
Tebuconazole	106	11	149	23	108	8	89.1 ± 8.0	9	101	7	145	14	101	7		101.7 ± 14.2	14
Tetraconazole	137	6	141	18	86	3	1437.0 ± 25.5	2	148	12	134	26	93	14		1558.0 ± 130.7	8
Triadimefon	109	2	108	16	97	2	< LOQ		97	12	107	12	97	12		< LOQ	
Triadimenol	95	2	78	13	88	5	< LOQ		94	10	99	24	94	10		< LOQ	

### Stability and conservation

Conservation was evaluated in order to analyse a large number of samples. QC1 in spiked chicken plasma with internal standards after the centrifugation step were stored for several months and Milli-Q water was added just before the analysis. After 2 months and 6 months of storage, the potential analyte loss was compared to a present preparation analysis ( $n = 3$  each). No influence of the storage time was detected up to 6 months at this concentration as shown in Fig. 8. Areas normalized to compounds mass were stable and recoveries were similar to those prepared the day of the analysis.

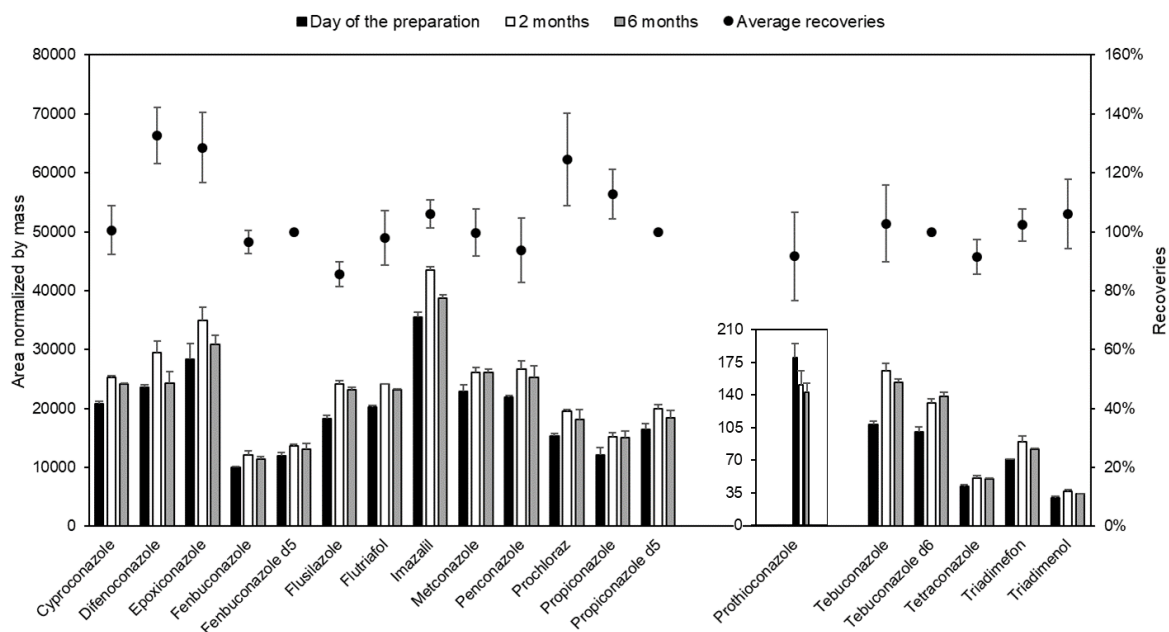


Fig.8. Diagram of the normalized areas for the injection on the day of the preparation and for two period of storage (2 months and 6 months) on the left axis. Average of all recoveries on the right axis. Errors bars indicate standard errors ( $n = 3$ ).

### Matrix effect

Evaluation of the matrix effect was realised by spiking different animal plasma at 3 times the LOQ for most compounds. Blackbird and common toad plasma (both prepared with pool of real sample without azoles detected) and bovin, cat and rat plasma (from bought reference) were spiked in triplicate. Concentration biases and recoveries coefficient of variation were calculated and they are noted in the Table 5. Concentration bias for all tested animals were 80 % in absolute value. The molecule with the maximum concentration bias was flusilazole with - 49 % concentration bias in average.

**Table 5**

Evaluation of the matrix effect. Spiked concentration for most of molecules refers to 3 times LOQ. Bias was calculated with the concentration quantified. CV (Coefficient of Variation) was based on recoveries. n = 3 for each plasma animal.

Compounds	Blackbird		Bovin		Cat		Chicken		Common toad		Pig		Rat	
	Conc bias (%)	Rec CV (%)	Conc bias (%)	Rec CV (%)	Conc bias (%)	Rec CV (%)	Conc bias (%)	Rec CV (%)	Conc bias (%)	Rec CV (%)	Conc bias (%)	Rec CV (%)	Conc bias (%)	Rec CV (%)
Cyproconazole	44	13	0	11	-25	11	-7	21	-2	19	80	29	-4	12
Difenoconazole	8	2	-6	9	-8	3	-1	8	-19	4	-41	3	-35	8
Epoxiconazole	29	9	-37	6	-23	18	1	16	-11	10	-40	4	29	39
Fenbuconazole	-6	5	3	14	22	4	73	8	17	8	0	4	-16	5
Flusilazole	-41	23	-47	30	-29	14	-50	6	-38	17	-68	20	-55	16
Flutriafol	-15	18	6	12	-31	11	-10	8	-24	3	7	3	-19	2
Imazalil	0	17	62	4	-52	21	-9	16	-8	5	40	4	15	1
Metconazole	38	22	-37	3	-31	5	-15	14	-43	1	2	5	13	17
Penconazole	-30	22	18	12	-17	11	-6	16	-6	7	22	3	-10	8
Prochloraz	-54	28	24	6	-19	12	-1	22	-11	12	20	8	-38	5
Propiconazole	-29	9	-36	3	-38	7	-40	5	-45	1	-43	0	-38	4
Prothioconazole	6	39	-48	14	-18	12	33	24	-21	19	-70	7	-57	15
Tebuconazole	17	5	-28	22	-21	5	-38	12	-23	13	-26	15	-25	9
Tetraconazole	7	3	-26	16	-11	12	3	16	11	28	-23	9	7	17
Triadimefon	33	20	-32	6	5	13	-13	6	-24	2	-13	6	15	29
Triadimenol	15	20	9	5	-2	14	0	12	-2	8	46	7	-7	11

### 3.5. Evaluation of triazole exposure

Optimized and validated method for on-line SPE coupled with LC-MS/MS was applied to analyse the 16 azoles in the blackbird plasmas collected in 2016. Sample extracts were included within a sequence comprising several quality controls. The potential system contamination or generated during analytical preparation were known. System performance, response factor for each molecules and extraction recoveries were checked. Then, sample concentrations were calculated by internal calibration knowing the response factor and were expressed in  $\text{pg.g}^{-1}$  plasma. An overview of obtained results with 11 samples for each habitat (forests, city parks, vineyards) collected in June or July are shown in Fig.9. Tetraconazole (11/11), tebuconazole (9/11), fenbuconazole (7/11), difenoconazole (8/11) and epoxiconazole (1/11) were the detected molecules in plasma from vineyards with higher concentrations than those found in the two control sites. Tebuconazole was also quantified in 53 % of the wine selected all around the world [39]. In vineyards, concentrations were in the range of  $120 \text{ pg.g}^{-1}$  plasma up to  $8.7 \text{ ng.g}^{-1}$  plasma for the tetraconazole. No molecules were quantified in these 11 forest samples. However, in April/May, few molecules were detected and quantified in all three habitats. Whatever the site and the catching period, some molecules were never detected with the method limits as cyproconazole, flusilazole, flutriafol, penconazole, prochloraz, propiconazole, prothioconazole, triadimefon and triadimenol.

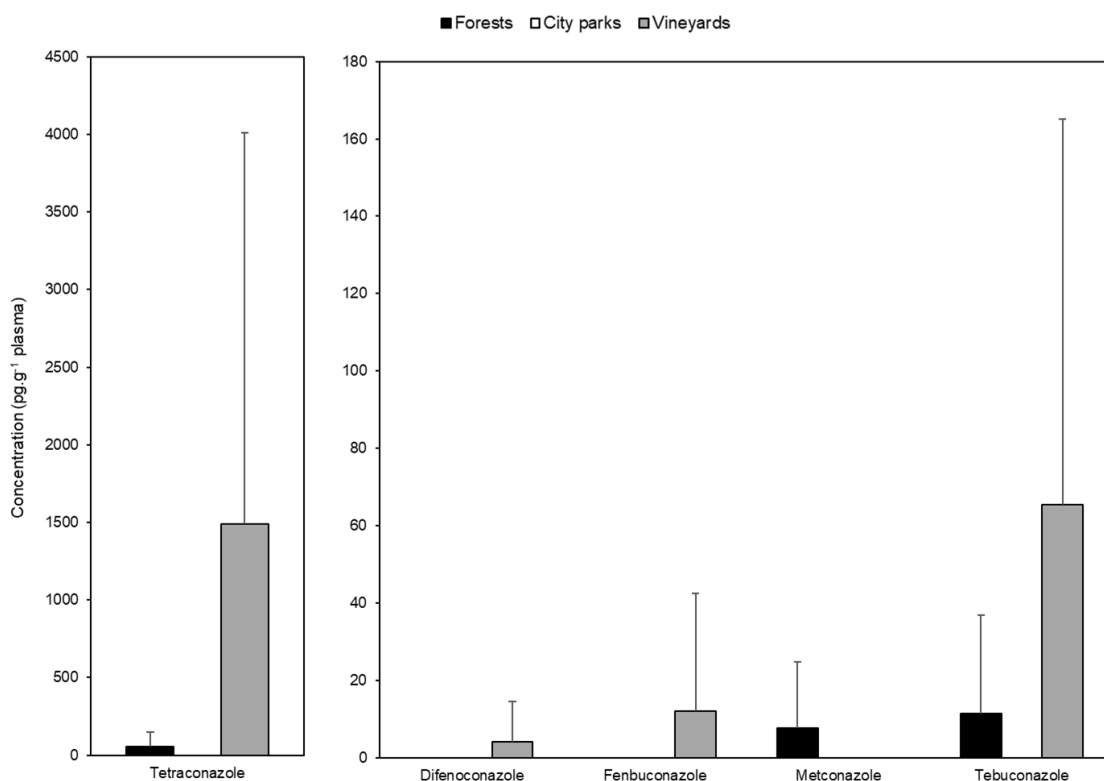


Fig.9. Average azoles concentrations ( $\text{pg.g}^{-1}$  plasma) quantified in blackbird plasma sampled in forests, city parks, vineyards in June-July 2016. Errors bars indicate standard deviation ( $n = 11$ ).

#### **4. Conclusion**

A rapid and sensitive analytical method was developed, optimised and then validated for the determination of 16 azoles in plasma samples at low levels. The on-line extraction coupling with LC-MS/MS provides LOQ in the range of 10 to 1500 pg.g<sup>-1</sup> plasma for the main compounds with only 25 µL intake plasma volume. This method was successfully used for free-living bird plasma samples from different habitats and revealed significant exposure to key azoles for blackbirds living in vineyards from Nouvelle Aquitaine, South Western France. The present method may also be transposed to more pesticides or adapted to other smaller free-living avertebrates.

#### **Acknowledgments**

This work was funded by the Région Nouvelle-Aquitaine located in France (MULTISTRESS project to O. Chastel), the EC2CO Ecodyn 2016 program (to F. Angelier), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE02-0004-01 to F. Angelier, and ANR-120-CE34-0008 to F. Angelier) and the Bioditox ANSES project (2019-1-031 to F. Brischoux). This study has been carried out in the framework of Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45) within the PhytoCOTE project. We thank Jean-Claude Barbraud, Jacques Chambaud, Rolland Seguin the Mairie de Niort, and the office National des Forêts (ONF) for facilitating access to the vineyards and Christophe Barbraud for comments on a previous version of the manuscript.

#### **Appendix A. Supplementary**

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at

## References

- [1] M. Simonovici, Enquête Pratiques phytosanitaires en viticulture en 2016, (n.d.) 50.
- [2] J.A. Zarn, B.J. Brüschweiler, J.R. Schlatter, Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14  $\alpha$ -demethylase and aromatase., *Environmental Health Perspectives*. 111 (2003) 255–261. <https://doi.org/10.1289/ehp.5785>.
- [3] M. Stromstedt, D. Rozman, M.R. Waterman, The Ubiquitously Expressed Human CYP51 Encodes Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase, a Cytochrome P450 Whose Expression Is Regulated by Oxysterols, (n.d.) 9.
- [4] N. Debeljak, S. Horvat, K. Vouk, M. Lee, D. Rozman, Characterization of the Mouse Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51), a New Member of the Evolutionarily Most Conserved Cytochrome P450 Family, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 379 (2000) 37–45. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1859>.
- [5] M. Kojima, T. Tagami, M. Degawa, Cloning of chicken lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) cDNA: Discovery of a testis-specific CYP51 transcript, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 145 (2006) 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.07.012>.
- [6] C. Taxvig, A.M. Vinggaard, U. Hass, M. Axelstad, S. Metzdorff, C. Nellemann, Endocrine-disrupting properties in vivo of widely used azole fungicides, *International Journal of Andrology*. 31 (2008) 170–177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00838.x>.
- [7] M.J.E. Roelofs, A.R. Temming, A.H. Piersma, M. van den Berg, M.B.M. van Duursen, Conazole fungicides inhibit Leydig cell testosterone secretion and androgen receptor activation in vitro, *Toxicology Reports*. 1 (2014) 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.05.006>.
- [8] A.K. Goetz, H. Ren, J.E. Schmid, C.R. Blystone, I. Thillainadarajah, D.S. Best, H.P. Nichols, L.F. Strader, D.C. Wolf, M.G. Narotsky, J.C. Rockett, D.J. Dix, Disruption of Testosterone Homeostasis as a Mode of Action for the Reproductive Toxicity of Triazole Fungicides in the Male Rat, *Toxicological Sciences*. 95 (2007) 227–239. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl124>.
- [9] S.A.B. Hermsen, T.E. Pronk, E.-J. van den Brandhof, L.T.M. van der Ven, A.H. Piersma, Triazole-induced gene expression changes in the zebrafish embryo, *Reproductive Toxicology*. 34 (2012) 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.05.093>.
- [10] J.F. Robinson, E.C.M. Tonk, A. Verhoef, A.H. Piersma, Triazole induced concentration-related gene signatures in rat whole embryo culture, *Reproductive Toxicology*. 34 (2012) 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.05.088>.
- [11] A.K. Saxena, J. Devillers, S.S. Bhunia, E. Bro, Modelling inhibition of avian aromatase by azole pesticides, SAR and QSAR in *Environmental Research*. 26 (2015) 757–782. <https://doi.org/10.1080/1062936X.2015.1090749>.
- [12] S. Fustinoni, R. Mercadante, E. Polledri, F.M. Rubino, S. Mandic-Rajcevic, G. Vianello, C. Colosio, A. Moretto, Biological monitoring of exposure to tebuconazole in winegrowers, *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*. 24 (2014) 643–649. <https://doi.org/10.1038/jes.2014.14>.
- [13] C. Schummer, G. Salquère, O. Briand, M. Millet, B.M.R. Appenzeller, Determination of farm workers' exposure to pesticides by hair analysis, *Toxicology Letters*. 210 (2012) 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.019>.
- [14] R. Mercadante, E. Polledri, A. Moretto, S. Fustinoni, Long-term occupational and environmental exposure to penconazole and tebuconazole by hair biomonitoring, *Toxicology Letters*. 298 (2018) 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.06.002>.

- [15] R. Mercadante, E. Polledri, F.M. Rubino, S. Mandic-Rajcevic, A. Vaiani, C. Colosio, A. Moretto, S. Fustinoni, Assessment of penconazole exposure in winegrowers using urinary biomarkers, *Environmental Research*. 168 (2019) 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.09.013>.
- [16] E.A. Francis, Paramount Roles of Wild Birds as Bioindicators of Contamination, *International International Journal of Avian & Wildlife Biology*. 2 (2017). <https://doi.org/10.15406/ijawb.2017.02.00041>.
- [17] E. Alleva, N. Francia, M. Pandolfi, A.M. De Marinis, F. Chiarotti, D. Santucci, Organochlorine and Heavy-Metal Contaminants in Wild Mammals and Birds of Urbino-Pesaro Province, Italy: An Analytic Overview for Potential Bioindicators, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 51 (2006) 123–134. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0218-1>.
- [18] S. Espín, A.J. García-Fernández, D. Herzke, R.F. Shore, B. van Hattum, E. Martínez-López, M. Coeurdassier, I. Eulaers, C. Fritsch, P. Gómez-Ramírez, V.L.B. Jaspers, O. Krone, G. Duke, B. Helander, R. Mateo, P. Movalli, C. Sonne, N.W. van den Brink, Tracking pan-continental trends in environmental contamination using sentinel raptors—what types of samples should we use?, *Ecotoxicology*. 25 (2016) 777–801. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1636-8>.
- [19] J.O. Bustnes, B.-J. Bårdsen, B. Moe, D. Herzke, S.A. Hanssen, K. Sagerup, C. Bech, T. Nordstad, O. Chastel, S. Tartu, G.W. Gabrielsen, Temporal variation in circulating concentrations of organochlorine pollutants in a pelagic seabird breeding in the high Arctic: Organochlorines in a high arctic seabird, *Environ Toxicol Chem*. 36 (2017) 442–448. <https://doi.org/10.1002/etc.3560>.
- [20] G. Munoz, P. Labadie, E. Geneste, P. Pardon, S. Tartu, O. Chastel, H. Budzinski, Biomonitoring of fluoroalkylated substances in Antarctica seabird plasma: Development and validation of a fast and rugged method using on-line concentration liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 1513 (2017) 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.024>.
- [21] A. Taliansky-Chamudis, P. Gómez-Ramírez, M. León-Ortega, A.J. García-Fernández, Validation of a QuEChERS method for analysis of neonicotinoids in small volumes of blood and assessment of exposure in Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*) nestlings, *Science of The Total Environment*. 595 (2017) 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.246>.
- [22] L. Qu, J. Qian, P. Ma, Z. Yin, Utilizing online-dual-SPE-LC with HRMS for the simultaneous quantification of amphotericin B, fluconazole, and fluorocytosine in human plasma and cerebrospinal fluid, *Talanta*. 165 (2017) 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.052>.
- [23] K.Y. Beste, O. Burkhardt, V. Kaever, Rapid HPLC–MS/MS method for simultaneous quantitation of four routinely administered triazole antifungals in human plasma, *Clinica Chimica Acta*. 413 (2012) 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.09.042>.
- [24] C. Hao, M.L. Eng, F. Sun, C.A. Morrissey, Part-per-trillion LC-MS/MS determination of neonicotinoids in small volumes of songbird plasma, *Science of The Total Environment*. 644 (2018) 1080–1087. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.317>.
- [25] R.J. Van Meter, D.A. Glinski, T. Hong, M. Cyterski, W.M. Henderson, S.T. Purucker, Estimating terrestrial amphibian pesticide body burden through dermal exposure, *Environmental Pollution*. 193 (2014) 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.07.003>.
- [26] A. Blondel, B. Krings, N. Ducat, O. Pigeon, Validation of an analytical method for 1,2,4-triazole in soil using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry and monitoring of propiconazole degradation in a batch study, *Journal of*

- Chromatography A. 1562 (2018) 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.05.056>.
- [27] P.G. Schermerhorn, P.E. Golden, A.J. Krynitsky, W.M. Leimkuehler, Determination of 22 Triazole Compounds Including Parent Fungicides and Metabolites in Apples, Peaches, Flour, and Water by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *Journal of AOAC International*. 88 (2005) 1491–1502.
- [28] M. Gawęł, T. Kiljanek, A. Niewiadowska, S. Semeniuk, M. Goliszek, O. Burek, A. Posyniak, Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Food Chemistry*. 282 (2019) 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.003>.
- [29] M.S. Gross, T.G. Bean, M.L. Hladik, B.A. Rattner, K.M. Kuivila, Uptake, Metabolism, and Elimination of Fungicides from Coated Wheat Seeds in Japanese Quail (*Coturnix japonica*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 68 (2020) 1514–1524. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05668>.
- [30] M. Yao, L. Chen, N.R. Srinivas, Quantitation of itraconazole in rat heparinized plasma by liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 752 (2001) 9–16. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00505-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00505-3).
- [31] J.-B. Gordien, J.-M. Bernadou, E. Korte, Simultaneous Quantification of Triazoles in Plasma by HPLC with Bond Elut Plexa SPE, (n.d.) 6.
- [32] S. Li, E. Pike, Simple and Fast Quantitation of Nicotinic Acid and Nicotinamide in Human Plasma by Applying Impact™ Protein Precipitation Plate Technology with Gemini® 3 µm C18 HPLC Columns, (n.d.) 4.
- [33] K. Skov, N. Hadrup, J. Smedsgaard, H. Frandsen, LC–MS analysis of the plasma metabolome—A novel sample preparation strategy, *Journal of Chromatography B*. 978–979 (2015) 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.11.033>.
- [34] X. Xu, Q. Zhou, W.A. Korfmacher, Development of a low volume plasma sample precipitation procedure for liquid chromatography/tandem mass spectrometry assays used for drug discovery applications, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 19 (2005) 2131–2136. <https://doi.org/10.1002/rcm.2040>.
- [35] G. Fatiguso, F. Favata, I. Zedda, A. De Nicolò, J. Cusato, V. Avataneo, G. Di Perri, A. D’Avolio, A simple high performance liquid chromatography–mass spectrometry method for Therapeutic Drug Monitoring of isavuconazole and four other antifungal drugs in human plasma samples, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 145 (2017) 718–724. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.040>.
- [36] J. Li, Y. Wang, W. Li, P. Xu, B. Guo, J. Li, H. Wang, Tissue distribution and metabolism of triadimefon and triadimenol enantiomers in Chinese lizards (*Eremias argus*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 142 (2017) 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.035>.
- [37] J.L. Italia, D. Singh, M.N.V. Ravi Kumar, High-performance liquid chromatographic analysis of amphotericin B in rat plasma using  $\alpha$ -naphthol as an internal standard, *Analytica Chimica Acta*. 634 (2009) 110–114. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.12.006>.
- [38] M. Zhang, G.A. Moore, M.L. Barclay, E.J. Begg, A Simple High-Performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Three Triazole Antifungals in Human Plasma, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57 (2013) 484–489. <https://doi.org/10.1128/AAC.00768-12>.
- [39] E.R. Trösken, N. Bittner, W. Völkel, Quantitation of 13 azole fungicides in wine samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of*



- Chromatography A. 1083 (2005) 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.020>.
- [40] N. Quinete, T. Kraus, V.N. Belov, C. Aretz, A. Esser, T. Schettgen, Fast determination of hydroxylated polychlorinated biphenyls in human plasma by online solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*. 888 (2015) 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.041>.
- [41] R.J. Lennon, W.J. Peach, J.C. Dunn, R.F. Shore, M.G. Pereira, D. Sleep, S. Dodd, C.J. Wheatley, K.E. Arnold, C.D. Brown, From seeds to plasma: Confirmed exposure of multiple farmland bird species to clothianidin during sowing of winter cereals, *Science of The Total Environment*. 723 (2020) 138056. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138056>.
- [42] P. Byholm, S. Mäkeläinen, A. Santangeli, D. Goulson, First evidence of neonicotinoid residues in a long-distance migratory raptor, the European honey buzzard (*Pernis apivorus*), *Science of The Total Environment*. 639 (2018) 929–933. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.185>.
- [43] J.M. Montiel-León, S.V. Duy, G. Munoz, M. Amyot, S. Sauvé, Evaluation of on-line concentration coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the quantification of neonicotinoids and fipronil in surface water and tap water, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 410 (2018) 2765–2779. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0957-2>.
- [44] J. Cotton, F. Leroux, S. Broudin, M. Poirel, B. Corman, C. Junot, C. Ducruix, Development and validation of a multiresidue method for the analysis of more than 500 pesticides and drugs in water based on on-line and liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry, *Water Research*. 104 (2016) 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.075>.
- [45] C.G. Zambonin, A. Cilenti, F. Palmisano, Solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for the rapid screening of triazole residues in wine and strawberries, *Journal of Chromatography A*. 967 (2002) 255–260. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00780-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00780-X).
- [46] S. Navarro, A. Barba, G. Navarro, N. Vela, J. Oliva, Multiresidue method for the rapid determination – in grape, must and wine – of fungicides frequently used on vineyards, *Journal of Chromatography A*. 882 (2000) 221–229. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00337-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00337-X).

**Table A1**

Source and ion funnel parameters of the mass spectrometer.

	<b>Parameters</b>	<b>Conditions</b>
	Drying and nebulizing gas	Nitrogen
<b>Source</b>	Gas ion source temperature (°C)	200
	Gas flow (L/min)	11
	Nebulizer (psi)	40
	Sheat gas temperature (°C)	350
	Sheat gas flow (L/min)	11
	Capillary voltage (V)	3000
	Charging voltage (V)	300
<b>Ion funnel</b>	High Pressure	110
	Low Pressure	60

**Table A2**

The MRM transitions by LC-MS/MS with the m/z of precursor ion (Q1), m/z of the product ion (Q3), collision energy (CE), dwell time (DW), Cell Accelerated Voltage (CAV), retention time (rt) and ratio Area TQ/ Area TC for each selected triazole. \* MRM transition used for quantification

Compounds	Q1	Q3	CE (eV)	DW (ms)	CAV (V)	Rt with the selected column and gradient (min)	TQ/TC
Cyproconazole	292.1	70.2*	16	46	4	14.0	3.2
		125.1	36		7		
Difenoconazole	406.1	250.9*	24	55	4	16.3	5.2
		110.9	68		5		
Epoconazole	330.08	121*	16	24	5	14.7	1.8
		101.1	48		5		
Fenbuconazole	337.1	70*	16	28	4	15.3	1.5
		124.9	32		7		
Flusilazole	316.1	247*	24	26	5	14.9	1.6
		165	16		6		
Flutriafol	302.11	69.9*	12	200	5	12.5	2.8
		123	28		4		
Imazalil	297.06	41.2*	28	200	4	12.1	1.7
		39.1	68		6		
Metconazole	320.16	70.1*	20	30	5	15.3	9.0
		124.9	44		5		
Penconazole	284.07	70.1*	12	24	4	14.8	1.8
		159	32		7		
Prochloraz	376	307.9*	4	30	6	15.6	1.8
		70	24		7		
Propiconazole	342.1	158.9*	32	28	7	15.5	1.1
		69	20		6		
Prothioconazole	344.04	189*	20	28	7	15.4	1.7
		153.1	60		6		
Tebuconazole	308.2	70.1*	20	26	6	14.9	11.8
		125	44		4		
Tetraconazole	372	70.1*	28	26	4	14.5	0.7
		158.9	20		7		
Triadimefon	294.1	69*	16	55	5	13.9	1.5
		41.1	36		4		
Triadimenol	296.1	70.1*	8	55	4	13.9	3.8
		43.2	64		5		
Fenbuconazole d5	342.16	70	16	28	5	15.3	
Propiconazole d5	347.11	159	32	28	4	15.4	
Tebuconazole d6	314.19	72.1	20	26	5	14.9	

Publication n°2 : High contamination of a sentinel vertebrate species by azoles in vineyards: a study of Common blackbirds in multiple habitats in Western France

**High contamination of a sentinel vertebrate species by azoles in vineyards: a study of Common blackbirds in multiple habitats in Western France**

Frédéric Angelier<sup>1,\*</sup>, Louise Prouteau<sup>2</sup>, François Brischoux<sup>1</sup>, Olivier Chastel<sup>1</sup>, Marie-Hélène Devier<sup>2</sup>, Karyn Le Menach<sup>2</sup>, Stéphan Martin<sup>2</sup>, Bertille Mohring<sup>1</sup>, Patrick Pardon<sup>2</sup>, Hélène Budzinski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, CNRS-LRU, UMR 7372, Villiers en Bois 79360, France*

<sup>2</sup>*Université de Bordeaux, CNRS, EPOC, EPHE, UMR 5805, F-33600 Pessac, France*

To be submitted to *Environmental Pollution*

**\*Contact for correspondence:** Frédéric Angelier, frederic.angelier@cebc.cnrs.fr

## Introduction

Over the last century, agricultural practices have intensified to unprecedented extent to increase the yields and the economic value of agriculture (Lanz et al., 2018; Tilman et al., 2017). This intensification has been associated with drastic changes of agricultural landscape (Gardner, 1996), and more specifically with the destruction of many ecological infrastructures (hedgerows, small woods), with a significant increase in the size of land plots to allow the mechanization of agriculture (ex: plough, seeder, combine harvester, etc.). As a result of this landscape simplification, monocultures have indeed expanded and agricultural areas are now often characterized by a few very large plots dedicated to the production of a limited numbers of crops (Benton et al., 2003). Such monoculture has led to the surge of pest density and crop diseases (Wilby and Thomas, 2002), and as a result, to the development of the pesticide industry (Grube et al., 2011).

For example, fungicides are now widely used to circumvent the detrimental impact of fungi on yields in a wide variety of crops, such as cereals, orchards, vineyards, and even ornamental flowers (Gianessi and Reigner, 2006; Moore et al., 2020; Morton and Staub, 2008). Among fungicides, azoles represent the most widely used family of organic fungicides and they have been used for decades in agricultural landscapes (Green and Spilker, 1986). Interestingly, their use has also been democratized at the end of the 20<sup>th</sup> century in private gardens and urban parks to deal with fungi attacks on ornamental flowers, shrubs and trees, and elevated levels of azole compounds can be found in cities (Schoustra et al., 2019). Azoles are antifungal agents that act by inhibiting cell membrane ergosterol synthesis, thereby leading to increased cell permeability and destruction (Vanden Bossche, 1985). This mode of action is one of the current most effective control of phytopathogenic fungi and azoles represent now the most used family of organic fungicides in crops, such as vineyards, orchards and cereals (European Centre for Disease Prevention and Control., 2013). For example, the use of azoles in the US agriculture has increased more than 4-fold during the last decade (Toda et al., 2021). Importantly, the azole family includes several molecules (e.g., dozens of azoles and imidazoles). Although the use of a few azoles has decreased since the 80's (ex: triadimefon), the use of others has dramatically increased (ex: tebuconazole, propiconazole) and new azoles have even started to be used during the last decade (ex: difenoconazole, metconazole, (Toda et al., 2021)).

Azoles are mostly used to circumvent fungi attacks in crops, there is increasing evidence that they can be transferred to the environment. Indeed, recent studies have shown that they can be found in the tissues of humans (e.g. hair, (Fustinoni et al., 2014; Polledri et al., 2018; Schummer et al., 2012). Azoles can be transporter into the environment through multiple mechanisms of transfer such as volatilization, infiltration and adsorption (Mottes et al., 2014; Zhang et al., 2018). As a consequence, the occurrence of azoles and their residues has been reported in several environmental matrices such as soil (Pelosi et al., 2021), water (Ccanccapa et al., 2016; Guarda et al., 2020) or air (Coscollà et al., 2010; Raherison et al., 2019). In addition, other studies have reported that azoles can be found in invertebrate species (e.g., Daniele et al., 2018; Pelosi et al., 2021) and in seeds (e.g., (Lopez-Antia et al., 2016), suggesting that these molecules might also be transferred to wildlife through trophic webs. Indeed, recent studies have that human food could be contaminated by azoles (Cui et al., 2021; Zambonin et al., 2002). However, field data are currently lacking to assess if and to what extent the use of azoles in agroecosystems and urban areas could contaminate non-target wild vertebrate species (e.g. Bro et al., 2015; Mateo et al., 2016).

Some experimental studies have shown that azoles can affect physiological functions and have detrimental effects on fitness in animal models (Cao et al., 2019; Souders et al., 2019; Sun et al., 2020). Recently, a few studies have also demonstrated that the consumption of azoles

coated-seeds may impair reproduction and physiological functions of granivorous birds living in agroecosystems (Fernández-Vizcaíno et al., 2020; Lopez-Antia et al., 2021). However, these studies have focused on a few azoles only and they have mostly examined the impact of high doses of these azoles on physiology or performance. Therefore, we currently lack field data to assess the contamination of wild vertebrates by multiple azoles in several habitats. Such data are crucial not only to better understand which azoles are the most likely to contaminate wild vertebrates, but also to determine the degree of contamination of wild vertebrates by these azoles. These basic data are required to assess the potential threat that different azoles may entail for wildlife, and by extension for humans.

In this study, we aimed to document for the first time the degree of contamination of a generalist wild bird species by multiple azoles that are used for plant protection and fungi pest control in multiple habitats. We specifically captured 75 European blackbirds in an agroecosystem (vineyard), a protected forest, and a middle-sized city in Western France. We collected blood and analyzed the plasma levels of 14 triazoles and 2 imidazoles by using an on-line SPE coupled to LC-MS/MS methodology (see Prouteau et al. submitted) because plasma can be collected ethically and it is a relevant matrix to analyse the levels of azoles by LC-MS/MS (Gross et al., 2020). The European blackbird is an ubiquitous species that can be found in a wide variety of habitats. They are omnivorous, feed on invertebrates and berries, and can be found in all three targeted habitats, which allow some comparisons between habitats (Mohring et al., 2021). Importantly, this species has previously been considered as relevant sentinel species of their environment and they have been used to monitor the degree of contamination of their habitat (Fritsch et al., 2012; Meillère et al., 2016; Scheifler et al., 2006). To further examine the potential impact of azoles on this sentinel species, we also focused on several biomarkers of health status (body condition, hematocrit, and plumage quality). We predicted that (1) the contamination of blackbirds by azoles will be especially important in the vineyards, where azoles are massively used; (2) the contamination will be significant in the urban habitat where azoles are used to protect ornamental flowers, shrubs and trees in private gardens and city parks; (3) the contamination will be minimal in the protected forest where azoles are not used. Importantly, we predicted that (4) different compounds may contaminate blackbirds in each habitat because some azoles are used for specific crops or purposes only (e.g. difenoconazole in vineyards). Finally, we also predicted that (5) the health status may differ between the three habitats; (6) health status may be negatively correlated with the degree of contamination by specific azoles.

## **Materials and methods**

### *Study sites*

All birds were captured in 2016 and 2019 during the breeding season (April-July) in three geographic areas, which are located in the 'Région Nouvelle-Aquitaine'. These three areas consist in forest, urban and vineyards area and they are therefore characterized by different anthropogenic activities and by contrasted use of azoles. Firstly, birds were captured in a protected fenced forest where human activities are extremely limited. This forest covers 2500 ha and is surrounded by arable lands and crops. There is no use of any azole in this forest. Secondly, birds were captured in the city of Niort, which is a middle size town with multiple parks and backyards. Birds were captured in recreational areas, such as parks or private properties. These parks and backyards were characterized by ornamental trees, shrubs and flowers in which azoles can be used by the city or by owners. Thirdly, birds were captured in the Cognac vineyard where azoles are massively used to protect the vines and the grapes against

fungi such as mildew or black rot. Common blackbirds were captured in all three habitats in 2016 while they were only captured in the vineyards and the forest in 2019. A total of 118 blackbirds were captured (69 adults and 49 juveniles).

#### *Study species, capture, measurements and blood sampling*

In this study, we focused on the Common blackbird, which is a common passerine that is often used as an avian sentinel species in ecotoxicological studies (Fritsch et al., 2012; Meillère et al., 2016). This species is relatively abundant and can be easily found and captured in forests, cities and vineyards (Mohring et al., 2021). Birds were captured by using mist-nets that were located between bushes, trees, or along hedgerows in the forest, urban parks or vineyards. At capture, the age of all individuals and the sex of adults were determined by using plumage characteristics. Immediately after capture, a blood sample was collected by puncture of the brachial vein with a 25G needle, and two rectrix feathers were plucked for feather quality analyses. The blood (~600 µL) was then centrifuged and the plasma was separated from the red blood cells. Plasma was stored at -20 °C until analyses at the LPTC-EPOC (see below). All individuals were weighed and measured (wing size) by using a ruler (+/- 0.5 mm) and an electronic scale (+/-0.1 g), respectively. Body condition was then expressed as the residuals of the regression between body mass and wing size (linear regression:  $F_{1,116} = 4.05$ ,  $p = 0.046$ ,  $r = 0.184$ ). All individuals were released within 15 minutes of capture. Feathers were dried in an oven for 48 hours and were then measured with a caliper (total length in mm,  $\pm 0.01$  mm) and weighted with a precision scale ( $\pm 0.1$  mg).

#### *Passive air samplers*

To better understand how azoles were used in the study sites, passive air samplers were deployed in 2017. They house a polyurethane foam (PUF) disk (Tish Environmental, Cleaves, United States), which is uniformly porous to allow chemicals to penetrate. Before application in field, they were pre-cleaned using an Accelerated Solvent Extractor (ASE Dionex 350, Thermo Fisher Scientific, Asnières sur Seine, France) with dichloromethane solvent (pressure 100 bars; temperature 90 °C; heat 5 min; static 8 min; flush volume 50 %; purge 300 s; 2 cycles), dried and stored in sealed bags.

To avoid any potential effect of rain, sunlight, wind or particle deposition and to standardize the sampling process, each PUF disk (14 cm diameter; 1.35 cm thickness; 365 cm<sup>2</sup> surface area) was deployed in a conventional 'flying saucer' housing that was fixed on a pole at a height of 1.30 m (Estellano et al., 2012; Tuduri et al., 2006). Two passive air samplers were deployed in the vineyards while one passive sampler was deployed in the protected forest. No passive air sampler was deployed in the urban area because such systems were previously stolen in urban areas. Each PUF was left in the field for approximately a month, allowing us to assess the exposition of the study site to azoles during a whole annual cycle. After each month, the PUF is removed from the device, stored in an aluminum foil and in a Ziploc freezer bag and kept at -20 °C until further analysis at the LPTC-EPOC.

#### *Plasma levels of azoles*

Plasma levels of azoles were determined using a LC-MS/MS methodology (Prouteau et al. submitted). Briefly, samples were first extracted using the following procedure. Into 1.5 mL microtube, 25 µL of plasma samples and 30 µL internal standards solution prepared at 1 ng.g<sup>-1</sup> in acetonitrile were weighed. After a centrifugation step to precipitate proteins, ultra-pure water was added to the supernatant. Then, 600 µL of each extract was injected to the analytical system composed of a Poroshell 120 SB C18 guard column (Agilent) used as on-line SPE cartridge.



They were loaded during 2 min at a  $1000 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  rate with Milli-Q water as eluent. Target compound separation was achieved on a Poroshell Phenyl-Hexyl column (Agilent) using a temperature of  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  and a flow rate of  $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Mobile phase A consisted of water with 5 ammonium acetate plus 0.1 % formic acid and mobile phase B of methanol plus 0.1 % formic acid. The following gradient program was applied: 0-100 % B in 18 min holding at 100 % B for 0.5 min and returning to initial conditions at 19 min during 3 min to equilibrate. The quantification of azoles was performed by using the 6490 Triple Quad mass spectrometer (Agilent) in positive electrospray mode (ESI+) in dynamic multiple reactions monitoring (dMRM). Finally, we checked the analytical sequence with quality controls and we used internal standards to calculate the concentration. The limit of quantification (LOQ) of azoles differed between compounds and varied between 10 and  $400 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$  of plasma except for the one less sensitive compounds triadimenol with  $1500 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$  of plasma.

#### *PUF levels of azoles*

A disk quarter was weighed and coiled in stainless-steel 34 mL pre-conditioned cells (Thermo Fisher Scientific (Asnières sur Seine, France)). Into the cells,  $20 \mu\text{L}$  of internal standards solution were also added at  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  in methanol. The conditioning and extraction programs are the same as previously described using acetonitrile instead of dichloromethane solvent.  $45 \text{ mL}$  of extracts were recovered and evaporated to  $3 \text{ mL}$  with RapidVap (Labconco, Illkirch, France). The  $3 \text{ mL}$  were then evaporated to  $300 \mu\text{L}$  under a gentle nitrogen stream. The extracts were then refrigerated until quantification. Quantification was performed by injecting  $5 \mu\text{L}$  of the extracts into a 6495 or 6495B LC-MS/MS (Agilent) with the same separation conditions previously described for the plasma. Concentrations were calculated in  $\text{ng}\cdot\text{PUF}^{-1}$ . LOQ were established taking the maximum extrapolation between LOQ calculated for sample concentration or spiked PUF at  $50 \text{ ng}\cdot\text{PUF}^{-1}$  (see Annex 1). Extraction and quantification recoveries were also obtained for the spiked PUF. (see Annex 1).

Concentrations in  $\text{ng}\cdot\text{PUF}^{-1}$  were then converted in order to estimate the air concentrations ( $\text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$ ) by using estimated air sampling rate for the PUFs ( $\text{m}^3\cdot\text{day}^{-1}$ ) and the duration of PUF deployment in the field. Classically, these rates are ranging from 1 to  $8 \text{ m}^3\cdot\text{day}^{-1}$  (Chaemfa et al., 2008), (Pozo et al., 2006) and the mean of these two values ( $4.5 \text{ m}^3\cdot\text{day}^{-1}$ ) was therefore used. The average duration of PUF deployment (i.e., 35 days) was chosen to calculate the estimated LOQ in  $\text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$ .

#### *Statistical analyses*

All statistical analyses were run using SAS University edition. Firstly, descriptive and basic statistics were provided for the concentrations of azoles that were quantified in the air and the plasma of blackbirds in the vineyard and the forest habitats. Secondly, Chi-squared tests were used to compare the probability of quantifying multiple azoles between habitats (forest, urban, and vineyard). General linear models were also run to test the influence of the habitat (urban, forest, and vineyard), the year of sampling (2016, 2019), the date of sampling, and the status (juvenile, adult male, adult female) as detailed in the Annex 2. Thirdly, general linear models were used to test the influence of the date of sampling, the year of sampling (2016 and 2019), and the status of the bird (juvenile, adult male, adult female). These analyses were run in the vineyard habitat only and for the azoles that were quantified in at least 15% of the sampled blackbirds. They were not run for the urban and the forest habitats because azoles were not quantified in a sufficient number of blackbirds to allow such analyses. Fourthly, general linear models were used to test the influence of the habitat (urban, forest, vineyard), the date of sampling, the year of sampling, and the status of the birds on body condition, hematocrit levels, and feather density. Finally, general linear models were used to test the influence of four azoles

(difenoconazole, fenbuconazole, tebuconazole, tetraconazole) on body condition, hematocrit levels, and feather density (independent variables: date of sampling, status, azole levels, azole levels x status interaction). For the fenbuconazole, the analysis was run in juveniles only because fenbuconazole was not detected in a sufficient percentage of adult birds. All plasma levels of azoles were log transformed.

## Results

### *Description of the levels of azoles: Passive air samplers*

Several azoles were quantified in the passive air samplers that were deployed in the forest and the vineyard areas (cyproconazole, epoxiconazole, propiconazole, metconazole, tebuconazole, tetraconazole, difenoconazole, penconazole, fenbuconazole), but interestingly, three of them could be quantified in the vineyard habitat only (difenoconazole, penconazole, fenbuconazole) and were totally absent from the forest habitat (Table 1).

In both habitats, azoles were not quantified until April (except tebuconazole, which was quantified at very low levels in March/April in the forest habitat). From April to June, most azoles were similarly quantified in the forest and the vineyard habitat at relatively low (cyproconazole, metconazole, propiconazole:  $< 0.03 \text{ ng.m}^{-3}$ ) or intermediate (epoxiconazole:  $< 0.06 \text{ ng.m}^{-3}$ ) concentrations (Table 1). However, in May and to a greater extent in June, five azoles were quantified at high concentrations (difenoconazole, penconazole:  $> 0.20 \text{ ng.m}^{-3}$  in June) or very high concentrations (fenbuconazole, tebuconazole, tetraconazole:  $> 0.60 \text{ ng.m}^{-3}$  in June) in the vineyard while they were not quantified (difenoconazole, fenbuconazole, and tetraconazole) or at low concentrations (tebuconazole:  $< 0.08 \text{ ng.m}^{-3}$  in June) in the forest habitat (Table 1; Fig. 1).

### *Description of the levels of azoles: Blackbird plasma samples*

Several azoles were found in blackbird plasma samples (cyproconazole, difenoconazole, fenbuconazole, flusilazole, metconazole, tebuconazole, tetraconazole) although others were not quantified, notably epoxiconazole, flutriafol, imazalil, penconazole, prochloraz, propiconazole, prothioconazole, tradimefon, and triadimenol (Table 2). No azoles were quantified in all sampled urban blackbirds (Table 2), while several azoles were quantified in vineyard birds, sometimes at very high concentrations, and in most, if not all captured blackbirds (e.g. tetraconazole, Table 2). In forest birds, a few azoles were quantified in a small percentage of the captured blackbirds, but often at low concentrations (e.g., cyproconazole, tebuconazole, Table 2).

Difenoconazole, fenbuconazole, tebuconazole, and tetraconazole were more frequently quantified in blackbirds from vineyards relative to those from the protected forest (difenoconazole:  $\chi^2 = 0.001$ , fenbuconazole:  $\chi^2 = 0.013$ , tebuconazole:  $\chi^2 = 0.027$ , tetraconazole:  $\chi^2 < 0.001$ ) while this was not the case for cyproconazole, flusilazole, and metconazole (cyproconazole:  $\chi^2 = 0.939$ , flusilazole:  $\chi^2 = 0.456$ , metconazole:  $\chi^2 = 0.826$ ). Similarly, difenoconazole, fenbuconazole, tebuconazole, and tetraconazole were more frequently quantified in blackbirds from vineyards relative to those from the urban area (difenoconazole:  $\chi^2 = 0.008$ , fenbuconazole:  $\chi^2 = 0.045$ , tebuconazole:  $\chi^2 = 0.002$ , tetraconazole:  $\chi^2 < 0.001$ ) while this was not the case for cyproconazole, flusilazole, and metconazole (cyproconazole:  $\chi^2 = 0.394$ , flusilazole:  $\chi^2 = 0.549$ , metconazole:  $\chi^2 = 0.293$ ). Finally, there was no significant difference in the quantification of any azole between the blackbirds from the protected forest and those from the urban area (all  $p > 0.05$ ).

*Plasma levels of azoles in vineyard blackbirds*

In vineyards, 4 azoles were found in a large proportion of birds and were further analyzed (difenoconazole, fenbuconazole, tebuconazole and tetraconazole). All the others were not quantified in a sufficient percentage of birds to allow further statistical analyses (< 15 % of sampled birds).

Difenoconazole levels were significantly affected by the date of sampling with increasing difenoconazole levels throughout the season ( $F_{1,57} = 5.30$ ,  $p = 0.025$ , Fig. 2A). In addition, difenoconazole levels were significantly higher in 2016 relative to 2019 ( $F_{1,57} = 5.13$ ,  $p = 0.027$ , Fig. 2A). Finally, difenoconazole levels were not significantly affected by the status of the birds and they did not differ between juveniles, adult males, and adult females ( $F_{2,57} = 2.00$ ,  $p = 0.144$ , Fig. 3A).

Fenbuconazole levels were significantly affected by the date of sampling with increasing tetraconazole levels throughout the season ( $F_{1,59} = 9.71$ ,  $p = 0.003$ , Fig. 2B). In addition, fenbuconazole levels were significantly higher in 2016 relative to 2019 ( $F_{1,59} = 7.68$ ,  $p = 0.007$ , Fig. 2B). Fenbuconazole levels were not significantly affected by the status of the birds and they did not differ between juveniles, adult males, and adult females ( $F_{2,57} = 0.08$ ,  $p = 0.927$ , Fig. 3B).

Tebuconazole levels were not significantly affected by the date of sampling ( $F_{1,59} = 2.10$ ,  $p = 0.153$ , Fig. 2C). However, tebuconazole levels were significantly higher in 2016 relative to 2019 ( $F_{1,60} = 17.05$ ,  $p = 0.001$ , Fig. 2C). Finally, tebuconazole levels were not significantly affected by the status of the birds and they did not differ between juveniles, adult males, and adult females ( $F_{2,57} = 0.79$ ,  $p = 0.457$ , Fig. 3C).

Tetraconazole levels were significantly affected by the date of sampling with increasing tetraconazole levels throughout the season ( $F_{1,60} = 28.26$ ,  $p < 0.001$ , Fig. 2D). However, tetraconazole levels did not significantly differ between 2016 and 2019 ( $F_{1,59} = 0.45$ ,  $p = 0.507$ , Fig. 2D). Tetraconazole levels were not significantly affected by the status of the birds and they did not differ between juveniles, adult males, and adult females ( $F_{2,57} = 0.48$ ,  $p = 0.624$ , Fig. 3D).

*Body condition*

Body condition was significantly affected by the status of the bird ( $F_{2,112} = 15.57$ ,  $p < 0.001$ , Fig. 4A) and the habitat of sampling ( $F_{2,112} = 3.79$ ,  $p = 0.026$ , Fig. 4A), but body condition did not differ between 2016 and 2019 ( $F_{1,111} = 2.08$ ,  $p = 0.152$ ). Body condition also decreased through the breeding season ( $F_{1,112} = 4.14$ ,  $p = 0.044$ ). Specifically, females were in better condition than males ( $\chi^2 = 21.44$ ,  $p < 0.001$ , Fig. 4A) and juveniles ( $\chi^2 = 24.92$ ,  $p < 0.001$ , Fig. 4A), but males and juveniles did not significantly differ in body condition ( $\chi^2 = 0.77$ ,  $p = 0.381$ , Fig. 4A). In addition, urban blackbirds were in better condition than vineyard ( $\chi^2 = 5.40$ ,  $p = 0.020$ , Fig. 4A) and forest blackbirds ( $\chi^2 = 7.06$ ,  $p = 0.008$ , Fig. 4A), but vineyard and forest blackbirds did not significantly differ in body condition ( $\chi^2 = 0.67$ ,  $p = 0.412$ , Fig. 4A).

In vineyards, body condition was significantly affected by the ‘status x difenoconazole’ interaction (see Table 3A), demonstrating that the relationship between plasma difenoconazole levels and body condition differ between adult males, adult females and juveniles. Specifically, plasma difenoconazole levels were positively and significantly correlated with body condition in females ( $\chi^2 = 10.59$ ,  $p = 0.001$ ), but not in males ( $\chi^2 = 0.20$ ,  $p = 0.655$ ) and juveniles ( $\chi^2 = 1.59$ ,  $p = 0.208$ ).

Body condition was not related to plasma fenbuconazole levels in juveniles (Table 3B). The potential relationship between fenbuconazole and body condition could not be tested in males and females because fenbuconazole was not detected in a sufficient percentage of adult birds. Body condition of blackbirds was not significantly related with plasma tebuconazole or tetraconazole levels (see Table 3C, 3D).

#### *Hematocrit*

In vineyards, hematocrit levels were not significantly affected by the status of the birds ( $F_{2,30} = 1.63$ ,  $p = 0.221$ ) or the date of sampling ( $F_{1,30} < 0.01$ ,  $p = 0.993$ ). They were not significantly related with plasma difenoconazole, tebuconazole or tetraconazole levels for adult males or females, and juveniles (all  $p > 0.100$ ). Hematocrit levels were not related to plasma fenbuconazole levels in juveniles ( $F_{1,11} = 0.82$ ,  $p = 0.385$ ). The potential relationship between fenbuconazole and hematocrit levels could not be tested in males and females because fenbuconazole was not detected in a sufficient percentage of adult birds.

#### *Feather quality*

Feather density was significantly affected by the status of the bird ( $F_{2,100} = 7.41$ ,  $p = 0.001$ , Fig. 4B) but not by the habitat of sampling ( $F_{2,100} = 0.85$ ,  $p = 0.429$ , Fig. 4B). Feather density did not differ between 2016 and 2019 ( $F_{1,100} < 0.01$ ,  $p = 0.948$ ) but feather density decreased through the breeding season ( $F_{1,100} = 5.30$ ,  $p = 0.023$ ). Specifically, males had denser feathers than females ( $\chi^2 = 14.82$ ,  $p < 0.001$ ) but males and juveniles did not significantly differ in feather density ( $\chi^2 = 2.79$ ,  $p = 0.095$ , Fig. 4B). Females and juveniles did not significantly differ in feather density ( $\chi^2 = 3.20$ ,  $p = 0.073$ , Fig. 4B).

In vineyards, feather density of blackbirds was not significantly related with plasma difenoconazole, tebuconazole or tetraconazole levels (Table 4). Feather density was not related to plasma difenoconazole levels in juveniles (Table 4B). The potential relationship between difenoconazole and feather density could not be tested in males and females because difenoconazole was not detected in a sufficient percentage of adult birds.

## **Discussion**

In this study, we examined for the first time the plasma levels of multiple azoles of a wild bird species in multiple habitats. Importantly, we found that blackbirds living in vineyards have high plasma levels of multiple azoles. This high level of contamination was not found in the blackbirds from the protected forest and from the urban habitat. Interestingly, we also report that the contamination of blackbirds living in vineyard was especially important during the end of Spring and the beginning of Summer. This level of contamination by azoles matches perfectly with the results from the passive air samplers that were deployed in the forest and the vineyard habitats (i.e., high levels of azoles in the air of vineyards during June and July). However, we did not report any major difference in multiple biomarkers of the health status of blackbirds between the three habitats.

*Contamination of blackbirds by azole fungicides*

In this study, we analyzed for the first time the plasma of a wild vertebrate sentinel species to detect specific azole fungicides that are used for pest control in multiple habitats. This analysis was made possible through the recent development of a validate technique to measure azole compounds in small volume of plasma (Prouteau et al. submitted). Importantly, we showed for the first time that the degree of contamination of wild birds by azole fungicides vary between habitats. Indeed, multiple azoles were found at very high concentration in the plasma of blackbirds living in vineyards. In contrast and contrary to our prediction, azoles could not be quantified in the plasma of urban blackbirds. Finally, some azoles were found in the plasma of some forest blackbirds but at relatively low concentrations.

These results demonstrate that azole fungicides can contaminate wild birds living agroecosystems, and especially in the vineyards that are characterized by a massive use of fungicides (Komárek et al., 2010). These findings corroborate with recent studies that have reported the presence of azole fungicides in the urine or the hair of humans working in vineyards (Fustinoni et al., 2014; Mercadante et al., 2019; Polledri et al., 2018). Regarding wild vertebrates, data are however very limited. A few studies have found that azoles could be find in wild vertebrates living in agroecosystems but these studies have only found residues of azole fungicides in a limited number of very specific matrices (e.g., eggs of birds, Bro et al., 2015) or in the food that could be consumed by wild vertebrates (e.g., seeds, Fernández-Vizcaíno et al., 2020; Lopez-Antia et al., 2016 ; invertebrates, Pelosi et al., 2021). To our knowledge, the level of contamination of wild vertebrates by azole fungicides has never been determined in vineyard ecosystems. Here, we report for the first time very high levels of contamination for four compounds that could be of serious concerns (tetraconazole, tebuconazole, difenoconazole, fenbuconazole).

The absence of azole contamination in urban blackbirds suggest that azole fungicides are used to a limited extent in cities, or at least in the city where we sampled blackbirds. In cities, azole fungicides are mainly used against fungi attacks of ornamental flowers, shrubs and fruit trees, either in private gardens or in urban parks (Muratet and Fontaine, 2015; Politi Bertoncini et al., 2012). However, the quantity of fungicides is certainly quite limited relative to the vineyards or other agroecosystems and this could explain our results. Our study demonstrates that urban blackbirds probably do not suffer from potential detrimental effects of azoles on physiology or performance (survival or reproduction, see Lopez-Antia et al. 2021 for examples of such effects in birds).

The contamination of a few blackbirds by azole fungicides in the protected forest came as a surprise because of the absence of use of fungicides in that habitat. This astonishing result could be explained by the past use of azole fungicides to protect the harvested wood when the forest was not protected (Carisse, 2010). However, this interpretation is quite unlikely because this forest has been protected for almost 20 years and the half-life of most azole fungicides is limited to a maximum of a few months. Alternatively, this result could be explained by the surroundings of the protected forest that is characterized by cereal crops, in which azole fungicides are used and can contaminate soil and invertebrates (Pelosi et al., 2021). The use of azole fungicides in these crops could potentially contaminate forest blackbirds if the azoles could be transferred to the forest through air circulation. Indeed, the results from our passive air samplers support this hypothesis because we found that some azoles were detected in the middle of this protected forest. In addition, blackbirds could be contaminated by azole fungicides while foraging on the edges of the protected forest (i.e., in cereal crops). It is important to note that azole fungicides

were found in a few birds only and at very moderate levels. This therefore demonstrate that blackbirds living in this protected forest are not highly contaminated by azole fungicides.

*Passive air samplers and the contamination of blackbirds by azole fungicides*

Our study reports that the degree of contamination of blackbird plasma by azole fungicides mirrors what is released in the environment. Firstly, we found that 4 main azoles were quantified at high concentrations in the PUFs that were deployed in the vineyards, and these 4 same azoles were quantified in a large percentage of vineyard blackbirds. Importantly, these azoles were quantified mostly in June/July, when they were also detected in the plasma of blackbirds. In addition, they were not quantified before June either in the PUFs or in the blackbird plasmas. Finally, three of these four azoles were not detected in the PUFs that were deployed in the protected forest (difenoconazole, fenbuconazole, tetraconazole) and they were also not quantified in the blackbirds living in this forest (or in a very small percentage of plasma samples). Interestingly, a few other azoles were quantified in the PUFs and concomitantly in blackbird plasma samples, either in the vineyard or in the protected forest (e.g., metconazole, cyproconazole). For example, tebuconazole was quantified in the PUF that was deployed in the protected forest and this specific azole was also quantified in some blackbirds living in this forest. All these results demonstrate that the Common blackbird is an appropriate sentinel species to investigate the release of azole fungicides in the environment.

Unfortunately, we were not able to deploy a PUF in the urban habitat, precluding us from linking the levels of azoles in the passive air samplers with those that were quantified in urban blackbirds. It is also important to note that the passive air samplers were deployed in 2017 while the sampling of blackbirds was conducted in 2016 and 2019. This could explain some of the discrepancies that we reported between passive air samplers and blackbird plasmas (e.g., epoxiconazole that was detected in the PUFs but not in blackbirds). However, this is very unlikely to affect our interpretation because the same azole fungicides were used in agroecosystems over that period (DRAAF 2020). Moreover, the same main azoles were quantified in blackbird plasma in 2016 and 2019 in the vineyards (tetraconazole, tebuconazole, fenbuconazole, difenoconazole) and in the protected forest (tebuconazole), supporting the idea that the same azoles were used over that period in vineyards.

Among the 4 main azoles that were quantified in vineyard blackbirds, we found that the levels of azoles in blackbird plasma was much more important for some azoles (e.g., tetraconazole) than others (e.g., difenoconazole). Intriguingly and according to the PUF results, this did not seem to be related to a higher release of specific azoles in the environment. This suggests that some azoles are more likely to contaminate wild vertebrates than others, or at least more likely to be quantified in wild bird plasma. This could be related to specific chemical properties of specific azoles (half-life, solubility) and to the ability of the organisms to metabolize these azole fungicides. Thus, some azole fungicides may be more prone to contaminate the food web than others (soils, plants, invertebrates, etc.), and as a result, blackbirds may ingest higher quantities of some azoles relative to others. It is also possible that blackbirds better adsorb some azoles than others. Similarly, blackbirds, and wild vertebrates in general, may metabolize some azoles quicker than others. Indeed, a recent study has shown that tebuconazole and its metabolites can be found at higher concentrations in some tissues (brain, liver, kidney) than others (muscle, plasma) after ingestion of coated seeds (Gross et al., 2020). Although we know that azole fungicides can contaminate vertebrates through ingestion of contaminated food, inhalation of azoles or cutaneous absorption, the relative importance of these routes of contamination by azole fungicides remain currently poorly understood in wild vertebrates. Our study clearly shows that different azoles are more likely to be transferred to plasma than others, and

potentially that some azoles may be of greater concerns than others for human health and wildlife. However, complementary studies are definitely needed to better understand the metabolism and the elimination of azoles fungicides in wild vertebrates (see Hao et al., 2021 for an example).

*What effects of azole fungicides?*

Despite important difference in plasma levels of azole fungicides between the three habitats, we did not report any strong difference in three proxies of health status between these habitats. Indeed, hematocrit levels and feather density were similar between the vineyard, the urban and the forest habitats. We found that urban birds were in better condition than vineyard blackbirds, but it is very unlikely to be related to the contamination by azoles. Indeed, vineyard blackbirds were of similar body condition than forest blackbirds despite much higher levels of azoles in their plasma. We only found a significant and positive relationship between body condition and difenoconazole levels in female blackbirds living in vineyards, suggesting that this azole may disrupt metabolic functions and lead to a higher body condition. Indeed, previous studies have found that this specific azole can impair reproduction in vertebrates (e.g., Lopez-Antia et al., 2013). However, we must remain very cautious because this relationship was found in females only and was therefore associated with a limited sample size. As recently shown, azole fungicides can disappear quite quickly from the plasma after ingestion or inhalation (Gross et al., 2020; Hao et al., 2021). This fast elimination from the plasma could also explain why we did not find strong correlations between plasma levels of azoles and our proxies of health status. This may also explain why we did not find any significant relationship between the plasma levels of azoles and our proxies of health status.

Despite the lack of strong evidence for detrimental effects of azole contamination on health status in wild blackbirds, we must remain very cautious regarding the potential impact of these fungicides on the health of wild vertebrates. Firstly, we only focused on three ecological traits that are known to be affected by multiple environmental factors (e.g., food abundance, weather). This means that other environmental variables may mask potential effects of azole fungicides on these proxies of health status. Secondly, we were not able to test the influence of this contamination on performance, such as survival and reproduction. These two variables are known crucial because they will determine the fitness of the individual. Although the impact of azole fungicides on survival has never been tested to our knowledge, a few studies have shown that some azoles can reduce breeding performance in wild vertebrates (Fernández-Vizcaíno et al., 2020; Grote et al., 2008; Lopez-Antia et al., 2021, 2013). Secondly, a few studies have shown that azole fungicides can have an important impact on several physiological mechanisms such as glucose and protein regulation, mitochondrial function, and endocrine mechanisms (Cao et al., 2019; Li et al., 2019; Souders et al., 2019). Finally, we have also demonstrated that the plasma levels of azole fungicides are especially high in June/July, which corresponds to the period of reproduction and to the period of development for many vertebrate species. Accordingly, we found that juveniles were as contaminated as adult blackbirds despite the fact that they were born only a few weeks before capture and sampling. This means that juveniles can bear very high levels of plasma azoles during the ontogenetic phase of their organismal systems. This also suggests that the timing of release of azoles in the environment may be particularly detrimental for wild vertebrate species, especially because previous studies have found negative impacts of azole fungicides on reproduction and development in vertebrates (e.g., Fernández-Vizcaíno et al., 2020; Lopez-Antia et al., 2021). In our study, we reported for the first time the levels of contamination by azoles for wild birds living in vineyards. Based on these results, further experimental studies are now required to reliably test the impact of



environmentally realistic doses of azole fungicides on physiological systems and performance of vertebrates.

#### Acknowledgements

This research has been funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR project URBASTRESS, ANR-16-CE02-0004-01 to F.A., and ANR project VITIBIRD to F.A.), by the Région Nouvelle-Aquitaine (MULTISTRESS project), by the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du travail (ANSES project BiodiTox # 2019/1/031) and by the Centre National de la Recherche Scientifique.

**Table 1:** Concentrations of azoles in the passive air samplers that were deployed in the vineyard and the forest habitats. PUFs were deployed for approximately a month before to be replaced by a new one. The concentrations of azoles were calculated in  $\text{ng.m}^{-3}$  after taking into account the duration of deployment of each PUF and an estimated air sampling rate for the PUFs ( $4.5 \text{ m}^{-3}.\text{day}^{-1}$ , see Chaemfa et al., 2008).

Date of PUF deployment	Forest						Vineyard					
	Dec 9	Jan 12	Feb 15	Mar 14	Apr 13	Jun 2	Dec 9	Jan 12	Feb 15	Mar 14	Apr 13	Jun 2
Date of PUF retrieval	Jan 12	Feb 15	Mar 14	Apr 13	Jun 2	Jul 7	Jan 12	Feb 15	Mar 14	Apr 13	Jun 2	Jul 7
Cyproconazole	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2.3E-02	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2.6E-02	1.9E-02	< LOQ
Difenoconazole	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2.4E-02
Epoxiconazole	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	4.0E-02	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	5.8E-02	< LOQ
Fenbuconazole	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2.7E-02	8.7E-01
Flusilazole	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Flutriafol	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Imazalil	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Metconazole	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1.3E-02	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1.7E-02	< LOQ
Penconazole	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	3.6E-01
Prochloraz	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Propiconazole	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1.4E-02	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1.3E-02	< LOQ
Tebuconazole	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1.5E-02	7.6E-02	2.5E-02	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	3.3E-01	6.6E-01
Tetraconazole	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2.9E-01	6.2E-01
Triadimefon	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Triadimenol	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

**Table 2:** Frequency of quantification for multiple azoles in plasma samples of blackbirds from the urban, the forest and the vineyards habitats in 2016 and 2019. Note that the urban habitat was not studied in 2019.

2016												
Urban (n = 22)				Forest (n = 28)				Vineyard (n = 28)				
Concentrations (pg.g <sup>-1</sup> plasma)	Frequency (%)	Range (min-max)	Median	Mean ± SD	Frequency (%)	Range (min-max)	Median	Mean ± SD	Frequency (%)	Range (min-max)	Median	Mean ± SD
Cyproconazole	0%	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-
Difenoconazole	0%	-	-	-	0%	-	-	-	39%	10 - 156.7	24.4	47.9 ± 49.1
Epoxiconazole	0%	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-
Fenbuconazole	0%	-	-	-	0%	-	-	-	29%	33.3 - 945	155.3	287.3 ± 314.3
Flusilazole	0%	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-
Flutriafol	0%	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-
Imazalil	0%	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-
Metconazole	0%	-	-	-	7%	35.3 - 48.6	41.95	42 ± 9.4	4%	34.6 - 34.6	34.6	34.6
Penconazole	0%	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-
Prochloraz	0%	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-
Propiconazole	0%	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-
Tebuconazole	0%	-	-	-	11%	62.7 - 281.3	63	135.7 ± 126.1	54%	36.9 - 521.8	105.5	175.4 ± 151.6
Tetraconazole*	0%	-	-	-	14%	71.5 - 276.8	132.2	153.2 ± 95.6	89%	28.5 - 59976.5 28.5 - 8729.4	356.9 285	3545.2 ± 11910.3 1045.2 ± 1836.8
Tradiméfon	0%	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-
Triadimenol	0%	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-

2019												
Urban (n = 0)				Forest (n = 6)				Vineyard (n = 34)				
Concentrations (pg.g <sup>-1</sup> plasma)	Frequency (%)	Range (min-max)	Median	Mean ± SD	Frequency (%)	Range (min-max)	Median	Mean ± SD	Frequency (%)	Range (min-max)	Median	Mean ± SD
Cyproconazole	-	-	-	-	17%	48.4 - 48.4	48.38	48.4 ± NA	6%	78.2 - 211.6	144.9	144.9 ± 94.4
Difenoconazole	-	-	-	-	0%	-	-	-	15%	18.2 - 85.3	23.27	36.3 ± 28.3
Epoxiconazole	-	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-
Fenbuconazole	-	-	-	-	0%	-	-	-	6%	40.1 - 55.3	47.715	47.7 ± 10.7
Flusilazole	-	-	-	-	0%	-	-	-	3%	16.4 - 16.4	16.35	16.4
Flutriafol	-	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-
Imazalil	-	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-
Metconazole	-	-	-	-	0%	-	-	-	6%	65.2 - 167.4	116.285	116.3 ± 72.3
Penconazole	-	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-
Prochloraz	-	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-
Propiconazole	-	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-
Tebuconazole	-	-	-	-	17%	83.7 - 83.7	83.7	83.7 ± NA	15%	26 - 222.2	36.2	70.7 ± 84.9
Tetraconazole	-	-	-	-	0%	-	-	-	97%	24.3 - 8341.4	332.96	1302.5 ± 2054.2
Tradiméfon	-	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-
Triadimenol	-	-	-	-	0%	-	-	-	0%	-	-	-

**Table 3:** Relationships between the plasma levels of azoles and body condition in blackbirds that were sampled in the vineyard habitat in 2019. The influence of status (juveniles, adult males, adult females), the date of sampling, and plasma levels of azoles on body condition was tested by using General Linear models (GLM). Plasma levels of azoles were log transformed. Only four azoles were used because the other ones were detected in a limited number of birds only (less than 15% of the sampled birds). The relationship between the plasma levels of fenbuconazole and body condition was tested in juveniles only because fenbuconazole was not quantified in enough adult blackbirds.

	Dependent variable	Independent variable	df	F	P
A	Body condition	status	2,55	0.38	0.621
		<b>date</b>	<b>1,55</b>	<b>7.91</b>	<b>0.007</b>
		<b>difenoconazole</b>	<b>1,55</b>	<b>6.34</b>	<b>0.015</b>
		<b>difenoconazole x status</b>	<b>2,55</b>	<b>4.10</b>	<b>0.022</b>
B	Body condition*	date	1,27	0.30	0.587
		fenbuconazole	1,27	0.38	0.541
C	Body condition	status	2,55	1.58	0.215
		<b>date</b>	<b>1,55</b>	<b>7.98</b>	<b>0.007</b>
		tebuconazole	1,55	0.54	0.466
		tebuconazole x status	2,55	1.85	0.167
D	Body condition	status	2,55	0.40	0.674
		<b>date</b>	<b>1,55</b>	<b>7.62</b>	<b>0.006</b>
		tetraconazole	1,55	1.85	0.174
		tetraconazole x status	2,55	0.73	0.481

**Table 4:** Relationships between the plasma levels of azoles and feather density in blackbirds that were sampled in the vineyard habitat in 2019. The influence of status (juveniles, adult males, adult females), the date of sampling, and plasma levels of azoles on feather density was tested by using General Linear models (GLM). Plasma levels of azoles were log transformed. Only four azoles were used because the other ones were detected in a limited number of birds only (less than 15% of the sampled birds). The relationship between the plasma levels of fenbuconazole and feather density was tested in juveniles only because fenbuconazole was not quantified in enough adult blackbirds.

	Dependent variable	Independent variable	df	F	P
A	Feather density	status	2,50	1.09	0.344
		date	1,50	0.92	0.341
		difenoconazole	1,50	1.48	0.230
		difenoconazole x status	2,50	1.51	0.231
B	Feather density*	date	1,24	0.38	0.541
		fenbuconazole	1,24	0.29	0.595
C	Feather density	status	2,50	0.25	0.776
		date	1,50	2.07	0.157
		tebuconazole	1,50	0.11	0.744
		tebuconazole x status	2,50	0.1	0.909
D	Feather density	status	2,50	1.10	0.341
		date	1,50	1.29	0.261
		tetraconazole	1,50	0.01	0.915
		tetraconazole x status	2,50	0.31	0.732

## Figure legends

**Figure 1:** Azole air concentrations ( $\text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$ ) derived from deployments of PUF disk passive air samplers in the protected forest habitat (green) or in the Cognac vineyard (red) between December 2016 and July 2017. Difenoconazole (A), fenbuconazole (B), tebuconazole (C), and tetraconazole (D) were not quantified in the PUF from December to March-April in both habitats, but their air concentrations increased from April to July in the vineyard habitat.

**Figure 2:** Plasma levels of the azoles that were quantified in at least 15% of the captured birds in the Cognac vineyard (A: difenoconazole, B: fenbuconazole, C: tebuconazole, D: tetraconazole). The birds that were captured in 2016 and 2019 are represented in black and white respectively. Julian date represents the date with the 1<sup>st</sup> of January being represented by the number 1. Plasma levels of difenoconazole, fenbuconazole, and tetraconazole significantly increased through the season. Plasma levels of difenoconazole, fenbuconazole, and tebuconazole were significantly higher in 2016 relative to 2019. Note that the scales are different between the four azoles.

**Figure 3:** Influence of age and sex on plasma levels of the azoles that were quantified in at least 15% of the captured birds in the Cognac vineyard (A: difenoconazole, B: fenbuconazole, C: tebuconazole, D: tetraconazole). Plasma levels of difenoconazole, fenbuconazole, tebuconazole, and tetraconazole did not significantly differ between juveniles (grey), adult males (black), and adult females (white). Data are expressed as means  $\pm$  standard errors.

**Figure 4:** Influence of age, sex and habitat on body condition (A) and feather density (B) in blackbirds. Urban birds were in better condition than vineyard and forest birds. Adult females (white) were also in better condition than adult males (black) and juveniles (grey). Data are expressed as means  $\pm$  standard errors.

**Figure 1:**

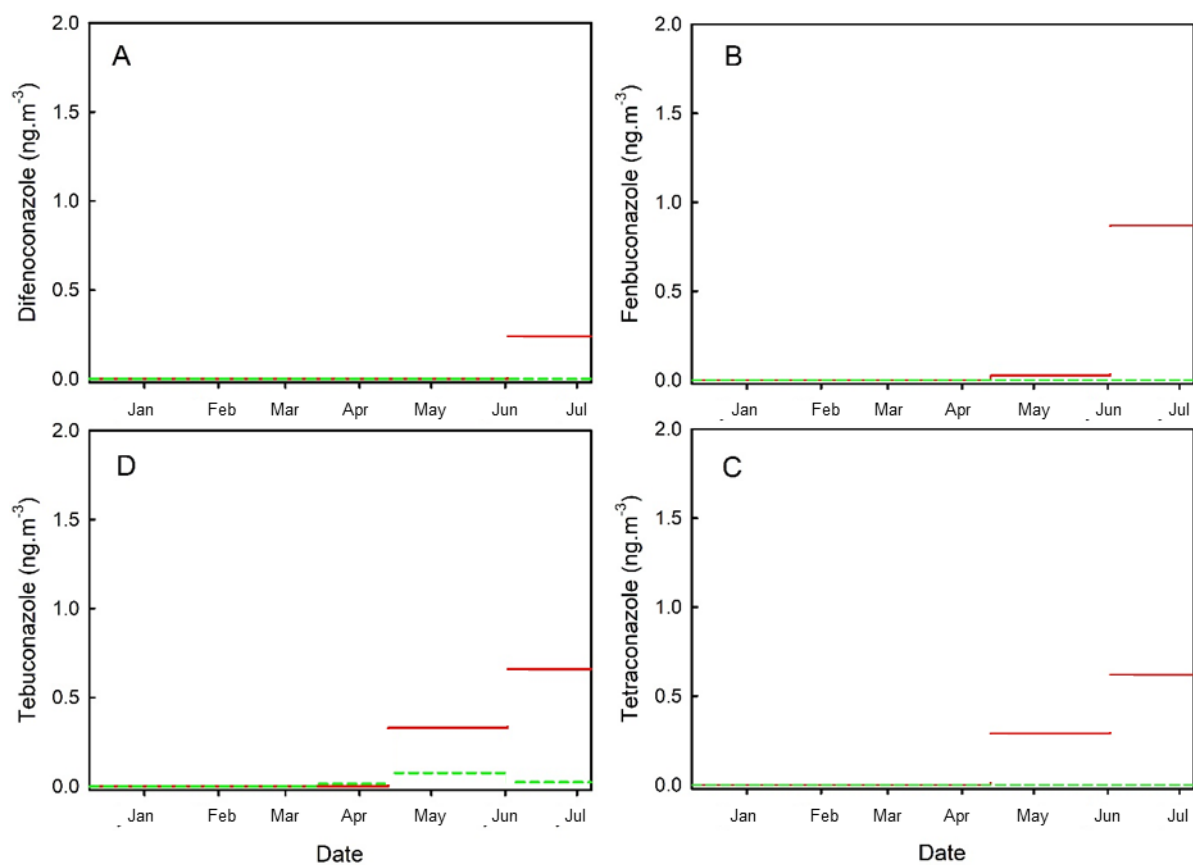
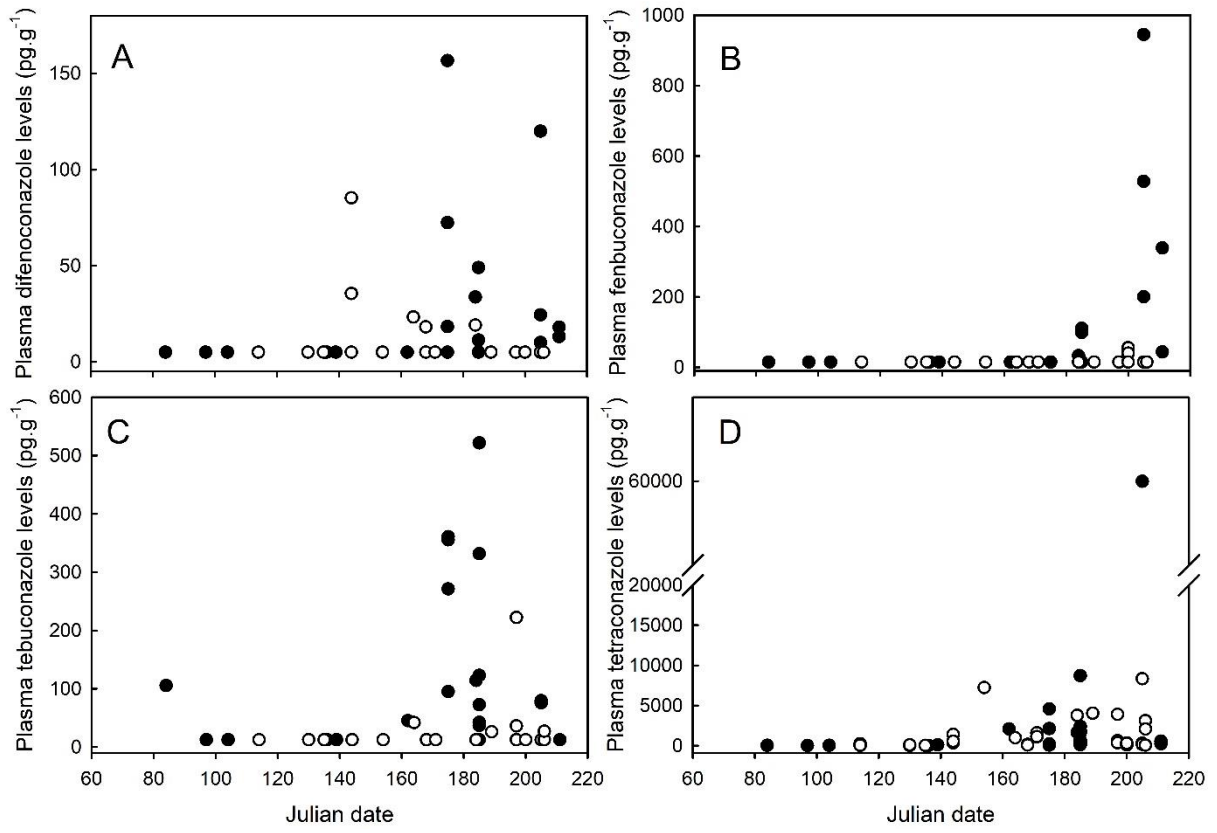
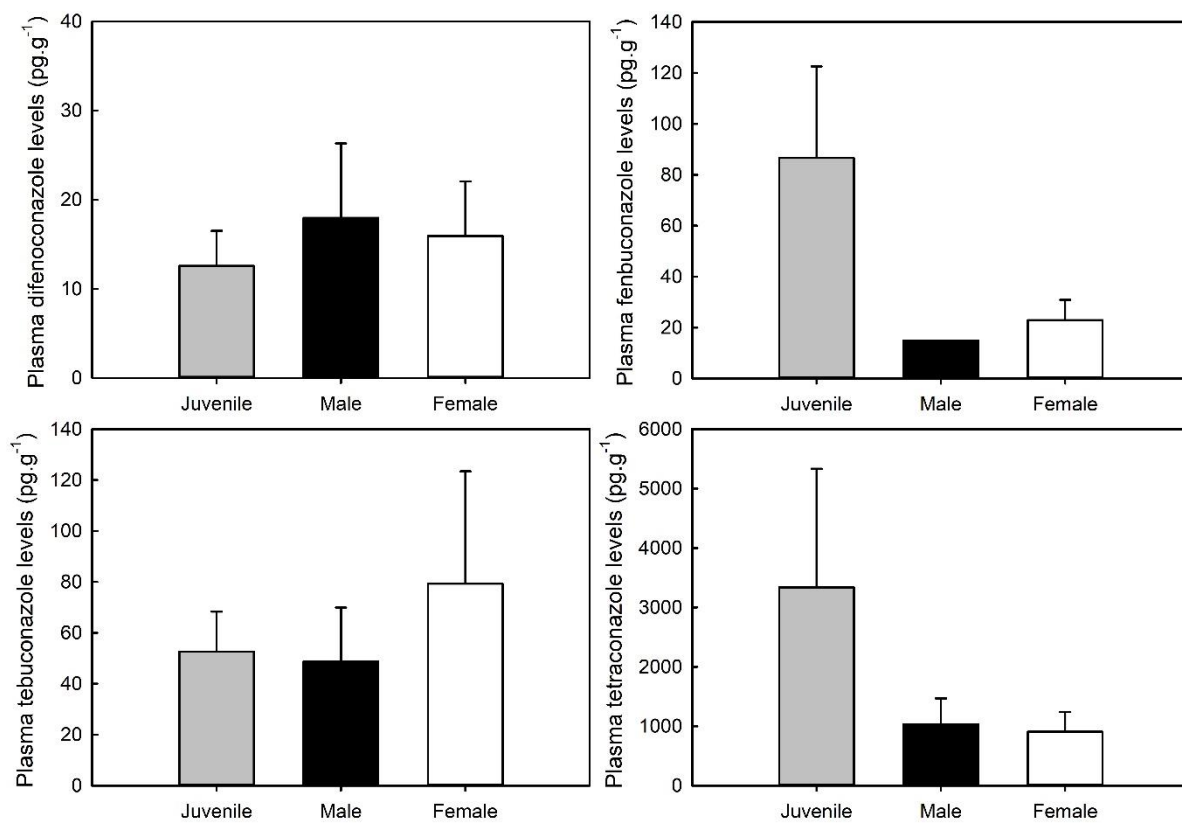


Figure2:

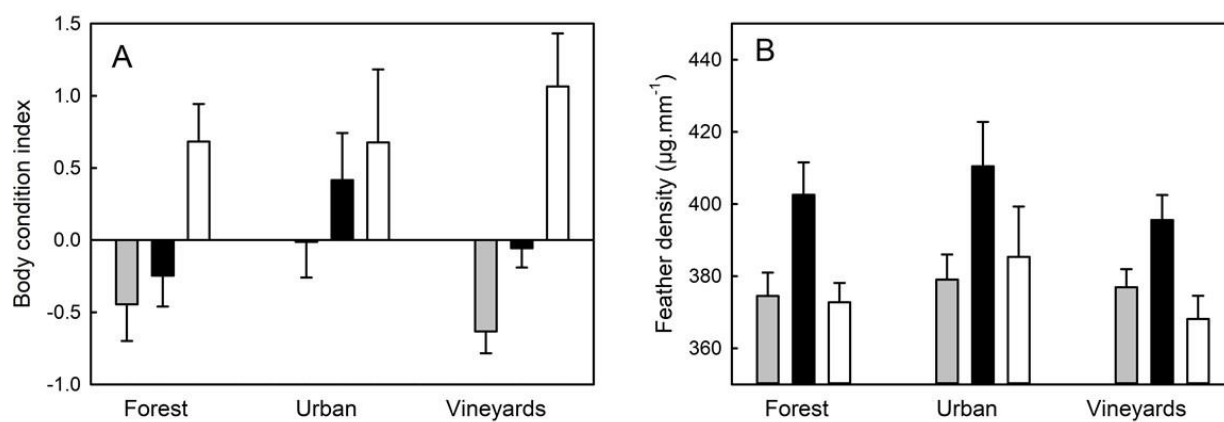




**Figure 3:**



**Figure 4:**



## References

- Benton, T.G., Vickery, J.A., Wilson, J.D., 2003. Farmland biodiversity: is habitat heterogeneity the key? *Trends in Ecology & Evolution* 18, 182–188. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00011-9)
- Bro, E., Millot, F., Decors, A., Devillers, J., 2015. Quantification of potential exposure of gray partridge (*Perdix perdix*) to pesticide active substances in farmlands. *Science of The Total Environment* 521–522, 315–325. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.073>
- Cao, F., Souders, C.L., Li, P., Pang, S., Qiu, L., Martyniuk, C.J., 2019. Developmental toxicity of the triazole fungicide cyproconazole in embryo-larval stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Pollut Res* 26, 4913–4923. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3957-z>
- Carisse, O. (Ed.), 2010. Fungicides. BoD – Books on Demand.
- Ccancapa, A., Masiá, A., Navarro-Ortega, A., Picó, Y., Barceló, D., 2016. Pesticides in the Ebro River basin: Occurrence and risk assessment. *Environmental Pollution* 211, 414–424. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.059>
- Chaemfa, C., Barber, J.L., Gocht, T., Harner, T., Holoubek, I., Klanova, J., Jones, K.C., 2008. Field calibration of polyurethane foam (PUF) disk passive air samplers for PCBs and OC pesticides. *Environmental Pollution* 156, 1290–1297. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.03.016>
- Coscollà, C., Colin, P., Yahyaoui, A., Petrique, O., Yusà, V., Mellouki, A., Pastor, A., 2010. Occurrence of currently used pesticides in ambient air of Centre Region (France). *Atmospheric Environment* 44, 3915–3925. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2010.07.014>
- Cui, K., Wu, X., Zhang, Y., Cao, J., Wei, D., Xu, J., Dong, F., Liu, X., Zheng, Y., 2021. Cumulative risk assessment of dietary exposure to triazole fungicides from 13 daily-consumed foods in China. *Environmental Pollution* 286, 117550. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117550>
- Daniele, G., Lafay, F., Pelosi, C., Fritsch, C., Vulliet, E., 2018. Development of a method for the simultaneous determination of multi-class pesticides in earthworms by liquid chromatography coupled to tandem electrospray mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410, 5009–5018. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1151-2>
- Estellano, V.H., Pozo, K., Harner, T., Corsolini, S., Focardi, S., 2012. Using PUF disk passive samplers to simultaneously measure air concentrations of persistent organic pollutants (POPs) across the Tuscany Region, Italy. *Atmospheric Pollution Research* 3, 88–94. <https://doi.org/10.5094/APR.2012.008>
- European Centre for Disease Prevention and Control., 2013. Risk assessment on the impact of environmental usage of triazoles on the development and spread of resistance to medical triazoles in *Aspergillus* species. Publications Office, LU.
- Fernández-Vizcaíno, E., Fernández de Mera, I.G., Mougeot, F., Mateo, R., Ortiz-Santaliestra, M.E., 2020. Multi-level analysis of exposure to triazole fungicides through treated seed ingestion in the red-legged partridge. *Environmental Research* 189, 109928. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109928>
- Fritsch, C., Coeurdassier, M., Faivre, B., Baurand, P.-E., Giraudoux, P., van den Brink, N.W., Scheifler, R., 2012. Influence of landscape composition and diversity on contaminant flux in terrestrial food webs: A case study of trace metal transfer to European blackbirds *Turdus merula*. *Science of The Total Environment* 432, 275–287. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.004>
- Fustinoni, S., Mercadante, R., Polledri, E., Rubino, F.M., Mandic-Rajcevic, S., Vianello, G., Colosio, C., Moretto, A., 2014. Biological monitoring of exposure to tebuconazole in

- winegrowers. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 24, 643–649. <https://doi.org/10.1038/jes.2014.14>
- Gardner, B., 1996. European Agriculture: Policies, Production and Trade.
- Gianessi, L., Reigner, N., 2006. The Importance of Fungicides in U.S. Crop Production. *Outlook Pest Man* 17, 209–213. <https://doi.org/10.1564/17oct06>
- Green, M.B., Spilker, D.A. (Eds.), 1986. *Fungicide Chemistry: Advances and Practical Applications*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC. <https://doi.org/10.1021/bk-1986-0304>
- Gross, M.S., Bean, T.G., Hladik, M.L., Rattner, B.A., Kuivila, K.M., 2020. Uptake, Metabolism, and Elimination of Fungicides from Coated Wheat Seeds in Japanese Quail (*Coturnix japonica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68, 1514–1524. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05668>
- Grote, K., Niemann, L., Selzsam, B., Haider, W., Gericke, C., Herzler, M., Chahoud, I., 2008. Epoxiconazole causes changes in testicular histology and sperm production in the Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Environ Toxicol Chem* 27, 2368. <https://doi.org/10.1897/08-048.1>
- Grube, A., Donaldson, D., Kiely, T., Wu, L., 2011. Pesticides Industry Sales and Usage - 2006 and 2007 Market Estimates.
- Guarda, P.M., Gualberto, L. da S., Mendes, D.B., Guarda, E.A., da Silva, J.E.C., 2020. Analysis of triazines, triazoles, and benzimidazoles used as pesticides in different environmental compartments of the Formoso River and their influence on biodiversity in Tocantins. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 55, 783–793. <https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1784667>
- Hao, W., Zhang, Y., Xu, P., Xie, Y., Li, W., Wang, H., 2021. Enantioselective accumulation, elimination and metabolism of fenbuconazole in lizards (*Eremias argus*). *Chemosphere* 271, 129482. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129482>
- Komárek, M., Čadková, E., Chrástný, V., Bordas, F., Bollinger, J.-C., 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International* 36, 138–151. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.10.005>
- Lanz, B., Dietz, S., Swanson, T., 2018. The Expansion of Modern Agriculture and Global Biodiversity Decline: An Integrated Assessment. *Ecological Economics* 144, 260–277. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2017.07.018>
- Li, S., Wu, Q., Sun, Q., Coffin, S., Gui, W., Zhu, G., 2019. Parental exposure to tebuconazole causes thyroid endocrine disruption in zebrafish and developmental toxicity in offspring. *Aquatic Toxicology* 211, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.04.002>
- Lopez-Antia, A., Feliu, J., Camarero, P.R., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mateo, R., 2016. Risk assessment of pesticide seed treatment for farmland birds using refined field data. *J Appl Ecol* 53, 1373–1381. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12668>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., Camarero, P.R., Mateo, R., 2021. Birds feeding on tebuconazole treated seeds have reduced breeding output. *Environmental Pollution* 271, 116292. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116292>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., Mateo, R., 2013. Experimental exposure of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to seeds coated with imidacloprid, thiram and difenoconazole. *Ecotoxicology* 22, 125–138. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-1009-x>
- Mateo, R., Petkov, N., Lopez-Antia, A., Rodríguez-Estival, J., Green, A.J., 2016. Risk assessment of lead poisoning and pesticide exposure in the declining population of red-breasted goose (*Branta ruficollis*) wintering in Eastern Europe. *Environmental Research* 151, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.07.017>

- Meillère, A., Brischoux, F., Bustamante, P., Michaud, B., Parenteau, C., Marciau, C., Angelier, F., 2016. Corticosterone levels in relation to trace element contamination along an urbanization gradient in the common blackbird (*Turdus merula*). *Science of The Total Environment* 566–567, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.014>
- Mercadante, R., Polledri, E., Rubino, F.M., Mandic-Rajcevic, S., Vaiani, A., Colosio, C., Moretto, A., Fustinoni, S., 2019. Assessment of penconazole exposure in winegrowers using urinary biomarkers. *Environmental Research* 168, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.09.013>
- Mohring, B., Brischoux, F., Angelier, F., 2021. Vineyards, but not cities, are associated with lower presence of a generalist bird, the Common Blackbird (*Turdus merula*), in Western France. *Avian Res* 12, 3. <https://doi.org/10.1186/s40657-020-00239-0>
- Moore, D., Robson, G.D., Trinci, A.P.J., 2020. *21st Century Guidebook to Fungi*. Cambridge University Press.
- Morton, V., Staub, T., 2008. A Short History of Fungicides. *APSnet Features*. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2008-0308>
- Mottes, C., Lesueur-Jannoyer, M., Le Bail, M., Malézieux, E., 2014. Pesticide transfer models in crop and watershed systems: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 34, 229–250. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0176-3>
- Muratet, A., Fontaine, B., 2015. Contrasting impacts of pesticides on butterflies and bumblebees in private gardens in France. *Biological Conservation* 182, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.045>
- Pelosi, C., Bertrand, C., Daniele, G., Coeurdassier, M., Benoit, P., Nélieu, S., Lafay, F., Bretagnolle, V., Gaba, S., Vulliet, E., Fritsch, C., 2021. Residues of currently used pesticides in soils and earthworms: A silent threat? *Agriculture, Ecosystems & Environment* 305, 107167. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107167>
- Politi Bertoncini, A., Machon, N., Pavoine, S., Muratet, A., 2012. Local gardening practices shape urban lawn floristic communities. *Landscape and Urban Planning* 105, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2011.11.017>
- Polledri, E., Mercadante, R., Fustinoni, S., 2018. Determination of tebuconazole and penconazole fungicides in rat and human hair by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 32, 1243–1249. <https://doi.org/10.1002/rcm.8153>
- Pozo, K., Harner, T., Wania, F., Muir, D.C.G., Jones, K.C., Barrie, L.A., 2006. Toward a Global Network for Persistent Organic Pollutants in Air: Results from the GAPS Study. *Environmental Science & Technology* 40, 4867–4873. <https://doi.org/10.1021/es060447t>
- Raherison, C., Baldi, I., Pouquet, M., Berteaud, E., Moesch, C., Bouvier, G., Canal-Raffin, M., 2019. Pesticides Exposure by Air in Vineyard Rural Area and Respiratory Health in Children: A pilot study. *Environmental Research* 169, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.002>
- Scheifler, R., Coeurdassier, M., Morilhat, C., Bernard, N., Faivre, B., Flicoteaux, P., Giraudoux, P., Noël, M., Piotte, P., Rieffel, D., de Vaufléury, A., Badot, P.-M., 2006. Lead concentrations in feathers and blood of common blackbirds (*Turdus merula*) and in earthworms inhabiting unpolluted and moderately polluted urban areas. *Science of The Total Environment* 371, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.09.011>
- Schoustra, S.E., Debets, A.J.M., Rijs, A.J.M.M., Zhang, J., Snelders, E., Leendertse, P.C., Melchers, W.J.G., Rietveld, A.G., Zwaan, B.J., Verweij, P.E., 2019. Environmental Hotspots for Azole Resistance Selection of *Aspergillus fumigatus*, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 1347–1353. <https://doi.org/10.3201/eid2507.181625>

- Schummer, C., Salquère, G., Briand, O., Millet, M., Appenzeller, B.M.R., 2012. Determination of farm workers' exposure to pesticides by hair analysis. *Toxicology Letters* 210, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.019>
- Souders, C.L., Xavier, P., Perez-Rodriguez, V., Ector, N., Zhang, J.-L., Martyniuk, C.J., 2019. Sub-lethal effects of the triazole fungicide propiconazole on zebrafish (*Danio rerio*) development, oxidative respiration, and larval locomotor activity. *Neurotoxicology and Teratology* 74, 106809. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2019.106809>
- Sun, Y., Cao, Y., Tong, L., Tao, F., Wang, X., Wu, H., Wang, M., 2020. Exposure to prothioconazole induces developmental toxicity and cardiovascular effects on zebrafish embryo. *Chemosphere* 251, 126418. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126418>
- Tilman, D., Clark, M., Williams, D.R., Kimmel, K., Polasky, S., Packer, C., 2017. Future threats to biodiversity and pathways to their prevention. *Nature* 546, 73–81. <https://doi.org/10.1038/nature22900>
- Toda, M., Beer, K.D., Kuivila, K.M., Chiller, T.M., Jackson, B.R., 2021. Trends in Agricultural Triazole Fungicide Use in the United States, 1992–2016 and Possible Implications for Antifungal-Resistant Fungi in Human Disease. *Environ Health Perspect* 129, EHP7484, 055001. <https://doi.org/10.1289/EHP7484>
- Tuduri, L., Harner, T., Hung, H., 2006. Polyurethane foam (PUF) disks passive air samplers: Wind effect on sampling rates. *Environmental Pollution* 144, 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.047>
- Vanden Bossche, H., 1985. Biochemical Targets for Antifungal Azole Derivatives: Hypothesis on the Mode of Action, in: McGinnis, M.R. (Ed.), *Current Topics in Medical Mycology*, Current Topics in Medical Mycology. Springer New York, New York, NY, pp. 313–351. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-9547-8\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-9547-8_12)
- Wilby, A., Thomas, M.B., 2002. Natural enemy diversity and pest control: patterns of pest emergence with agricultural intensification. *Ecol Letters* 5, 353–360. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2002.00331.x>
- Zambonin, C.G., Cilenti, A., Palmisano, F., 2002. Solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for the rapid screening of triazole residues in wine and strawberries. *Journal of Chromatography A* 967, 255–260. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00780-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00780-X)
- Zhang, X., Luo, Y., Goh, K.S., 2018. Modeling spray drift and runoff-related inputs of pesticides to receiving water. *Environmental Pollution* 234, 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.032>

## Annexes

**Annex 1:** Limit of quantification (LOQ, ng.PUF<sup>-1</sup>) and mean recoveries (%) for each azole in PUF samples. Mean recoveries were always comprised between 60 and 105 except for difenoconazole and prochloraz.

	LOQ (ng.PUF <sup>-1</sup> )	Mean recoveries $\pm$ SD (n = 3)
Cyproconazole	2.65	93 $\pm$ 12 %
Difenoconazole	0.90	57 $\pm$ 11 %
Epoxiconazole	2.41	99 $\pm$ 18 %
Fenbuconazole	1.48	80 $\pm$ 10 %
Flusilazole	0.37	89 $\pm$ 2 %
Flutriafol	3.80	97 $\pm$ 11 %
Imazalil	0.25	102 $\pm$ 10 %
Metconazole	0.33	81 $\pm$ 4 %
Penconazole	0.33	78 $\pm$ 9 %
Prochloraz	2.94	41 $\pm$ 8 %
Propiconazole	1.24	87 $\pm$ 15 %
Tebuconazole	0.69	78 $\pm$ 3 %
Tetraconazole	2.38	103 $\pm$ 15 %
Triadimefon	0.25	103 $\pm$ 30 %
Triadimenol	0.14	74 $\pm$ 21 %

**Annex 2:** Probability to quantify azole in sampled blackbirds. For each of the four azoles that were quantified in more than 15% of samples (difenoconazole, fenbuconazole, tebuconazole, tetraconazole), general linear models were used to test the influence of the date of sampling, the year of sampling, and the status of individua on the probability to quantify a given azole (binomial distribution and logit link function).

### Difenoconazole

The probability to quantify difenoconazole in blackbirds was significantly affected by the date of sampling with an increasing probability to quantify difenoconazole levels throughout the season ( $\chi^2 = 5.59$ ,  $p = 0.018$ ). In addition, the probability to quantify difenoconazole was significantly higher in 2016 relative to 2019 ( $\chi^2 = 5.26$ ,  $p = 0.022$ ). Finally, the probability to quantify difenoconazole did not significantly differ between juveniles, adult males, and adult females ( $\chi^2 = 1.82$ ,  $p = 0.402$ ).

### Fenbuconazole

The probability to quantify fenbuconazole in blackbirds was significantly affected by the date of sampling with an increasing probability to quantify fenbuconazole levels throughout the season ( $\chi^2 = 21.24$ ,  $p < 0.001$ ). In addition, the probability to quantify fenbuconazole was significantly higher in 2016 relative to 2019 ( $\chi^2 = 10.26$ ,  $p = 0.001$ ). Finally, the probability to quantify fenbuconazole did not significantly differ between juveniles, adult males, and adult females ( $\chi^2 = 0.39$ ,  $p = 0.822$ ).

### Tebuconazole

The probability to quantify tebuconazole in blackbirds was not significantly affected by the date of sampling despite a marginally non-significant positive trend ( $\chi^2 = 3.70$ ,  $p = 0.055$ ). In addition, the probability to quantify tebuconazole was significantly higher in 2016 relative to 2019 ( $\chi^2 = 10.48$ ,  $p = 0.001$ ). Finally, the probability to quantify tebuconazole did not significantly differ between juveniles, adult males, and adult females ( $\chi^2 = 0.03$ ,  $p = 0.986$ ).

### Tetraconazole

The probability to quantify tetraconazole in blackbirds was significantly affected by the date of sampling with an increasing probability to quantify tetraconazole levels throughout the season ( $\chi^2 = 9.58$ ,  $p = 0.002$ ). However, the probability to quantify tetraconazole did not significantly differ between 2016 and 2019 ( $\chi^2 = 1.30$ ,  $p = 0.254$ ). Finally, the probability to quantify tetraconazole did not significantly differ between juveniles, adult males, and adult females ( $\chi^2 = 1.38$ ,  $p = 0.500$ ).





Publication n°3 : Plasmatic levels of neonicotinoids as indicators of global exposure of contrasted wild birds species

## Title

**Plasmatic levels of neonicotinoids as indicators of global exposure of contrasted wild birds species**

## Journal

Science of the Total Environment

## Name

Louise Prouteau <sup>a,b</sup>, Frédéric Angelier <sup>a</sup>, Christophe Barbraud <sup>a</sup>, Marie-Hélène Devier<sup>c</sup>, Julien Gernigon <sup>d</sup>, William Jouanneau <sup>a</sup>, Jean-Christophe Lemesle <sup>d</sup>, Raphaël Musseau <sup>f</sup>, Patrick Pardon<sup>b</sup>, Frederic Robin, Manrico Sebastiano, Olivier Chastel <sup>a</sup>, Hélène Budzinski <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Centre d'Etudes Biologiques de Chizé (CEBC), UMR 7372-ULR CNRS, Villiers-en-Bois F-79360, France

<sup>b</sup> University of Bordeaux, EPOC, UMR 5805, LPTC Research Group, Talence F-33400, France

<sup>c</sup> CNRS, EPOC, UMR 5805, LPTC Research Group, Talence F-33400, France

<sup>d</sup> Réserve Naturelle de Lilleau des Niges, 17880, France

<sup>e</sup> Ligue pour la Protection des Oiseaux (LPO), 17300 Rochefort, France

<sup>f</sup> BioSphère Environnement

## Keywords

Weak signals

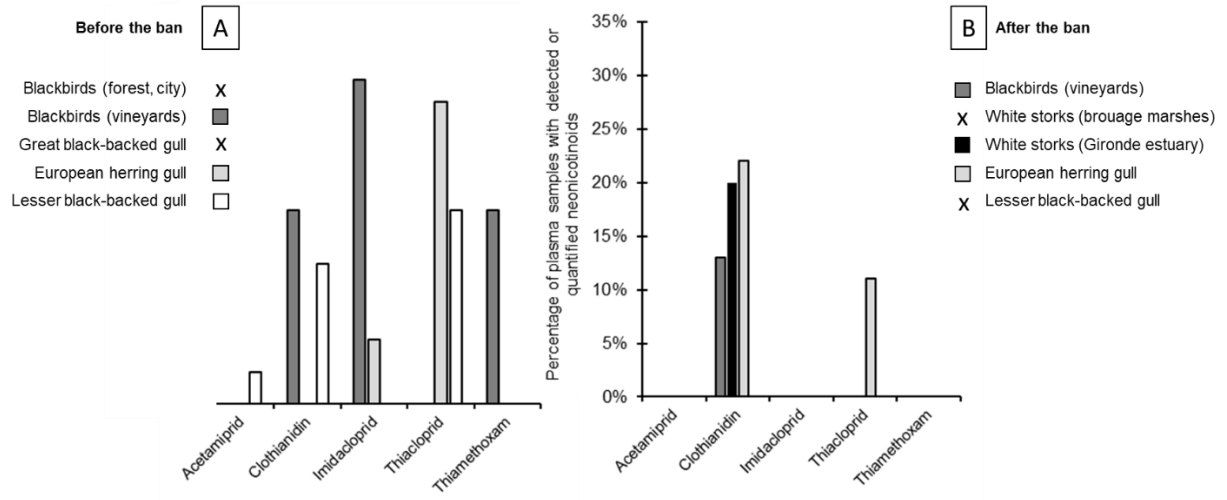
Neonicotinoids

Wildlife plasma

LC-MS/MS

On line SPE

## Graphical abstract



Percentage of sample between LOD-LOQ and above LOQ for the 5 detected neonicotinoids in the birds species depending their habitat area and the sampling year before or after the ban of neonicotinoids in France.

## **Abstract**

An efficient method by on line SPE coupled with LC-MS/MS to analyse neonicotinoids in plasma has been validated and described in this publication. So far, most studies developed direct injection preceded by time-consuming preparation steps. The method determines eight neonicotinoids (acetamiprid, clothianidin, cycloxaprid, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, thiacloprid and thiamethoxam) and two others molecules with identical action as neonicotinoid flupyradifurone and sulfoxaflor. The method quantification limits are ranged between 4-600 pg.g<sup>-1</sup> plasma and good recoveries are obtained at two spiked concentrations. Method was applied to different bird species in order to assess their exposure in Nouvelle-Aquitaine Region located in France depending their habitat. Neonicotinoids were measured in blackbird plasma in 2016 (n = 21) and 2019 (n = 15) in three areas, in white stork sampled in 2019 (n = 20) in two locations, in three gulls species from 2016 to 2020 including great black-backed gull (n = 8), European herring gull (n = 27) and lesser black-backed gull (n = 52). Our study show that several neonicotinoids were detected in the plasma of passerines, water birds and seabirds from south western France. The detection and quantification of neonicotinoid was the most frequent and highest in bird plasma from agricultural areas before the ban. Despite the ban on neonicotinoids issued by France in late 2018, clothianidin was still quantified in different bird species, which suggest their persistence in environmental compartment.

## 1- Introduction

Neonicotinoid insecticides were developed in the late 1970s to join the previously used pesticides organophosphates, carbamates or synthetic pyrethroids (Casida and Quistad, 1998). The first to be synthesized was the nithiazine but its photosensitivity prevents it from being used for agriculture (Kleier et al., 1985) (Soloway et al., 1978). Then, the use of other neonicotinoids has been increasing since the first, imidacloprid, was commercialised in 1991.

Neonicotinoids were authorised for application in over 120 countries (Nauen et al., 2008) including France. They have a unique mode of action at the nicotinic acetylcholine receptor in the central nervous system of insects. They have been generally considered highly effective and low toxic to mammals thanks to their higher selectivity to the insect receptors (Tomizawa and Casida, 2005). However, non-target species including honey bees have been strongly impacted by reducing the new queen production (Whitehorn et al., 2012) or honey production (Wood et al., 2018). Moreover, impacts of neonicotinoid exposure have been identified on other non-target invertebrates (Pisa et al., 2015) or vertebrates (Gibbons et al., 2015; Han et al., 2018) including birds ranging from direct mortality (Lopez-Antia et al., 2013) (Milot et al., 2015) to compromised body condition and breeding success (Eng et al., 2017).

For all these reasons, in September 2018, European Commission issued a ban on the use of three neonicotinoid substances as clothianidin, imidacloprid and thiamethoxam except for glasshouse crops. Since 2013, the use of these substances was already restricted during blooming. Two other substances with identical action as neonicotinoid, sulfoxaflor and flupyradifuron, have never been allowed in France.

During their extensive use and because of their physicochemical properties (small molecular weight and high water solubility (Gupta et al., 2008)), the probability of environmental contamination by neonicotinoids is high in soil and water but weak in air as they are not volatile ( $< 0.011$  mPA and  $20$  °C) (“Pesticide properties database (PPDB),” 2021). Neonicotinoid residues were reported in consumer products such as fruits (Hoffmann et al., 2010), wine (Berset et al., 2017) or honey all around the world (Mitchell et al., 2017). These substances can be found in soil (Bonmatin et al., 2021; Pelosi et al., 2021) and water (Ccanccapa et al., 2016; Peng et al., 2018). Neonicotinoids can persist in these two compartments several years after application (Chagnon et al., 2015) (Hladik et al., 2018) (Jones et al., 2014).

Then, non-targeted organisms could and still can be exposed to neonicotinoids through their presence in environment. Neonicotinoid transfer to organism was proved in rats (Kapoor et al., 2014) and in birds (Bean et al., 2019; Roy et al., 2020) were they have been quantified in human urine (López-Gálvez et al., 2020) and plasma (Luzardo et al., 2015).

Plasma has the advantage for being a non-destructive matrix for the captured animal (Espín et al., 2016) but available plasma volume required by laboratory analysis set restrictions for small-sized species. Considering the low bioaccumulation potential of neonicotinoids in mammals (Eng et al., 2021; Kapoor et al., 2014; Roy et al., 2020), sensitive methods using small volume of plasma are needed to reliably detect exposures. The first study to analyse neonicotinoid in wild bird blood require  $500$   $\mu$ L with limits of quantification (LOQ) from  $2000$  to  $10000$  pg/mL (Taliensky-Chamudis et al., 2017). Then, other publications described more sensitive methods with lower sample volume (Hao et al., 2018, 2016; Humann-Guillemot et al., 2021) with LOQ

in tens of pg/mL. Neonicotinoids have been quantified in wild birds plasma or blood in white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys*) (Hao et al., 2018), in Alpin Swift (*Tachymarptis melba*) (Humann-Guillemot et al., 2021), in Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*) (Taliensky-Chamudis et al., 2017), in European honey buzzard (*Pernis apivorus*) (Byholm et al., 2018). These field studies proved that songbirds have been exposed to neonicotinoids and they can also move up the top levels of the food-chain or contaminate birds having various diets. Contamination through use in different types of landscape have never been studied. This work will compare five bird species regarding their living area all situated in west France: Nouvelle-Aquitaine area. Landscape are various such as urban, forest, viticulture, cereal crops or marine. Plasma samples were analysed for 10 neonicotinoids by on line SPE coupled with LC-MS/MS. On-line SPE allowed automatic analysis with low manual preparation time. Therefore, a high number of plasma samples can be analysed (n = 154 in this work).

## 2- Material and methods

### a. Plasma sampling procedure and area

The blood samples collected from the three different bird species located in 'Région Nouvelle Aquitaine were kept in a cold container and centrifuged for 10 min at  $8000 \times g$  at 20 °C at the laboratory within a few hours after collection. After centrifugation, plasma and blood cells were separated and stored at -20 °C until laboratory analyses.

### Blackbirds

In this study, we focused on the European blackbird, which is a widespread passerine that is often used as an avian sentinel species in ecotoxicological studies (Fritsch et al., 2012) (Meillère et al., 2016). Blackbirds feed on earthworm insects (Fritsch et al., 2012), seeds and fruits. This species is commonly found in the study area and sampled in forests, cities and vineyards (Mohring et al., 2021). Birds were captured by using mist-nets that were located between bushes, trees, or along hedgerows.

All birds were captured during the breeding season in 2016 (n = 21) and 2019 (n = 15) in three areas consisting in forest (46°08'51"N, 0°25'27"W), urban (46°18'56"N, 0°28'58"W) and vineyard (45°50'N, 0°27'W). Blackbirds were captured in all three habitats in 2016 while they were only captured in the vineyards in 2019 between April and July. Firstly, birds were captured in a protected forest where human activities are extremely limited. This forest covers 2500 ha and is surrounded by arable lands and crops. There is no past or ongoing use of any neonicotinoid in this forest. Secondly, birds were captured in the city of Niort where neonicotinoids have been used until the 2018 national ban on neonicotinoids. Thirdly, birds were captured in the Cognac vineyard where neonicotinoids such as thiamethoxam were extensively used to protect the vines and the grapes against green leafhopper (*cicadella viridis*) until the ban.

Both juveniles and adult blackbirds were captured and their age and sex were determined by using plumage characteristics. For all captured individuals, a blood sample (600 µL) was collected by puncture of the brachial vein with a 26-gauge needle. All individuals were released within 15 minutes of capture.

## White storks

White storks were studied in the Gironde estuary marshes (45°25'N, 0°45'W) and in the Brouage marshes (45°50'N, 1°00'W), Charente-Maritime, western France, where a white stork population settled in the late 1970s (Barbraud et al., 1999) (Gadenne et al., 2014). The Brouage marshes ( $\approx 70 \text{ km}^2$ ) is a complex mosaic of wetland, grassland, freshwater marshes, small waterbodies and watercourses with very few arable land occupied by crops ( $< 1 \%$ ). The Gironde estuary marshes ( $\approx 55 \text{ km}^2$ ) is a mixed mosaic of intensive agricultural land (arable land with crops such as corn, barley, wheat, sunflower, soybean), vineyards, grassland, wetlands and watercourses. In Charente-Maritime, breeding white storks feed their chicks mainly with aquatic coleoptera, orthoptera, anuran and introduced crayfish (Barbraud et al., 2002). White stork chicks were sampled at Brouage ( $n = 10$  individuals) and Gironde estuary ( $n = 20$  individuals) in May and June 2019. Chicks were captured by hand at the nest before fledging when 30-45 days old during ringing operations as part of a long term study. Blood samples (2 mL) were taken from the tarsus vein with a heparinized 2.5 mL syringe and a 23-gauge needle (0.6 x 25 mm). All individuals were replaced on their nest within 15 minutes of capture.

## Gulls

A total of 87 breeding adult gulls with three different species: European herring gull (*Larus argentatus*) ( $n = 27$ ), lesser black-backed gull (*Larus fuscus*) ( $n = 52$ ), great black-backed gull (*Larus marinus*) ( $n = 8$ ) were captured during the incubation stage (may/june) on their nests using a nest trap (Sebastiano et al., 2021). They breed at the Lilleau des Niges Natural Reserve, are characterized by different foraging and migratory strategies, thus potentially differently exposed to neonicotinoids. Locations were recorded on GPS for some individual gulls: European herring gull ( $n = 11$ ), lesser black-backed gull ( $n = 21$ ), great black-backed gull ( $n = 8$ ). After capture, 2 mL of blood was collected from the alar vein using a 2.5 mL heparinized syringe and a 25-gauge needle. All individuals were released within 15 minutes of capture.

### b. Standard, reagents and consumables

Neonicotinoids (acetamiprid, clothianidin, cycloxaprid, imidacloprid, nitenpyram, thiacloprid, thiamethoxam) and internal standards, ILIS, (acetamiprid d3, clothianidin d3, imidacloprid d4, thiacloprid d4, thiamethoxam d3) were acquired from Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-La-Grande, France). Dinotefuran (neonicotinoid family), flupyradifurone (butenolides family), sulfoxaflor (sulfoximines family) were purchased from Techlab (Saint-Julien-lès-Metz, France). All the compounds standards had high chemical purities ( $> 95 \%$ ).

Stock solutions: native (containing the 10 native target compounds), ILIS solutions were each prepared in methanol at  $1 \mu\text{g.g}^{-1}$ . Each solutions were then diluted and prepared in acetonitrile at  $1 \text{ ng.g}^{-1}$ . These solutions were stored at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  and allowed to reach room temperature before use.

Acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) with both HPLC grade quality were supplied by Atlantic Labo (Bruges, France). Ammonium acetate was from Atlantic Labo (Bruges, France) while ammonium formate from Agilent Technologies (Les Ulis, France). Acid formic was



purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Milli-Q grade water was prepared in the laboratory from a Milli-Q system (Millipore SA, St Quentin les Yvelines, France). Chicken plasma was obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

1.5 mL click-fit microtubes were purchased from Dutscher (Brumath, France).

### **c. Plasma preparation**

Into 1.5 mL microtube, 25  $\mu\text{L}$  of quality control (chicken plasma) or plasma sample were weighed. 30  $\mu\text{L}$  of ILIS solution was added under gravimetric control ( $1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  prepared in the precipitation solvent acetonitrile). More precipitation solvent was added to have 150  $\mu\text{L}$  solvent in total. After a simple centrifugation step (14,000 g for 10 minutes), the supernatant was transferred to 2 mL LC-MS glass vials and diluted with 1025  $\mu\text{L}$  of Milli-Q water. The extracts final volume was 1200  $\mu\text{L}$ .

### **d. Analysis method**

Extracts were analysed by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) using an Agilent 6490 or 6495B Triple Quad mass spectrometer. Sample enrichment was achieved by on-line Solid-Phase Extraction (SPE) platform.

Extract was loaded during 1 minute onto a Poroshell 120 SB C18 guard column (5 x 2.1 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ) (Agilent) cartridge. 600  $\mu\text{L}$  were injected to analyse native neonicotinoids. All the other chromatographic parameters were the same as this previous publication (Prouteau et al., 2021 in submission), which has developed a method to analyse azoles in plasma.

The MS source parameters were also the same except the transitions for the quantification (TQ) and for the confirmation (TC) because they are specific to the targeted compounds. MS/MS transition conditions are summarized in the supplementary data, Table S1.

All sensibilities and linearity ranges achieved in Milli-Q water for both direct injection and on-line SPE are presented in the supplementary files, Table S2. To establish LOQ, four criteria are defined. First, the compound signal (S) in TQ could be differentiated in the matrix signal (N) with a S/N ratio higher than 9. Calculated recoveries in internal calibration must be equal to  $100 \% \pm 60 \%$ . A margin of error of 60 % was permitted for the TQ/TC ratio comparing with the quality control. Moreover, the point must be included in the linearity range. LOD is then calculated by divided LOQ by 3. The equivalent signal-to-noise (S/N) ratios is therefore 3. In matrix plasma, sensibilities expressed in  $\text{pg}\cdot\text{g plasma}^{-1}$  compared to literature are detailed table 1 depending on analytical parameters.

Table 1:

Comparison of on line SPE method validated in this work with different analytical techniques applied to plasma/whole blood sample

Matrix	Sample amount (μL)	Compounds	Extraction method (solvent)	Purification method (adsorbant)	Plasma dilution	Volume injected (μL)	Spiking levels (pg/g or *pg/mL)	Neonicotinoid recoveries (%)	LOQ (pg/g or *pg/mL)	References
Chicken plasma	25	Acetamiprid, clothianidin, cycloxaprid, dinotefuran, flupyradifuron, imidacloprid, nitenpyram, sulfoxaflor, thiacloprid, thiamethoxam	LLE (Acetonitrile/Water)	On line SPE (C18)	48	600	LOQ, 1000	98-126, 95-115	4-600	Our study
Alpine swift plasma	10	Acetamiprid, clothianidin, imidacloprid, thiacloprid, thiamethoxam	LLE (Acetonitrile/Water)	SPE (Oasis HLB)	10	5	Not mentionned	Not mentionned	10-50	Humann-Guilleminot et al., 2021
Avian plasma	20-50	Clothianidin	LLE (acidified methanol/Water)	x	10	Not mentionned	Not mentionned	88.3	210 *	Lennon et al., 2020
Chicken plasma, bovine plasma	50	Acetamiprid, clothianidin, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, thiacloprid, thiamethoxam + 1 neonicotinoid metabolite + 1 other	LLE (acidified methanol)	x	10	90	8-16 *	96.9-101.2	LOD: 2.3-9.1 *	Hao et al., 2019
Red-winged blackbirds plasma	25	Acetamiprid, clothianidin, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, thiamethoxam + 6 neonicotinoid metabolites + 1 other	LLE (acidified methanol)	x	20	90	400 *	89.3-111.2	LOD: 49-61*	Eng et al., 2017 Eng et al., 2021
Honey Buzzard blood	Not mentionned	Acetamiprid, imidacloprid, thiacloprid	QuEChERS (actonitrile/water, salts: magnesium sulphate/sodium acetate, SupeITM QuE PSA/C18/GCB)		Not mentionned	20	Not mentionned	Not mentionned	LOD: 0.6-39 *	Byholm et al., 2018 David et al., 2015
Chicken blood	500	Acetamiprid, clothianidin, dinotefuran, imidacloprid, thiacloprid, thiamethoxam	QuEChERS (acidified acetonitrile, salts: magnesium sulphate/sodium acetate, PSA, DSC-C18)		1	Not mentionned	2000, 10000, 20000, 50000, 100000 *	59-76	2000-10000 *	Taliansky-Chamaudis et al., 2017
Rabbit serum	500	Imidacloprid + 1 neonicotinoid metabolite	LLE (Water/Dichloromethane)	x	0.2	10	5.10 <sup>5</sup> , 5.10 <sup>6</sup> , 5.10 <sup>7</sup> *	88.4	6000 *	Stivaktatis et al., 2016
Human blood	2000	Imidacloprid + 18 other pesticides	LLE (Dichloromethane/ethyl-acetate/acetone)	x	1	25	2.10 <sup>5</sup> *	88	10000 *	Luzardo et al., 2015
Rats blood	1000	Imidacloprid + 2 neonicotinoid metabolites	LLE (Acetonitrile, anhydrous megnesium sulphate)	SPE (C18)	1	20	Not mentionned	Not mentionned	Not mentionned	Kapoor et al., 2014

LOQ in  $\text{ng.g}^{-1}$  plasma are first obtained with sample amount higher than 500  $\mu\text{L}$  (Kapoor et al., 2014; Luzardo et al., 2015; Stivaktakis et al., 2016; Taliansky-Chamudis et al., 2017). Then sample intake have been reduced to 10-50  $\mu\text{L}$  with better sensibilities in  $\text{pg.mL}^{-1}$  or  $\text{pg.g}^{-1}$  (Eng et al., 2021, 2017; Hao et al., 2018; Humann-Guilleminot et al., 2021; Lennon et al., 2020). Dilution of the plasma have operated to reduce de impact of matrix. None of these publications mentioned the use of online SPE. More preparation steps have been operated instead which are solvent, material and time consuming such as purification SPE (Humann-Guilleminot et al., 2021).

In plasma matrix, LOQ, linearity range and recoveries obtained at two concentrations are exposed in supplementary data, Table S3. Lines were checked by internal standard calibration with  $R^2$  all higher than 0.99. The validated method is accurate, sensitive with an excellent linearity and good recoveries at LOQ and a higher concentration. All recoveries for both concentrations are comprised between 95 % and 126 %.

### **3- Results and discussions**

#### **a. Plasma concentration species dependant**

Raw datas are presented in supplementary data, Table S4. Table 2 summarize detection, quantification frequencies and the mean quantified concentration for each studied species.

Table 2:

Summary datas for the three bird species blackbirds / White storks / Gulls, percentage of samples detected with concentration values between the LOD and LOQ, percentage of samples quantified above the LOQ, mean and standard deviation of calculated and quantified concentrations. For detected or quantified molecules, a is before and b after the ban of neonicotinoids in France.

Blackbirds									
	City 2016			Forest 2016			a: Vineyard 2016 b: Vineyard 2019		
	Detected frequency	Quantified frequency	Mean ± SD	Detected frequency	Quantified frequency	Mean ± SD	Detected frequency	Quantified frequency	Mean ± SD
Acetamiprid	0% (0/2)	0% (0/2)		0% (0/2)	0% (0/2)		0 % (0/32)	0 % (0/32)	
Clothianidin	0% (0/2)	0% (0/2)		0% (0/2)	0% (0/2)		a: 6 % (1/17)	12 % (2/17)	123.9 ; 334.7
Cyclozaprid	0% (0/2)	0% (0/2)		0% (0/2)	0% (0/2)		b: 0 % (0/15)	13 % (2/15)	171.2 ; 562.9
Dinotefuran	0% (0/2)	0% (0/2)		0% (0/2)	0% (0/2)		0 % (0/32)	0 % (0/32)	
Flupyradifuron	0% (0/2)	0% (0/2)		0% (0/2)	0% (0/2)		0 % (0/25)	0 % (0/25)	
Imidacloprid	0% (0/2)	0% (0/2)		0% (0/2)	0% (0/2)		a: 24 % (4/17)	6 % (1/17)	202.2
Nitenpyram	0% (0/2)	0% (0/2)		0% (0/2)	0% (0/2)		b: 0 % (0/15)	0 % (0/15)	
Sulfoxaflor	0% (0/2)	0% (0/2)		0% (0/2)	0% (0/2)		0 % (0/32)	0 % (0/32)	
Thiacloprid	0% (0/2)	0% (0/2)		0% (0/2)	0% (0/2)		0 % (0/32)	0 % (0/32)	
Thiamethoxam	0% (0/2)	0% (0/2)		0% (0/2)	0% (0/2)		a: 9 % (3/32)	0 % (0/32)	
							b: 0 % (0/15)	0 % (0/15)	

White storks						
	Brouage marshes 2019			Gironde estuary 2019		
	Detected frequency	Quantified frequency	Mean ± SD	Detected frequency	Quantified frequency	Mean ± SD
Acetamiprid	0% (0/11)	0% (0/11)		0 % (0/20)	0 % (0/20)	
Clothianidin	0% (0/11)	0% (0/11)		5 % (1/20)	15 % (3/20)	634.8 ± 74.1
Cyclozaprid	0% (0/11)	0% (0/11)		0 % (0/20)	0 % (0/20)	
Dinotefuran	0% (0/11)	0% (0/11)		0 % (0/20)	0 % (0/20)	
Flupyradifuron	0% (0/11)	0% (0/11)		0 % (0/20)	0 % (0/20)	
Imidacloprid	0% (0/11)	0% (0/11)		0 % (0/20)	0 % (0/20)	
Nitenpyram	0% (0/11)	0% (0/11)		0 % (0/20)	0 % (0/20)	
Sulfoxaflor	0% (0/11)	0% (0/11)		0 % (0/20)	0 % (0/20)	
Thiacloprid	0% (0/11)	0% (0/11)		0 % (0/20)	0 % (0/20)	
Thiamethoxam	0% (0/11)	0% (0/11)		0 % (0/20)	0 % (0/20)	

Gulls									
	Great black-backed gull 2018			European herring gull a: 2016-2018 b: 2019-2020			Lesser black-backed gull a: 2016-2018 b: 2019-2020		
	Detected frequency	Quantified frequency	Mean ± SD	Detected frequency	Quantified frequency	Mean ± SD	Detected frequency	Quantified frequency	Mean ± SD
Acetamiprid	0% (0/8)	0% (0/8)		0 % (0/27)	0 % (0/27)		a: 0 % (0/39)	3 % (1/39)	10.1
Clothianidin	0% (0/8)	0% (0/8)		a: 0 % (0/18)	0 % (0/18)		b: 0 % (0/13)	0 % (0/13)	
Cyclozaprid	0% (0/8)	0% (0/8)		b: 0 % (0/9)	22 % (2/9)	246.0 ; 667.0	a: 5 % (2/39)	8 % (3/39)	1371.2 ± 728.9
Dinotefuran	0% (0/8)	0% (0/8)		0 % (0/27)	0 % (0/27)		b: 0 % (0/13)	0 % (0/13)	
Flupyradifuron	0% (0/8)	0% (0/8)		0 % (0/27)	0 % (0/27)		0 % (0/52)	0 % (0/52)	
Imidacloprid	0% (0/8)	0% (0/8)		a: 6 % (1/18)	0 % (0/18)		0 % (0/52)	0 % (0/52)	
Nitenpyram	0% (0/8)	0% (0/8)		b: 0% (0/11)	0% (0/11)		0 % (0/52)	0 % (0/52)	
Sulfoxaflor	0% (0/8)	0% (0/8)		0 % (0/27)	0 % (0/27)		0 % (0/52)	0 % (0/52)	
Thiacloprid	0% (0/8)	0% (0/8)		a: 17 % (3/18)	11 % (2/18)	7.0 ; 61.0	a: 0 % (0/39)	18 % (7/39)	34.3 ± 24.3
Thiamethoxam	0% (0/8)	0% (0/8)		b: 0 % (0/9)	11 % (1/9)	6.0	b: 0 % (0/13)	0 % (0/13)	
				0 % (0/27)	0 % (0/27)		0 % (0/52)	0 % (0/52)	

Cyclozaprid, dinotefuran, flupyradifuron, nitenpyram and sulfoxaflor were not detected among the studied species. The neonicotinoids: acetamiprid, clothianidin, imidacloprid, thiacloprid were detected and quantified within species. These five detected neonicotinoids correspond to the five neonicotinoids sold for agricultural uses in Nouvelle-Aquitaine Region (Table S5) identified by BNVD database (“French Ministry of Agriculture : Banque Nationale des Ventes de produits phytopharmaceutiques par les Distributeurs agréés (BNVD),” 2021). After the ban, only two different molecules, against five before, were quantified which prove a positive impact on wild species.

### Blackbirds

No neonicotinoids were detected or quantified in samples collected in urban and forest habitat. Clothianidin was however detected and quantified in plasma blackbird sample from vineyard site in both years 2016 and 2019. The difference in pesticides concentrations between the three habitats forest, city and vineyards was also proved for azole fungicides (Angelier et al., 2021 in submission, Prouteau et al., 2021 in submission). Imidacloprid was detected in 4 samples and quantified in only one at the concentration of 202.2 pg.g<sup>-1</sup> plasma in samples from 2016 before the ban. Thiamethoxam were detected in 3 samples from vineyard site in 2016 also before national ban on neonicotinoid. Thiamethoxam is hydrophilic as is indicated by its low octanol–water partition coefficient (log Kow), -0.13 (“Pesticide properties database (PPDB),” 2021) which is also known for its weak ability to penetrate through bio-membrane (Trapp, 2004). This physicochemical property may explain the low plasma concentration while the substance is sold (Table S5) and it is the only one neonicotinoid to be authorized to be applied on french vineyards (ANSES, 2018).

### White storks

The difference of neonicotinoid detection match well with the types of habitat for white storks too. Indeed, in the habitat of Brouage marshes, no neonicotinoids were detected in plasma. On the opposite, in Gironde Estuary, there is some intensive agricultural land such as arable land or vineyards and one neonicotinoid was quantified. Clothianidin was the only neonicotinoid to be detected. Three individuals were concerned and were collected from the same nest located in Gironde Estuary habitat.

### Gulls

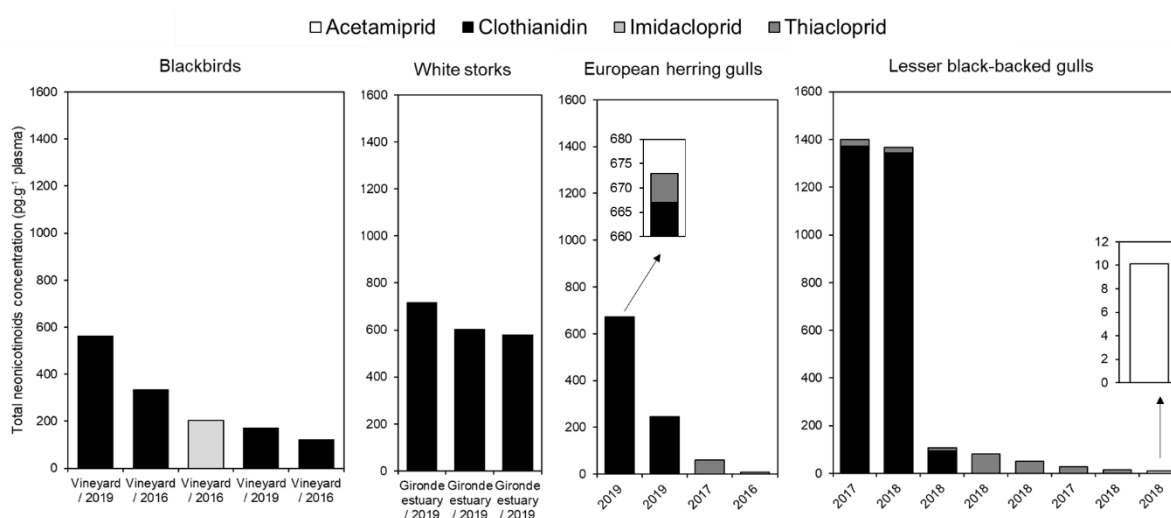
Neonicotinoids were not found in the plasma of great black-backed gulls specie. Clothianidin and thiacloprid were however quantified in herring and lesser black-backed gulls. In this last specie, acetamiprid was quantified in only one sample collected before the ban with very low concentration of 10.1 pg.g<sup>-1</sup> plasma. The difference between these species can be explained by their habitat use. Diet suggest and that great black-backed gull mainly using marine food (Maynard and Davoren, 2020) while lesser black-backed and European herring gulls are known to forage over both terrestrial and marine habitats (Corman et al., 2016; Maynard and Davoren, 2020). As neonicotinoids are only used in crops and have a low bioaccumulation potential (Eng et al., 2021; Kapoor et al., 2014; Roy et al., 2020), the lack of neonicotinoids contamination in the most marine species (great black backed gull) seems logical. After the ban of neonicotinoids, both clothianidin and thiacloprid were still found and quantified in herring and lesser black backed gulls.

## b. Comparison between species

For the studies species, type of habitats match with the weak signals of neonicotinoids. Comparison between studied species can be realised figure 1.

Figure 1:

Total neonicotinoids concentration quantified (value above LOQ) in each sample. Only individual sample with at least one neonicotinoid quantified are ranked in descending order of concentration sum.



Same level are observed for blackbird from vineyards and European herring gulls. White stocks from Gironde estuary have clothianidin levels higher than the two previously described. Two individuals of lesser black-backed gull have very high concentration of clothianidin. It is also the only studied species to have 2 neonicotinoids quantified in the same plasma sample with the combination of clothianidin with thiacloprid. The higher obtained concentration in lesser black-backed might be explain by their food more contaminated or their slower metabolism. Higher frequencies and concentrations can be quantified in studied species for clothianidin even after the neonicotinoids ban. During the neonicotinoid allowed period, clothianidin was the least sold active substance with only 25 kg against 21026 kg for imidacloprid in 2016 (Table S5). Significant plasmatic concentration of clothianidin might be explained with its creation from thiamethoxam in plants and insects (Nauen et al., 2003). Indeed, clothianidin in addition to being a native molecule is also a thiamethoxam metabolite.

It has been proved that neonicotinoids can be quantified in water thanks to their high solubility or soil after application (Schaafsma et al., 2015) and even persist several years depending on few factors (Bonmatin et al., 2015). After two or three years discontinuation of seed treatments, clothianidin, imidacloprid and thiamethoxam were still quantified in soil (Hladik et al., 2017). Half-lives in soil can be ranging from months to years according to different field or laboratories

studies (Goulson, 2013). The highest half live value referenced for neonicotinoid was obtained for the clothianidin in PPDB (“Pesticide properties database (PPDB),” 2021) and in other publication with 6931 days equivalent to 19 years (Rexrode et al., 2003). These values prove its slowly degradation in soil and its wild bird exposure.

### c. Comparison with literature

All the previously recorded results in literature were obtained before the ban of neonicotinoids (Table 3). Our study is the only one for the moment to analyse neonicotinoid in plasma sample collected after September 2018.

Clothianidin was the only neonicotinoid quantified in plasma from Alpine Swift (Humann-Guillemot et al., 2021) at maximum concentration of 340  $\text{pg.g}^{-1}$  plasma in the same range as our results. Avian samples collected post sowing with threated seeds during autumn (Milot et al., 2015) as a primary source of exposure have recorded very high concentration of clothianidin (Lennon et al., 2020). Same ranges are obtained for acetamiprid in lesser-black-backed gull and imidacloprid in blackbird comparing to white-crowned sparrow plasma concentrations (Hao et al., 2018). Imidacloprid concentration measured in one sample of Eurasian eagle owl blood from a dry land farming area in Spain (Taliensky-Chamudis et al., 2017) is very high but year of sampling is not mentioned. Thiachloprid concentrations for gulls were slightly higher than the one quantified in white-crowned sparrow and European honey buzzards (Byholm et al., 2018). Regarding thiamethoxam, LOQ of 50  $\text{pg.g}^{-1}$  plasma in this study does not provide a comparison with calculated concentration in white-crowned sparrow (Hao et al., 2018). But the three detected blackbird plasma between LOD (17  $\text{pg.g}^{-1}$  plasma) and LOQ indicate that concentrations are in the same range.

Table 3:

Detected frequencies and quantified concentrations compared to other species in literature depending on their type of habitat and sampling date without cyclozaprid, flupyradifuron and sulfoxaflor molecules which was not analysed in other publications

	Species	Type of habitat	Location	Date	Detected frequency (%) ; Minimum quantified ; Maximum quantified (pg.g <sup>-1</sup> plasma or *pg.mL <sup>-1</sup> plasma)							
					Acetamidrid	Clothianidin	Dinotefuran	Imidacloprid	Nitenpyram	Thiacloprid	Thiamethoxam	
Our study	Blackbirds	City, Forest	Region of Nouvelle-Aquitaine (France)	May-June 2016	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	
		Vineyard		May-June 2016	0% ; < LOQ	18% ; 123.9 ; 334.7	0% ; < LOQ	30% ; 202.2	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	9% ; < LOQ	
				May-June 2019	0% ; < LOQ	13% ; 171.2 ; 562.9	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ		
	White storks	Brouage marshes Gironde Estuary		May-June 2019	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	
					0% ; < LOQ	20% ; 580.4 ; 719.2	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ		
	Gulls	Great black-backed		Marine	May/June 2018	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ
					May/June 2016-2018	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	6% ; < LOQ	0% ; < LOQ	28% ; 7.0 ; 61.0	0% ; < LOQ
		European herring		Marine and terrestrial	May/June 2018-2020	0% ; < LOQ	22% ; 246.0 ; 667.0	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	11% ; 6.0	0% ; < LOQ
					May/June 2016-2018	3% ; 10.1	13% ; 95.4 ; 1371.2	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	18% ; 12.5 ; 81.0	0% ; < LOQ
	Lesser black-backed	Marine and terrestrial	May/June 2018-2020	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ		
Literature	Humann-Guillemot et al., 2021	Alpine swift	Urban area	Biel (Switzerland)	July 2018	33.3 % ; < LOQ	60 % ; ? ; 340		6.7 % ; < LOQ	40 % ; < LOQ	0 % ; < LOQ	
	Lennon et al., 2020	Different bird species	Winter cereals, crops of oilseed rape or field beans	Regions of East Anglia and North Lincolnshire (UK)	Autumn 2015, 2016, 2017		0-100% ; 500* ; 69300000*					
	Hao et al., 2018	White-crowned sparrows	Not mentioned	Southern Ontario (Canada)	May 2017	11% ; 3.7 ; 3.9	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	78% ; 5.0* ; 177.0*	0% ; < LOQ	11% ; 2.5* ; 3.1* ; 22% ; 5.1* ; 33.7*	
	Byholm et al., 2018	European honey buzzard	Oilseed plant fields	Western region (Finland)	July-August 2013	0% ; < LOQ			10 % ; 8.9*	50 % ; 12.0* ; 31.0*		
	Taliansky-Chamudis et al., 2017	Eurasian eagle owl	Irrigation farming, dry land farming and non-agricultural use	Southeast of the Region of Murcia (Spain)	Not mentioned (before 2017)	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ		5% ; 3280*	0% ; < LOQ	0% ; < LOQ	



#### d. Toxicology

The No Observed Effective Concentration, NOEC, and the acute oral LD50 values are compiled for birds in the University of Hertfordshire database. For the five neonicotinoids (acetamiprid, clothianidin, imidacloprid, thiacloprid and thiamethoxam) obtained NOEC in  $\text{mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$  are obtained: 9.5, 56.8, 9.3, 3.73, 29.4 and obtained LD50 in  $\text{mg.kg}^{-1}.\text{b.w.}^{-1}$ : 98, 430, 31, 35 and 576. Imidacloprid and thiacloprid are the more toxic neonicotinoids to birds regarding these low values. Range for LD50 are variable depending on the species for the two more studied neonicotinoid imidacloprid (25 to 283  $\text{mg.kg}^{-1}.\text{b.w.}^{-1}$ ) or clothianidin (200 to 1333  $\text{mg.kg}^{-1}.\text{b.w.}^{-1}$ ) (Goulson, 2013).

Comparison of plasmatic concentrations in wild specie with their LD50 values and NOEC is not possible as exposition dose is not known. In order to estimate the relation between the oral dose and the plasmatic concentration, kinetic studies were examined. As natives are quickly metabolized or excreted (Ford and Casida, 2006; Harada et al., 2016; Tomizawa and Casida, 2005) after being transported to different organs (Bean et al., 2019; Roy et al., 2020), kinetic studies have to observe very short time. Maximum plasmatic levels after oral administration were obtained after one hour for the imidacloprid (Eng et al., 2021) or twelve hours (Kapoor et al., 2014) and few hours for thiamethoxam (Bednarska et al., 2013). Low imidacloprid oral dose of  $0.8 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{b.w.}^{-1}$  drive a  $182.1 \text{ ng.mL}^{-1}$  plasma concentration for imidacloprid and the high dose  $6.9 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{b.w.}^{-1}$  generate a maximum concentration of  $1723 \text{ ng.mL}^{-1}$  (Eng et al., 2021) at one hour. After 12h of orally administered imidacloprid with a  $20 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{b.w.}^{-1}$  dose induced a  $3.9 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  concentration in blood (Kapoor et al., 2014). With the imidacloprid of  $202.2 \text{ pg.g}^{-1}$  obtained in our environmental work and supposing it was a single dose exposure for the blackbird, a dose of  $0.0008 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{b.w.}^{-1}$  obtained with the worst kinetic condition. This dose is equal to 0.009 % NOEC or 0.003 % LD50 while impact studies of low imidacloprid exposure or ingestion prove effect on physiological and behavioural or on sexual function (0.5 %LD50 over 30 days (Zgirski et al., 2021); single dose of 4 % or 8 %LD50 (Eng et al., 2017) (Eng et al., 2019) ; 0.07 %LD50 every third day over 21 days (Humann-Guillemintot et al., 2019)).

Extrapolating for the other maximum neonicotinoid concentrations found in wild bird species in our study and assuming that plasma rate transfer is equal to imidacloprid's one, the following percentages have been calculated for %NOEC and %LD50:  $4.10^{-5}$  and  $4.10^{-4}$  for acetamiprid, 0.009 and 0.001 for clothianidin, 0.008 and  $9.10^{-4}$  for thiacloprid,  $2.10^{-5}$  and  $3.10^{-4}$  for thiamethoxam with a concentration of LQ divided by two. Although clothianidin is the least toxic neonicotinoid, highest percentages are obtained for this molecule of interest.

#### 4- Conclusion

The on-line SPE LC-MS/MS was proved to be a sensitive analytical method for the determination of neonicotinoids in plasma samples with low intake. As degradation kinetic into plasma is very fast for this insecticid family, LOQ need to be very low in  $\text{pg.g}^{-1}$  plasma. Low frequencies, up to 30 % in agricultural sites, and weak signals indicate well the global exposure of different wild bird species. Indeed, difference between their habitats is observe thanks plasmatic level of neonicotinoid. Another difference was observed with the ban of neonicotinoids where the diversity of detected or quantified neonicotinoids has decreased. Clothianidin must remain a molecule of interest since it is still quantify in bird plasma after the

restriction of use. Although the residue levels reported in this work for different bird species are low, it should be noted that even a low dose negative effects can occur.

Supplementary data to this article can be found online at

### **Acknowledgments**

This work was funded by the Région Nouvelle-Aquitaine France (MULTISTRESS project to O. Chastel), the EC2CO Ecodyn 2016 program (to F. Angelier), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE02-0004-01 to F. Angelier, and ANR-120-CE34-0008 to F. Angelier) and the Bioditox ANSES project (2019-1-031 to F. Brischoux). This study has been carried out in the framework of Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45) within the PhytoCOTE project. The authors thank all the fieldworkers from Ligue Pour la Protection des Oiseaux (LPO) for their help in the long-term monitoring and ringing program (PP533) supported by the Centre de Recherches sur la Biologie des Populations d'Oiseaux (CRBPO) for the gulls. We are grateful to the members of the Groupe Ornithologique Aunis Saintonge for their help on the fields with white stocks. We thank Jean-Claude Barbraud, Jacques Chambaud, Rolland Seguin the Mairie de Niort, and the office National des Forêts (ONF) for facilitating access to the vineyards for the blackbirds.

## References

- ANSES, 2018. Risques et bénéfices relatifs des alternatives aux produits phytopharmaceutiques comportant des néonicotinoïdes / Tome 1 - Rapport du groupe de travail, identification des alternatifs aux usages autorisés des néonicotinoïdes.
- Barbraud, C., Barbraud, J.-C., Barbraud, M., 1999. Population dynamics of the White Stork *Ciconia ciconia* in western France. *Ibis* 141, 469–479. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.1999.tb04416.x>
- Barbraud, J.-C., Barbraud, C., Delord, K., 2002. Changements récents dans le régime alimentaire des poussins de cigogne blanche *Ciconia ciconia* en Charente-Maritime. *Alauda* 70, 437–444.
- Bean, T.G., Gross, M.S., Karouna-Renier, N.K., Henry, P.F.P., Schultz, S.L., Hladik, M.L., Kuivila, K.M., Rattner, B.A., 2019. Toxicokinetics of Imidacloprid-Coated Wheat Seeds in Japanese Quail (*Coturnix japonica*) and an Evaluation of Hazard. *Environmental Science & Technology* 53, 3888–3897. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b07062>
- Bednarska, A.J., Edwards, P., Sibly, R., Thorbek, P., 2013. A toxicokinetic model for thiamethoxam in rats: implications for higher-tier risk assessment. *Ecotoxicology* 22, 548–557. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1047-z>
- Berset, J.D., Mermer, S., Robel, A.E., Walton, V.M., Chien, M.L., Field, J.A., 2017. Direct residue analysis of systemic insecticides and some of their relevant metabolites in wines by liquid chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1506, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.05.019>
- Bonmatin, J.-M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E.A.D., Noome, D.A., Simon-Delso, N., Tapparo, A., 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ Sci Pollut Res* 22, 35–67. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>
- Bonmatin, J.-M., Mitchell, E.A.D., Glauser, G., Lumawig-Heitzman, E., Claveria, F., Bijleveld van Lexmond, M., Taira, K., Sánchez-Bayo, F., 2021. Residues of neonicotinoids in soil, water and people's hair: A case study from three agricultural regions of the Philippines. *Science of The Total Environment* 757, 143822. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143822>
- Byholm, P., Mäkeläinen, S., Santangeli, A., Goulson, D., 2018. First evidence of neonicotinoid residues in a long-distance migratory raptor, the European honey buzzard (*Pernis apivorus*). *Science of The Total Environment* 639, 929–933. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.185>
- Casida, J.E., Quistad, G.B., 1998. Golden Age of Insecticide Research: Past, Present, or Future? *Annu. Rev. Entomol.* 43, 1–16. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.1>
- Ccanccapa, A., Masiá, A., Navarro-Ortega, A., Picó, Y., Barceló, D., 2016. Pesticides in the Ebro River basin: Occurrence and risk assessment. *Environmental Pollution* 211, 414–424. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.059>
- Chagnon, M., Kreuzweiser, D., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Van der Sluijs, J.P., 2015. Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. *Environ Sci Pollut Res* 22, 119–134. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3277-x>
- Corman, A., Mendel, B., Voigt, C.C., Garthe, S., 2016. Varying foraging patterns in response to competition? A multicolony approach in a generalist seabird. *Ecol Evol* 6, 974–986. <https://doi.org/10.1002/ece3.1884>
- Eng, M.L., Hao, C., Watts, C., Sun, F., Morrissey, C.A., 2021. Characterizing imidacloprid and metabolites in songbird blood with applications for diagnosing field exposures. *Science*

- of The Total Environment 760, 143409.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143409>
- Eng, M.L., Stutchbury, B.J.M., Morrissey, C.A., 2019. A neonicotinoid insecticide reduces fueling and delays migration in songbirds. *Science* 365, 1177–1180.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaw9419>
- Eng, M.L., Stutchbury, B.J.M., Morrissey, C.A., 2017. Imidacloprid and chlorpyrifos insecticides impair migratory ability in a seed-eating songbird. *Sci Rep* 7, 15176.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-15446-x>
- Espín, S., García-Fernández, A.J., Herzke, D., Shore, R.F., van Hattum, B., Martínez-López, E., Coeurdassier, M., Eulaers, I., Fritsch, C., Gómez-Ramírez, P., Jaspers, V.L.B., Krone, O., Duke, G., Helander, B., Mateo, R., Movalli, P., Sonne, C., van den Brink, N.W., 2016. Tracking pan-continental trends in environmental contamination using sentinel raptors—what types of samples should we use? *Ecotoxicology* 25, 777–801.  
<https://doi.org/10.1007/s10646-016-1636-8>
- Ford, K.A., Casida, J.E., 2006. Unique and Common Metabolites of Thiamethoxam, Clothianidin, and Dinotefuran in Mice. *Chemical Research in Toxicology* 19, 1549–1556. <https://doi.org/10.1021/tx0601859>
- French Ministry of Agriculture: Banque Nationale des Ventes de produits phytopharmaceutiques par les Distributeurs agréés (BNVD), 2021.  
<https://geo.data.gouv.fr/fr/datasets/ee9c9ca7ea585cae2c75d43fb1b753c8d1e98966>
- Fritsch, C., Coeurdassier, M., Faivre, B., Baurand, P.-E., Giraudoux, P., van den Brink, N.W., Scheifler, R., 2012. Influence of landscape composition and diversity on contaminant flux in terrestrial food webs: A case study of trace metal transfer to European blackbirds *Turdus merula*. *Science of The Total Environment* 432, 275–287.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.004>
- Gadenne, H., Cornulier, T., Eraud, C., Barbraud, J.-C., Barbraud, C., 2014. Evidence for density-dependent habitat occupancy at varying scales in an expanding bird population. *Population Ecology* 56, 493–506. <https://doi.org/10.1007/s10144-014-0435-4>
- Gibbons, D., Morrissey, C., Mineau, P., 2015. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 103–118. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>
- Goulson, D., 2013. Review: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J Appl Ecol* 50, 977–987. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>
- Gupta, S., Gajbhiye, V.T., Gupta, R.K., 2008. Soil Dissipation and Leaching Behavior of a Neonicotinoid Insecticide Thiamethoxam. *Bull Environ Contam Toxicol* 80, 431–437.  
<https://doi.org/10.1007/s00128-008-9420-y>
- Han, W., Tian, Y., Shen, X., 2018. Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. *Chemosphere* 192, 59–65.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.149>
- Hao, C., Eng, M.L., Sun, F., Morrissey, C.A., 2018. Part-per-trillion LC-MS/MS determination of neonicotinoids in small volumes of songbird plasma. *Science of The Total Environment* 644, 1080–1087. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.317>
- Hao, C., Noestheden, M.R., Zhao, X., Morse, D., 2016. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of neonicotinoid pesticides and 6-chloronicotinic acid in environmental water with direct aqueous injection. *Analytica Chimica Acta* 925, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.04.024>
- Harada, K.H., Tanaka, K., Sakamoto, H., Imanaka, M., Niisoe, T., Hitomi, T., Kobayashi, H., Okuda, H., Inoue, S., Kusakawa, K., Oshima, M., Watanabe, K., Yasojima, M., Takasuga, T., Koizumi, A., 2016. Biological Monitoring of Human Exposure to

- Neonicotinoids Using Urine Samples, and Neonicotinoid Excretion Kinetics. *PLOS ONE* 11, e0146335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146335>
- Hladik, M.L., Bradbury, S., Schulte, L.A., Helmers, M., Witte, C., Kolpin, D.W., Garrett, J.D., Harris, M., 2017. Neonicotinoid insecticide removal by prairie strips in row-cropped watersheds with historical seed coating use. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 241, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.03.015>
- Hladik, M.L., Main, A.R., Goulson, D., 2018. Environmental Risks and Challenges Associated with Neonicotinoid Insecticides. *Environ. Sci. Technol.* 52, 3329–3335. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06388>
- Hoffmann, E.J., Vandervoort, C., Wise, J.C., 2010. Plum *Curculio* (Coleoptera: Curculionidae) Adult Mortality and Associated Fruit Injury After Exposure to Field-Aged Insecticides on Tart Cherry Branches. *ec* 103, 1196–1205. <https://doi.org/10.1603/EC10017>
- Humann-Guillemot, S., Laurent, S., Bize, P., Roulin, A., Glauser, G., Helfenstein, F., 2021. Contamination by neonicotinoid insecticides in barn owls (*Tyto alba*) and Alpine swifts (*Tachymarptis melba*). *Science of The Total Environment* 785, 147403. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147403>
- Humann-Guillemot, S., Tassin de Montaigu, C., Sire, J., Grünig, S., Gning, O., Glauser, G., Vallat, A., Helfenstein, F., 2019. A sublethal dose of the neonicotinoid insecticide acetamiprid reduces sperm density in a songbird. *Environmental Research* 177, 108589. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108589>
- Jones, A., Harrington, P., Turnbull, G., 2014. Neonicotinoid concentrations in arable soils after seed treatment applications in preceding years: Neonicotinoid concentrations in arable soil. *Pest. Manag. Sci.* 70, 1780–1784. <https://doi.org/10.1002/ps.3836>
- Kapoor, U., Srivastava, M.K., Trivedi, P., Garg, V., Srivastava, L.P., 2014. Disposition and acute toxicity of imidacloprid in female rats after single exposure. *Food and Chemical Toxicology* 68, 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.019>
- Kleier, D., Holden, I., Casida, J.E., Ruzo, L.O., 1985. Novel photoreactions of an insecticidal nitromethylene heterocycle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33, 998–1000. <https://doi.org/10.1021/jf00065a054>
- Lennon, R.J., Peach, W.J., Dunn, J.C., Shore, R.F., Pereira, M.G., Sleep, D., Dodd, S., Wheatley, C.J., Arnold, K.E., Brown, C.D., 2020. From seeds to plasma: Confirmed exposure of multiple farmland bird species to clothianidin during sowing of winter cereals. *Science of The Total Environment* 723, 138056. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138056>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., Mateo, R., 2013. Experimental exposure of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to seeds coated with imidacloprid, thiram and difenoconazole. *Ecotoxicology* 22, 125–138. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-1009-x>
- López-Gálvez, N., Wagoner, R., Canales, R.A., de Zapien, J., Calafat, A.M., Ospina, M., Rosales, C., Beamer, P., 2020. Evaluating imidacloprid exposure among grape field male workers using biological and environmental assessment tools: An exploratory study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 230, 113625. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113625>
- Luzardo, O.P., Almeida-Gonzalez, M., Ruiz-Suarez, N., Zumbado, M., Henriquez-Hernandez, L.A., Meilan, M.J., Camacho, M., Boada, L.D., 2015. Validated analytical methodology for the simultaneous determination of a wide range of pesticides in human blood using GC–MS/MS and LC–ESI/MS/MS and its application in two poisoning cases. *Science & Justice* 55, 307–315. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.scijus.2015.04.007>
- Maynard, L.D., Davoren, G.K., 2020. Inter-colony and interspecific differences in the isotopic niche of two sympatric gull species in newfoundland 7.

- Meillère, A., Brischoux, F., Bustamante, P., Michaud, B., Parenteau, C., Marciau, C., Angelier, F., 2016. Corticosterone levels in relation to trace element contamination along an urbanization gradient in the common blackbird (*Turdus merula*). *Science of The Total Environment* 566–567, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.014>
- Millot, F., Berny, P., Decors, A., Bro, E., 2015. Little field evidence of direct acute and short-term effects of current pesticides on the grey partridge. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 117, 41–61. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.017>
- Mitchell, E.A.D., Mulhauser, B., Mulo, M., Mutabazi, A., Glauser, G., Aebi, A., 2017. A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science* 358, 109–111. <https://doi.org/10.1126/science.aan3684>
- Mohring, B., Brischoux, F., Angelier, F., 2021. Vineyards, but not cities, are associated with lower presence of a generalist bird, the Common Blackbird (*Turdus merula*), in Western France. *Avian Res* 12, 3. <https://doi.org/10.1186/s40657-020-00239-0>
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Salgado, V.L., Kausmann, M., 2003. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 76, 55–69. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(03\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(03)00065-8)
- Nauen, R., Jeschke, P., Copping, L., 2008. In Focus: Neonicotinoid insecticides Editorial: In Focus: Editorial. *Pest. Manag. Sci.* 64, 1081–1081. <https://doi.org/10.1002/ps.1659>
- Pelosi, C., Bertrand, C., Daniele, G., Coeurdassier, M., Benoit, P., Nélieu, S., Lafay, F., Bretagnolle, V., Gaba, S., Vulliet, E., Fritsch, C., 2021. Residues of currently used pesticides in soils and earthworms: A silent threat? *Agriculture, Ecosystems & Environment* 305, 107167. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107167>
- Peng, Y., Fang, W., Krauss, M., Brack, W., Wang, Z., Li, F., Zhang, X., 2018. Screening hundreds of emerging organic pollutants (EOPs) in surface water from the Yangtze River Delta (YRD): Occurrence, distribution, ecological risk. *Environmental Pollution* 241, 484–493. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.061>
- Pesticide properties database (PPDB), 2021. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>
- Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., McField, M., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., Van der Sluijs, J.P., Van Dyck, H., Wiemers, M., 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut Res* 22, 68–102. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3471-x>
- Rexrode, M., Barrett, M., Ellis, J., Patrick, G., Vaughan, A., Felkel, J., Melendez, J., 2003. EFED risk assessment for the seed treatment of clothianidin 600FS on corn and canola.
- Roy, C.L., Jankowski, M., Ponder, J., Chen, D., 2020. Sub-lethal and Lethal Methods to Detect Recent Imidacloprid Exposure in Birds with Application to Field Studies: Detecting Recent Imidacloprid Exposure in Birds. *Environmental Toxicology and Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/etc.4721>
- Schaafsma, A., Limay-Rios, V., Baute, T., Smith, J., Xue, Y., 2015. Neonicotinoid Insecticide Residues in Surface Water and Soil Associated with Commercial Maize (Corn) Fields in Southwestern Ontario. *PLoS ONE* 10, e0118139. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118139>
- Sebastiano, M., Jouanneau, W., Blévin, P., Angelier, F., Parenteau, C., Gernigon, J., Lemesle, J.C., Robin, F., Pardon, P., Budzinski, H., Labadie, P., Chastel, O., 2021. High levels of fluoroalkyl substances and potential disruption of thyroid hormones in three gull species from South Western France. *Science of The Total Environment* 765, 144611. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144611>
- Soloway, S.B., Henry, A.C., Kollmeyer, W.D., Padgett, W.M., Powell, J.E., Roman, S.A., Tieman, C.H., Corey, R.A., Horne, C.A., 1978. Nitromethylene Heterocycles as

- Insecticides, in: Shankland, D.L., Hollingworth, R.M., Smyth, T. (Eds.), *Pesticide and Venom Neurotoxicity*. Springer US, Boston, MA, pp. 153–158. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8834-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8834-4_12)
- Stivaktakis, P.D., Kavvalakis, M.P., Tzatzarakis, M.N., Alegakis, A.K., Panagiotakis, M.N., Fragkiadaki, P., Vakonaki, E., Ozcagli, E., Hayes, W.A., Rakitskii, V.N., Tsatsakis, A.M., 2016. Long-term exposure of rabbits to imidacloprid as quantified in blood induces genotoxic effect. *Chemosphere* 149, 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.040>
- Taliansky-Chamudis, A., Gómez-Ramírez, P., León-Ortega, M., García-Fernández, A.J., 2017. Validation of a QuEChERS method for analysis of neonicotinoids in small volumes of blood and assessment of exposure in Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*) nestlings. *Science of The Total Environment* 595, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.246>
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45, 247–268. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>
- Trapp, S., 2004. Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals. *Environ Sci & Pollut Res* 11, 33–39. <https://doi.org/10.1065/espr2003.08.169>
- Whitehorn, P.R., O'Connor, S., Wackers, F.L., Goulson, D., 2012. Neonicotinoid Pesticide Reduces Bumble Bee Colony Growth and Queen Production. *Science* 336, 351–352. <https://doi.org/10.1126/science.1215025>
- Wood, S.C., Kozii, I.V., Koziy, R.V., Epp, T., Simko, E., 2018. Comparative chronic toxicity of three neonicotinoids on New Zealand packaged honey bees. *PLOS ONE* 13, e0190517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190517>
- Zgirski, T., Legagneux, P., Chastel, O., Regimbald, L., Prouteau, L., Le Pogam, A., Budzinski, H., Love, O.P., Vézina, F., 2021. Early life neonicotinoid exposure results in proximal benefits and ultimate carryover effects. *Sci Rep* 11, 15252. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93894-2>

## Supplementary data

Table S1

The MRM transitions by LC-MS/MS with the retention time (rt), m/z of parent ion, m/z of the transition quantification (TQ) product ion, /z of the transition confirmation (TC) product ion, collision energy (CE), Cell Accelerated Voltage (CAV), ratio Area TQ/Area TC, dwell time (DW).

Molecules	Rt (min)	Parent Ion	TQ Product Ion (CE) ((CAV))	TC Product Ion (CE) ((CAV))	TQ/TC	DW (ms)
Acetamiprid	10.1	223.08	125.9 (20) ((4))	56.02 (12) ((6))	2.1	70
Acetamiprid d3	10	226.1	126 (20) ((4))			70
Clothianidin	8.7	250.02	169 (12) ((5))	132 (12) ((5))	0.8	72
Clothianidin d3	8.7	253.04	172.1 (8) ((5))			72
Cycloxaprid	9	323.09	126 (40) ((4))	98.9 (68) ((4))	3.2	65
Dinotefuran	5.2	203.12	43.2 (68) ((4))	157.1 (4) ((4))	1.2	400
Flupyradifuron	10.2	289.06	125.9 (28) ((4))	90 (52) ((4))	3.3	70
Imidacloprid	9.6	256	209 (12) ((5))	175 (12) ((4))	1.2	48
Imidacloprid d4	9.6	260.09	213.1 (12) ((4))			48
Nitenpyram	7.1	271.1	56 (36) ((4))	99.1 (12) ((4))	2.6	300
Sulfoxaflor	10.2	174.01	154 (20) ((4))	78.1 (40) ((4))	3.1	60
Thiacloprid	11.2	253.03	126 (24) ((4))	90 (36) ((4))	4.5	267
Thiacloprid d4	11.2	257.06	126 (16) ((5))			267
Thiamethoxam	8.3	292	211 (4) ((4))	181 (20) ((4))	1.5	90
Thiamethoxam d3	8.3	295.05	214.4 (8) ((4))			90

Table S2

LOQ and linearity range expressed in pg injected in direct injection and with on-line SPE installed.

		Direct injection				On-line SPE			
		LOQ (pg inj)	Linearity range (number of levels in triplicate)	Slope	R <sup>2</sup>	LOQ (pg inj)	Linearity range (number of levels in triplicate)	Slope	R <sup>2</sup>
Natives	Acetamiprid	0.01	0.005-6 (12)	41134	0.9998	0.03	0.003-60 (7)	32601	0.9999
	Clothianidin	0.10	0.04-6 (8)	3300	1.0000	0.30	0.05-60 (5)	2174	0.9999
	Cycloxaprid	0.02	0.03-6 (9)	11323	0.9996	0.03	0.03-60 (7)	10133	0.9998
	Dinotefuran	0.10	0.05-6 (8)	7467	1.0000	3.00	3.00-60 (3)	488	0.9976
	Flupyradifuron	0.04	0.015-6 (10)	9209	0.9998	0.30	0.05-60 (5)	8404	0.9998
	Imidacloprid	0.10	0.05-6 (8)	4488	0.9995	0.30	0.06-60 (5)	3770	0.9998
	Nitenpyram	0.01	0.006-6 (11)	15960	0.9999	0.30	0.03-60 (5)	2413	0.9998
	Sulfoxaflor	0.02	0.005-6 (12)	30986	0.9993	0.05	0.005-60 (6)	26641	0.9998
	Thiacloprid	0.01	0.005-6 (12)	49145	0.9992	0.03	0.006-6 (7)	34655	0.9999
	Thiamethoxam	0.04	0.02-6 (10)	9286	0.9996	0.05	0.03-60 (7)	10840	0.9999



**Table S3**

LOQ, linearity range both expressed in  $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$  plasma

Recoveries in plasma matrix at two concentrations (LOQ and  $1000 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$  plasma)

	LOQ	Linearity range	Slope	R <sup>2</sup>	Recoveries mean $\pm$ SD	
					LOQ (n = 16)	1000 $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ plasma (n = 18)
Acetamiprid	10	4-80000 (11)	0.97	0.9940	116% $\pm$ 8%	100% $\pm$ 6%
Clothianidin	150	50-80000 (7)	1.68	0.9973	108% $\pm$ 7%	100% $\pm$ 7%
Cycloxaprid	50	20-80000 (9)	0.66	0.9966	98% $\pm$ 11%	104% $\pm$ 11%
Dinotefuran	600	180-50000 (4)	3.85	0.9988	118% $\pm$ 20%	111% $\pm$ 41%
Flupyradifuron	25	7-80000 (10)	2.73	0.9993	113% $\pm$ 16%	115% $\pm$ 18%
Imidacloprid	200	90-80000 (6)	1.05	0.9987	122% $\pm$ 26%	95% $\pm$ 8%
Nitenpyram	100	55-80000 (9)	1.50	0.9915	99% $\pm$ 14%	101% $\pm$ 12%
Sulfoxaflor	10	2-80000 (11)	0.82	0.9992	102% $\pm$ 6%	95% $\pm$ 8%
Thiacloprid	4	1-80000 (13)	0.99	0.9999	126% $\pm$ 16%	99% $\pm$ 6%
Thiamethoxam	50	20-50000 (9)	1.00	0.9988	109% $\pm$ 8%	101% $\pm$ 4%

Lines were checked by internal standard calibration with R<sup>2</sup> all higher than 0.99.





Black-backed gull	2018	28/05/18	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2018	28/05/18	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2019	13/05/19	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2019	13/05/19	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2019	13/05/19	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2019	13/05/19	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2019	13/05/19	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2019	22/05/19	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2020	26/05/20	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2020	26/05/20	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2020	02/06/20	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2020	02/06/20	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2020	02/06/20	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2020	02/06/20	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2020	02/06/20	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2018	11/05/18	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2018	11/05/18	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2018	11/05/18	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2018	11/05/18	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2018	11/05/18	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2018	11/05/18	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2018	16/05/18	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Black-backed gull	2018	16/05/18	Ile de Ré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

Det = Detected but not quantified

Table S5:

Neonicotinoids sold for agricultural uses in Nouvelle-Aquitaine Region on the period from 2013 to 2019 (“French Ministry of Agriculture : Banque Nationale des Ventes de produits phytopharmaceutiques par les Distributeurs agréés (BNVD),” 2021)

	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Acetamiprid	581	940	973	1019	1274	1318	597
Clothianidin	56	26	10	25	16	15	0
Cycloxaprid	0	0	0	0	0	0	0
Dinotefuran	0	0	0	0	0	0	0
Flupyradifuron	0	0	0	0	0	0	0
Imidacloprid	11306	28361	26212	21026	26865	383	36
Nitenpyram	0	0	0	0	0	0	0
Sulfoxaflor	0	0	0	0	0	0	0
Thiacloprid	2252	20660	20996	20079	22679	13271	68
Thiamethoxam	5519	3120	3333	3790	3788	3115	25



## Chapitre 5 : Développements analytiques et applications en matrice plume

1. Méthode de préparation de l'échantillon et d'analyse de l'extrait .....	303
a. Optimisations à l'étape d'extraction .....	303
b. Optimisations à l'étape de purification .....	308
c. Evaluation des pertes le long du protocole retenu.....	309
d. Effets matriciels du protocole retenu.....	314
e. Optimisations à l'injection .....	316
f. Comparaison des LQ avec la bibliographie .....	319
2. Expérience d'exposition en laboratoire .....	320
3. Applications environnementales .....	322
a. Azoles.....	322
i. Merles noirs .....	323
ii. Cigognes blanches .....	330
iii. Goélands .....	331
iv. Comparaison entre espèces et avec la littérature.....	334
b. Néonicotinoïdes et leurs métabolites.....	337
i. Merles noirs .....	337
ii. Cigognes blanches .....	341
iii. Goélands .....	341
iv. Corrélation entre les composés parents et leurs métabolites.....	345
v. Comparaison entre espèces et avec la littérature.....	347
c. Corrélation entre les azoles et néonicotinoïdes .....	348
d. Corrélation avec la matrice plasma .....	350
i. Azoles .....	350
ii. Néonicotinoïdes.....	352
iii. Propriétés physico-chimiques.....	353
4. Bilan des concentrations dans les plumes .....	357



## 1. Méthode de préparation de l'échantillon et d'analyse de l'extrait

Tous les développements en injection directe (ID) à savoir les tests de paramètres de sources, de colonnes, de phases éluantes sont identiques à ceux mentionnés dans le chapitre 4 portant sur la matrice plasma. Ces tests préliminaires ainsi que ceux développés dans cette partie n'intègrent pas systématiquement les 6 « nouveaux » azoles suivants : le bitertanol, le bromuconazole, le fluquinconazole, l'ipconazole, le myclobutanil et le triticonazole. En effet, ceux-ci ont été ajoutés ultérieurement. Leurs performances en matrice plasma, à savoir le rendement et la linéarité, ont bien été évaluées en fin de développement et ont été présentées dans le chapitre 2 matériel et méthodes. Comme l'extraction est unique pour toutes les molécules, les résultats des trois familles de molécules seront présentés dans ce chapitre pour la matrice plume.

Les développements analytiques ont essentiellement porté sur le choix de la méthode d'extraction accompagnée de son solvant ainsi de l'éventuelle nécessité d'avoir une étape de purification par SPE de l'extrait. Toutes les étapes de préparation de l'échantillon présentées sur la Figure 67 (exemple : le pré-lavage des plumes, séchage, découpage et broyage) sont identiques quel que soit le protocole testé. Si l'extraction est réalisée à l'aide d'un mélange de solvants méthanol/eau MQ, des étapes d'évaporation utilisant le rapidvap ainsi qu'une purification par SPE doivent suivre. En revanche, si l'extraction est réalisée uniquement avec du méthanol, des étapes de centrifugation puis de filtration doivent être exécutées en suivant. En fin de filtration, après ajout d'eau MQ et évaporation du solvant organique, une étape de purification par SPE peut également être réalisée si nécessaire. L'étape d'évaporation au flux d'azote est ensuite réalisée avant l'analyse par LC-MS/MS (injection de 5  $\mu$ L d'une aliquote de l'extrait sauvegardé).

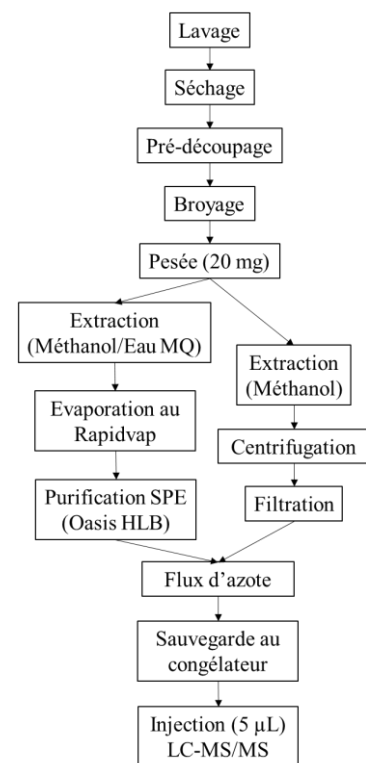


Figure 66 : Etapes du protocole analytique pour l'analyse des plumes

### a. Optimisations à l'étape d'extraction

Trois méthodes d'extraction vont être comparées dans cette partie. Leur principe respectif a été décrit dans le chapitre 1 bibliographie et chaque protocole a été détaillé dans le chapitre 2 matériel et méthodes. Les techniques micro-ondes, ultrasons et Edge ont été testées soit avec un mélange de solvants méthanol/eau MQ soit avec uniquement du méthanol.



Pour initier le développement, uniquement les témoins protocoles solvant sans matrice plume ont été mis en œuvre. Les concentrations pour toutes les molécules sont équivalentes variant de 10 à 30 ng/g plumes excepté pour le 6-chloro-nicotinique acide, l'imidaclopride oléfine, le nicotinique acide et le prothioconazole. Ces derniers étant moins sensibles, ils ont été ajoutés à des concentrations supérieures à 100 ng/g plumes. Les concentrations en ng/g plumes sont des concentrations équivalentes si 20 mg plumes avaient été ajoutés.

Dans un premier temps, les limites de quantification (LQ) extrapolées sont comparées les unes aux autres par rapport aux LQ du témoin calibration appelé « Ki » qui n'a pas suivi le protocole (Figure 68). Les résultats obtenus en termes de rapports de LQ (LQ de la méthode d'extraction à étudier divisé par la LQ du témoin) pour les trois méthodes d'extraction avec comme solvant MeOH/Eau MQ couplées à une étape de purification par SPE.

Les rapports de LQ avec toutes les méthodes d'extraction ainsi que pour la majorité des molécules sont supérieurs à 1. Ceci signifie qu'il y a une perte de sensibilité dû au protocole. Cette perte peut être expliquée soit par une baisse de signal soit par une augmentation du bruit. C'est majoritairement la baisse de signal qui impacte les LQ ce qui signifie des pertes de composés durant les différentes étapes. Parmi les molécules impactées, on note le dinotéfurane, le prothioconazole ainsi que le nicotinique acide. La fuite de molécules pourrait éventuellement se produire durant l'étape de purification par SPE. Cette hypothèse sera vérifiée ultérieurement. Une autre hypothèse pourrait également justifier les pertes lors des transferts de flacons survenant à différentes étapes. Cette deuxième hypothèse sera également évaluée par la suite.

Si l'on compare les méthodes entre elles, les méthodes micro-ondes (MO) et ultrasons (US) semblent générer des sensibilités équivalentes. Les résultats sont également comparables pour ceux obtenus avec la méthode Edge après deux rinçages préalables des Q-Cup additionnées des filtres. Dans ce dernier cas, un gain de sensibilité est apporté au fur et à mesure des prélavages.

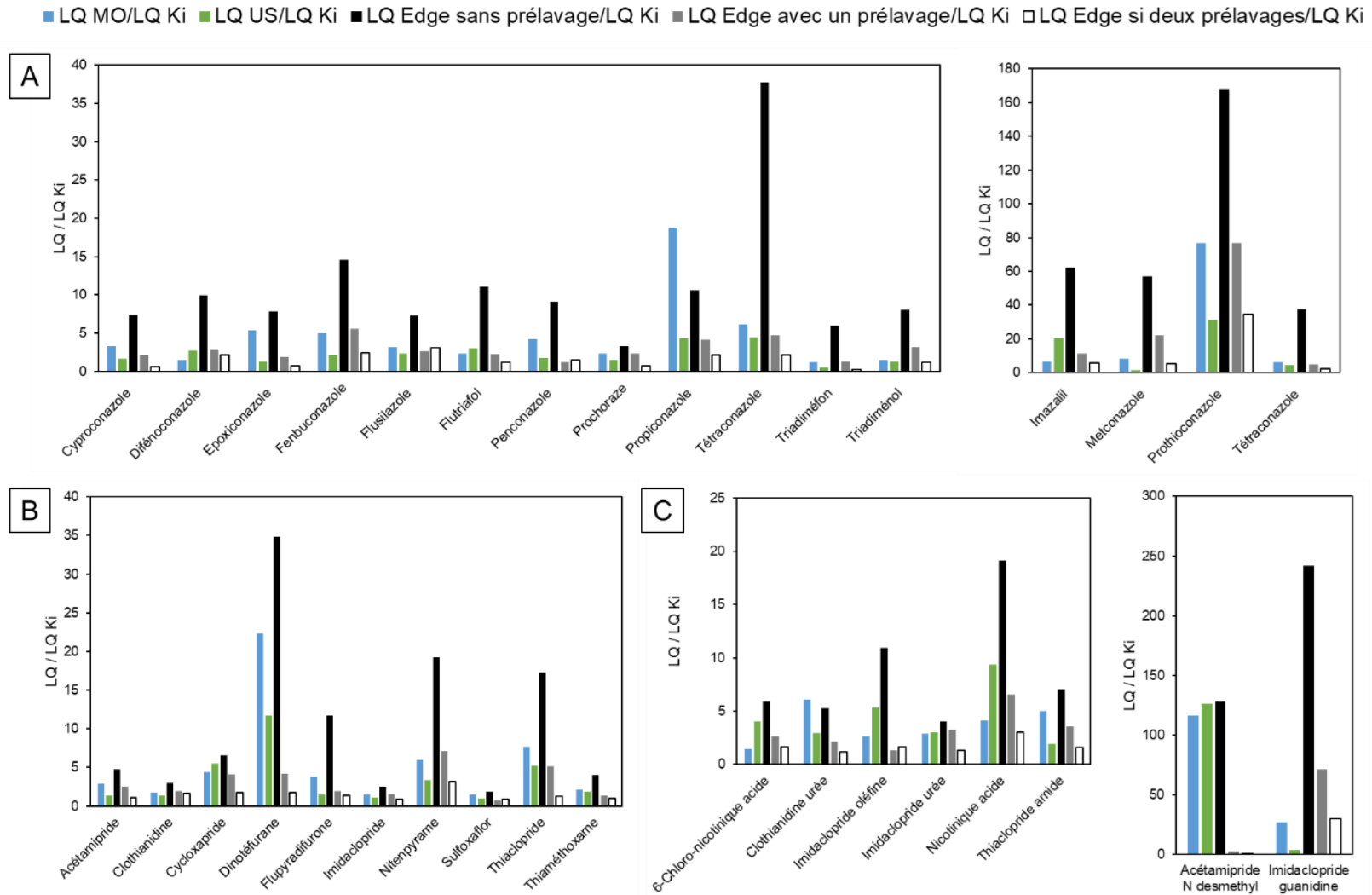


Figure 67 : Rapport des LQ obtenues par rapport au témoin « Ki » pour les trois méthodes d'extraction assistée par micro-ondes (MO), ultrasons (US), Edge pour les azoles (A), néonicotinoïdes (B) et leurs métabolites (C)

C'est le bruit (N) qui a été largement diminué (Figure 69) ; on observe une différence flagrante pour la famille des azoles entre les essais avec pré lavage et sans. Cette nécessité de pré lavage du matériel a déjà été notée pour les azoles lors de l'extraction du plasma. Au vu de ces multiples étapes de pré lavage avant d'obtenir des sensibilités équivalentes aux deux autres méthodes d'extraction, la technique Edge n'apparaît pas être le choix optimal.

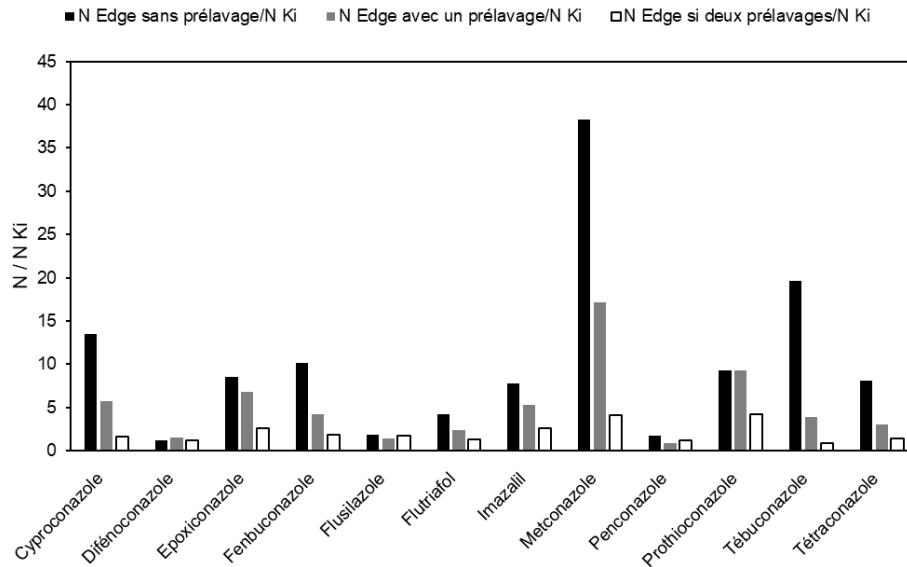


Figure 68 : Rapport des bruits par rapport au témoin « Ki » pour les azoles avec et sans pré lavage des Q-Cup et filtres Edge

Dans un second temps et toujours sans matrice, les solvants d'extraction ont été comparés pour chacune des techniques (Figure 70). Le premier protocole est identique au précédent mentionné à savoir une extraction avec le mélange méthanol/eau MQ suivie d'une purification par SPE. Quant au deuxième protocole, il inclut une extraction utilisant le méthanol sans purification. Il y a donc deux différences entre ces deux protocoles : les solvants et la présence d'une purification ou non. A noter que le graphique présenté ne permet pas de comparer les techniques entre elles mais de visualiser si le changement de solvant entraîne une amélioration. Un gain notable pour toutes les molécules est constaté avec le protocole utilisant du méthanol sans purification par SPE. Ce bénéfice peut provenir aussi bien du changement de solvant que de la suppression de l'étape de purification.

Pour la suite des tests, la technique Edge n'a pas été sélectionnée au vu de son temps de mise en œuvre plus important en raison des pré lavages à réaliser.

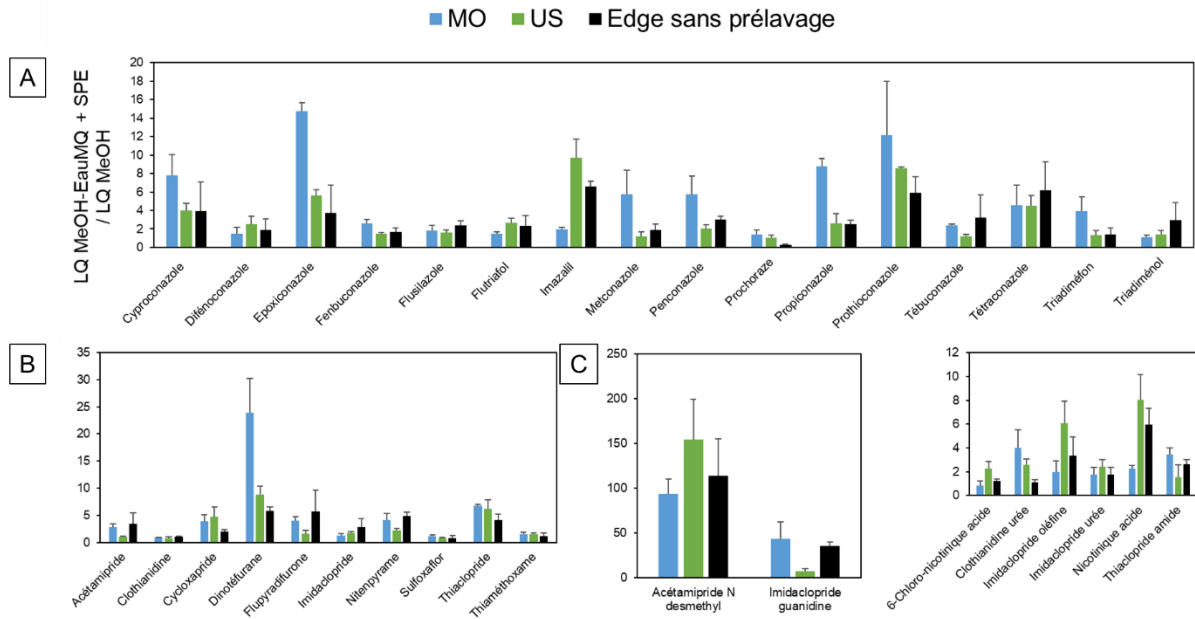


Figure 69 : Comparaison des LQ entre le protocole d'extraction au méthanol/eau avec celui seulement au méthanol pour les trois méthodes d'extraction assistée par micro-ondes (MO), ultrasons (US), Edge en azoles (A), néonicotinoïdes (B) et leurs métabolites (C)

Si l'on considère les méthodes d'extraction MO et US, comme vu précédemment, les sensibilités pour ces deux techniques d'extraction sont équivalentes. A plusieurs reprises, le manque de répétabilité s'est fait ressentir avec la technique US. Un écart-type moyen sur les rendements, lorsque les EI ont été ajoutés avant cette étape d'ultrasons, est de 21 % sans prendre en compte dans ce calcul les écart-types des EI (qui sont bien égaux à 0 % comme tous les rendements des EI sont de 100 %). Une valeur plus faible est obtenue avec la méthode micro-ondes, étant égale à 10 %. Cette différence peut éventuellement provenir du manque de chauffage à l'étape US qui serait favorable à l'homogénéisation du solvant dans le flacon lors de ces tests sans matrice plume.

C'est donc finalement la technique d'extraction aux micro-ondes qui a été sélectionnée en se basant sur les résultats de la sensibilité et de la répétabilité. Une double extraction a été testée en matrice plume supplémentée en molécules étudiées afin d'évaluer la nécessité de coupler deux étapes ou non (Figure 71). Tous les rapports des aires de la transition de quantification normalisées par la concentration en matrice plume (Aire de deux extractions divisées par l'aire d'une extraction) sont proches de 1 et aucun gain n'est obtenu. Ce qui signifie que la méthode micro-ondes employée est optimale et complète dès la première étape. L'énergie est bien suffisante pour désorber les molécules en matrice plume.

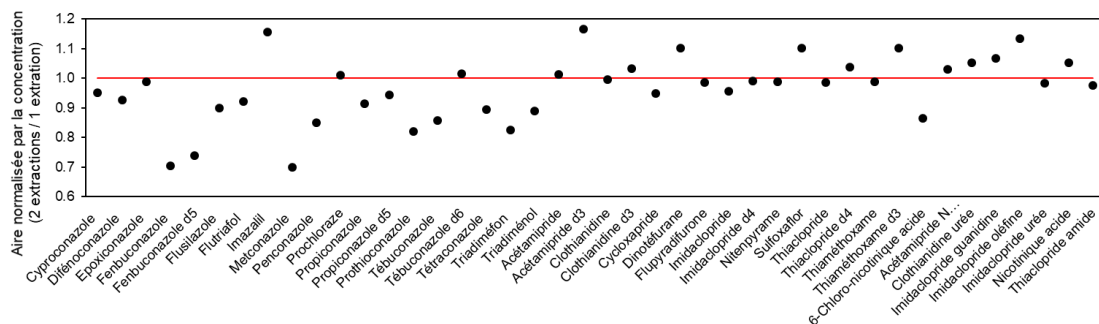


Figure 70 : Impact sur l'aire normalisée par la concentration de la double extraction assistée par micro-ondes pour les azoles, les néonicotinoïdes et leurs métabolites en matrice plume

### b. Optimisations à l'étape de purification

Le but d'une étape de purification est d'abaisser l'effet matriciel et donc le bruit afin de gagner en sensibilité. Néanmoins, si les molécules fuient sur la cartouche cela entraîne des LQ supérieures avec un abaissement de signal lors de l'analyse en lien avec les pertes associées. Cette étape peut également permettre une concentration des molécules si le volume de reprise est inférieur à celui initialement chargé.

Le test a été réalisé en prélevant 100  $\mu\text{L}$  d'un extrait méthanol d'un témoin protocole en solvant. Des précédents tests ont montré de nombreuses interférences en utilisant du matériel propre mais non neuf pour réaliser cette purification. Ce faible volume de 100  $\mu\text{L}$  permet alors de s'affranchir du matériel supplémentaire tel que les réservoirs à placer en amont de la cartouche et réduit alors les risques de générer des interférences. Les extraits purifiés sont alors comparés avec ceux non purifiés préalablement analysés également.

Certaines molécules fuient sur la cartouche Oasis HLB durant cette étape. Il s'agit du cyclozapride, de l'imidaclopride guanidine, de l'imidaclopride urée, du nicotinique acide et du prothioconazole (Figure 72). En effet, les rapports d'aire normalisée par la masse injectée entre le témoin solvant et le témoin SPE pour ces molécules sont supérieurs à 1,4.

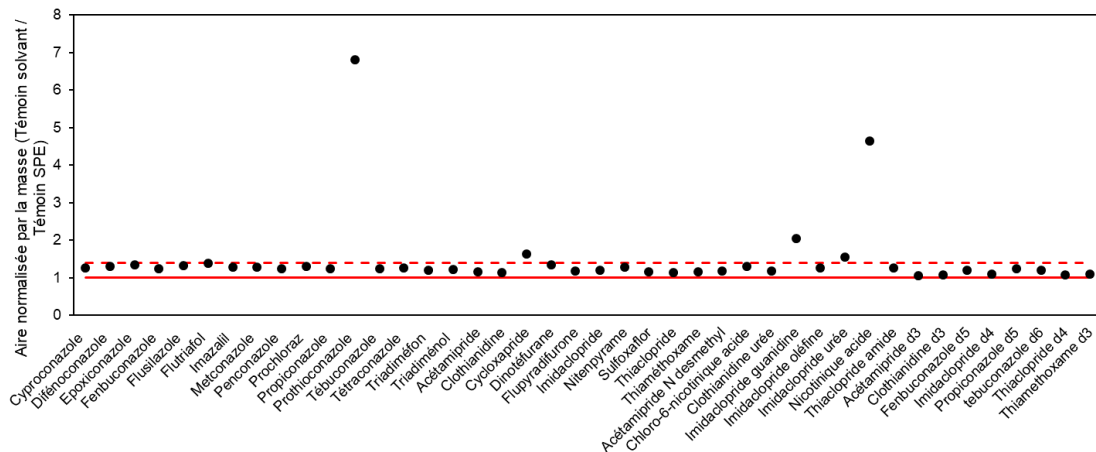


Figure 71 : Aire normalisée par la masse pour évaluer la perte de composés durant l'étape de purification SPE

On peut constater qu'aucun des étalons internes ne fuient (rapports compris entre 1 et 1,2). Sachant que le calcul des rendements pour les molécules est réalisé à partir des aires de son étalon interne associé : cela signifie que les rendements pour toutes les molécules peuvent également être observés au même titre que les aires normalisées. Comme aucun des EI n'a de comportement similaire aux molécules qui fuient, les rendements d'extraction de celles-ci seront donc faibles et ne pourront être corrigés.

Pour ces molécules qui fuient, aucune amélioration sur la sensibilité n'est attendue. Pour les autres molécules, la purification par SPE peut être avantageuse. La purification a été testée de façon à s'approcher des LQ mentionnées dans la publication de Humann-Guillemot et al. (2019). Avec et sans purification, les sensibilités obtenues en solvant et en matrice plume dopée à la LQ pour les cinq néonicotinoïdes identiques aux molécules présentes dans la littérature (Humann-Guillemot et al., 2021, 2019) sont présentées Figure 73. Les LQ de ces deux publications sont également mentionnées sur le graphique.

En solvant, les LQ sont rehaussées pour toutes les molécules lorsque la purification par SPE est réalisée excepté pour la clothianidine où un léger gain est observé. En matrice plume, les sensibilités sont améliorées avec l'étape de purification SPE pour l'acétamipride et l'imidaclopride. A contrario, la purification par SPE n'est pas favorable pour la clothianidine, le thiaclopride et le thiaméthoxame. En réalisant la purification SPE, les sensibilités n'atteignent pas celles de la publication de Humann-Guillemot et al. (2019) pour ces trois molécules. Pour ces raisons, les extraits seront injectés sans avoir subi d'étape de purification.

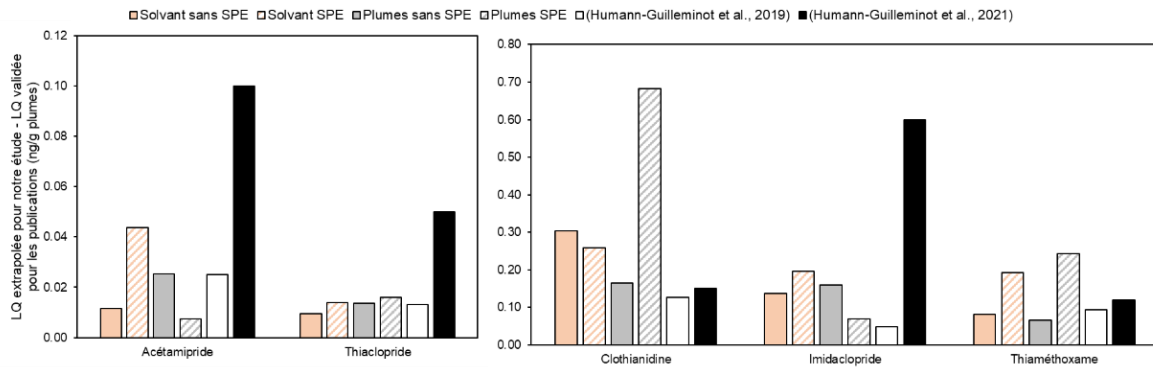


Figure 72 : LQ extrapolées en solvant et en matrice plume avec et sans purification par SPE comparées avec les LQ validées dans la littérature

Les sensibilités finales sans purification par SPE de toutes les autres molécules ont préalablement été données dans le chapitre 2 matériel et méthodes. Elles sont comprises entre 0,02 et 200 ng/g de plumes pour le thiaclopride et le bitertanol respectivement.

### c. Evaluation des pertes le long du protocole retenu

Le protocole retenu est l'extraction MO sans purification par SPE. Les étalons internes ont été ajoutés avant et après chaque étape du protocole afin d'évaluer les pertes tout au long de celui-ci (Figure 74). Ces tests ont été réalisés en solvant et également en matrice plume qui permettra non seulement d'inclure les pertes liées au protocole mais également les phénomènes liés à la matrice.

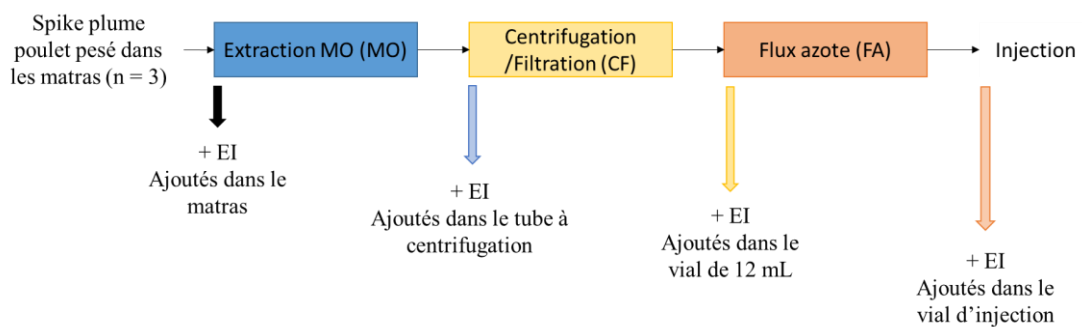


Figure 73 : Etapes du protocole retenu et ajout des étalons internes pour quantifier les pertes

La Figure 75 illustre les rendements par étalonnage interne en solvant sans matrice plume ajoutée.

Pour les azoles, le prochloraze présente un rendement moyen dès le témoin solvant de  $74 \% \pm 1 \%$  qui est bien supérieur au  $60 \%$  requis pour validation de la molécule. Aux étapes suivantes, un phénomène lié au protocole vient augmenter les rendements du prochloraze pour finalement redescendre à un rendement moyen de  $63 \% \pm 1 \%$ . Cette molécule semble sensible au protocole flux d'azote. Le prothioconazole présente des rendements inférieurs à  $40 \%$  ( $35 \% \pm 5 \%$ ) et ne sera donc pas validé avec ce protocole suite à ce problème de quantification. Lorsque les 6 « nouveaux » azoles ont été ajoutés au protocole (résultats non réalisés pour toutes les étapes du protocole), leurs rendements d'extraction ont été observés en témoin solvant. Le fluquinconazole n'a pu être validé puisque des pertes durant le protocole ont été observées obtenant un rendement moyen de  $32 \% \pm 55 \%$  (avec une forte variabilité). Par la suite, aucun étalon interne n'a pu corriger cette perte. Tous les autres azoles subissent de légères pertes tout au long du protocole.

Pour les néonicotinoïdes, aucun phénomène particulier n'est observé. Toutes les molécules sont validées avec ce protocole où de légères pertes sont également visibles au fur et à mesure du protocole. En revanche pour les métabolites des néonicotinoïdes, un effet du protocole survient sur l'imidaclopride guanidine au niveau de l'étape d'extraction. Soit cet effet s'estompe soit la molécule est légèrement perdue lors des étapes suivantes pour finalement atteindre un rendement moyen de  $88 \% \pm 8 \%$  en fin de protocole. Le nicotinique acide présente un effet protocole positif où les rendements peuvent excéder les  $160 \%$ . Cette molécule n'est donc pas validée avec ce protocole. Ce graphique conforte le résultat de la double extraction qui n'a présenté aucun gain pour toutes les molécules. En effet, n'ayant aucune perte lors de l'extraction MO il est normal de ne pas avoir de bénéfice à réitérer cette extraction.

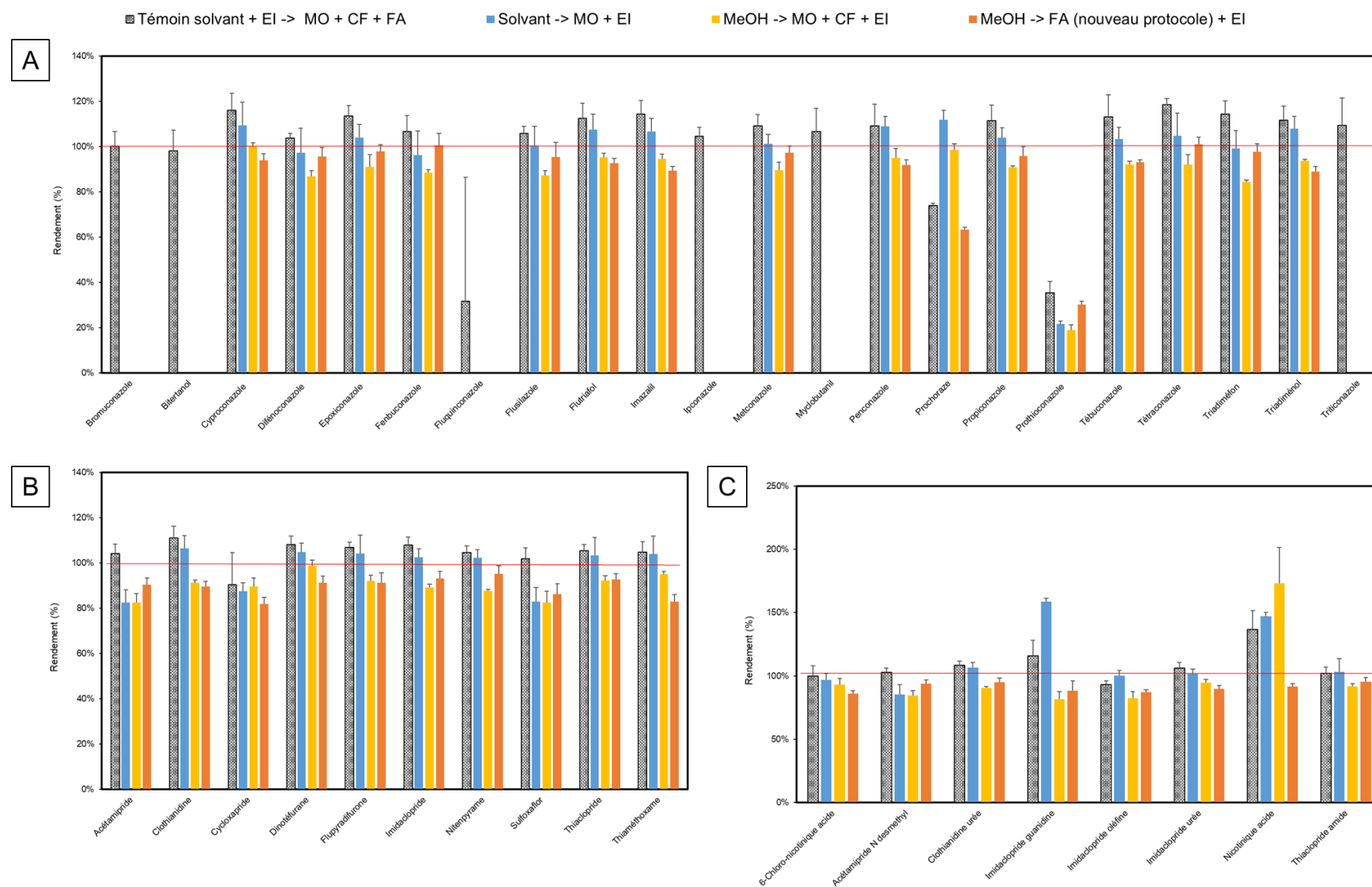


Figure 74 : Rendements par étalonnage interne tout au long des étapes du protocole retenu pour les azoles (A), les néonicotinoïdes (B), et leurs métabolites (C) en solvant



La Figure 76 illustre les rendements par étalonnage interne à ces mêmes différentes étapes mais cette fois-ci en matrice plume. La référence mentionnée sur le graphique en noir est le témoin solvant qui a suivi tout le protocole.

Aucune perte majeure n'a lieu lors de l'étape d'extraction MO en matrice plume tout comme en solvant, ce qui justifie également la non utilité de doubler l'extraction.

Les principales pertes, et ce pour toutes les molécules, se retrouvent au niveau de l'étape du flux d'azote. C'est pourquoi, celui-ci a été amélioré avec l'obtention de rendements très légèrement supérieurs. La modification a porté sur le rinçage du flacon en utilisant un insert de 500  $\mu\text{L}$  contre un de 300  $\mu\text{L}$  précédemment. Plusieurs étapes de rinçage ont ainsi pu être ajoutées permettant d'augmenter légèrement les quantités récupérées. Les molécules étudiées sont sensibles à l'évaporation. En effet, il ne faut surtout pas laisser l'extrait aller à sec au risque de perdre les molécules suivantes : l'acétamipride, le cycloxapride, le flupyradifurone, le prochloraze, le sulfoxaflor ainsi que le thiaméthoxame.

Concernant les molécules initialement non validées en solvant, un comportement différent en matrice plume est visible pour le prothioconazole qui présente un effet matriciel positif avec des rendements bien plus élevés (169 %  $\pm$  48 % en matrice plume contre 35 %  $\pm$  5 % en solvant), de même pour le nicotinique acide mais moins prononcé (160 %  $\pm$  19 % en matrice plume contre 137 %  $\pm$  15 % en solvant). Le fluquinconazole, lui, a le même comportement en matrice plume que sans.

Cette figure permet également d'illustrer le même comportement en matrice plume qu'en solvant pour l'imidaclopride guanidine qui présente des rendements supérieurs à 120 %. Un effet matriciel négatif affecte éventuellement le penconazole (rendement moyen de 70 %  $\pm$  5 % en matrice plume contre 109 %  $\pm$  4 % en solvant) et le 6-chloronicotique acide (rendement moyen de 75 %  $\pm$  10 % en matrice plume contre 97 %  $\pm$  5 % en solvant). Ces remarques vont être vérifiées dans la partie suivante avec un test approprié.

Chapitre 5 : Développements analytiques et applications en matrice plume

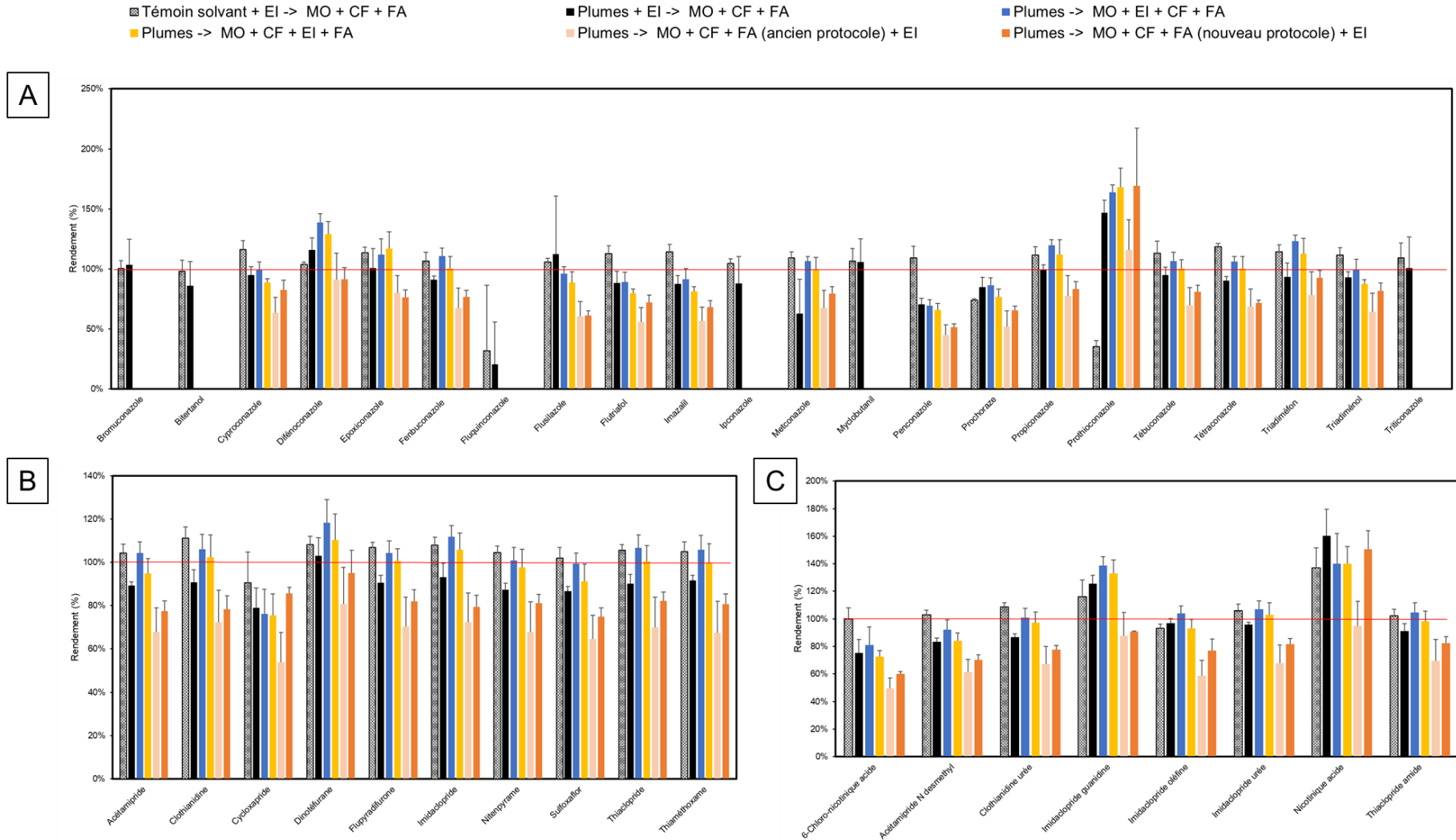


Figure 75 : Rendements par étalonnage interne tout au long des étapes du protocole retenu pour les azoles (A), les néonicotinoïdes (B), et leurs métabolites (C) en matrice plume

#### d. Effets matriciels du protocole retenu

Afin d'évaluer l'effet matriciel précédemment constaté, une expérience a été réalisée. La plume de référence est extraite et suit tout le protocole. Les étalons internes et les natifs sont ajoutés juste avant l'injection dans le flacon. Les molécules n'ont donc pas subi le protocole et les variations d'aire et de sensibilité seront uniquement dû à l'effet matriciel lié à la plume. Le Tableau 53 recense les résultats obtenus après dopage de l'extrait plume à deux concentrations : à la LQ (où les 6 « nouveaux » azoles développés ultérieurement ne sont pas présents) et une à forte concentration. Ce tableau n'inclue pas les valeurs pour les molécules précédemment non validées avec ce protocole (le fluquinconazole, le prothioconazole et le nicotinique acide).

Les codes couleurs du tableau sont les suivants : vert foncé pour un rapport inférieur à 0,50, vert clair lorsqu'il est compris entre 0,50 et 1,50 soit une marge de 50 % et enfin rouge foncé pour un rapport supérieur à 1,5. Deux rapports sont réalisés entre les résultats en matrice plume obtenus en fonction de ceux du témoin de calibration « Ki » avec le premier concernant les aires normalisées par la masse de molécules et le deuxième sur les LQ.

A forte concentration, tous les rapports en aire normalisés par la masse sont compris dans les 50 % de la valeur de référence fournie par le témoin « Ki » (entre 0,5 et 1,5) excepté l'imidaclopride guanidine. L'effet matrice plume est positif en termes d'aire pour cette molécule. A contrario, pratiquement tous les rapports en termes de sensibilité sont supérieurs à 1,5. Cela signifie qu'un fort effet matriciel existe en matrice plume avec une augmentation du bruit.

Lorsque l'on se focalise sur les résultats obtenus à la LQ, les mêmes conclusions peuvent être réalisées. La faible concentration fait en revanche apparaître des rapports plus élevés en termes d'aire normalisée pour l'acétamipride, l'acétamipride N desmethyl et le tébuconazole. Ces trois molécules sont présentes dans la matrice de référence plume c'est pourquoi l'aire par rapport à la masse ajoutée a été surestimée. Pour ces trois molécules les valeurs élevées ne relatent donc pas d'un effet matriciel positif.

En revanche, le potentiel effet matriciel négatif évoqué précédemment n'est pas observé à ces deux concentrations pour le penconazole et le 6-chloronicotinique acide.

Tableau 53 : Aires normalisées par la masse et LQ comparées par rapport aux valeurs du coefficient de réponse « Ki » afin de déterminer l'effet matrice plume (n = 3 à deux concentrations)

	Dopage à la LQ (n = 3)		Dopage à forte concentration (n = 3)	
	Moyenne Aire/masse matrice plume/Ki	Moyenne LQ matrice plume/Ki	Moyenne Aire/masse matrice plume/Ki	Moyenne LQ matrice plume/Ki
Bitertanol	Pas dans la solution		1,20	3,47
Bromuconazole	Pas dans la solution		0,79	5,45
Cyproconazole	1,35	1,90	1,04	2,21
Difénoconazole	1,31	9,84	1,19	3,45
Epoxiconazole	1,14	2,57	0,90	1,49
Fenbuconazole	1,14	2,42	1,08	3,47
Fenbuconazole d5	1,35	2,03	1,11	3,31
Fluquinconazole	Pas dans la solution		Non validé	
Flusilazole	0,96	1,04	0,74	1,96
Flutriafol	1,24	2,42	0,96	1,96
Imazalil	1,07	1,41	0,87	0,78
Ipconazole	Pas dans la solution		0,88	2,93
Metconazole	0,76	1,99	0,90	1,35
Myclobutanil	Pas dans la solution		1,19	0,82
Penconazole	0,92	4,58	0,76	3,03
Prochloraze	1,05	1,88	0,83	1,94
Propiconazole	1,40	1,61	0,98	2,05
Propiconazole d5	1,43	18,02	1,04	31,95
Prothioconazole	Non validé			
Tébuconazole	1,63	1,14	0,97	1,82
Tébuconazole d6	1,58	4,71	1,16	5,44
Tétraconazole	1,19	16,40	0,82	13,34
Triadiméfon	1,85	4,09	1,13	4,89
Triadiménol	1,42	11,61	1,10	16,93
Triticonazole	Pas dans la solution		1,12	7,21
Acétamipride	3,32	0,92	1,05	4,35
Acétamipride d3	1,46	0,63	1,12	1,10
Clothianidine	1,20	1,62	1,05	2,02
Clothianidine d3	1,52	1,76	1,17	1,57
Cyclozapride	1,00	5,96	1,05	2,36
Dinotéfurane	1,58	4,06	1,22	6,04
Flupyradifurone	1,36	3,42	1,09	4,97
Imidaclopride	1,92	1,27	1,29	1,02
Imidaclopride d4	1,86	1,78	1,40	0,92
Nitenpyrame	1,35	2,58	0,99	5,08
Sulfoxaflor	1,26	0,71	0,99	1,21
Thiaclopride	1,40	2,65	1,05	3,04
Thiaclopride d4	1,47	8,09	1,14	4,09
Thiaméthoxame	1,19	2,08	1,09	1,64
Thiaméthoxame d3	1,50	2,25	1,17	2,05
6-Chloro-nicotinique acide	1,34	1,46	1,05	0,93
Acétamipride N desmethyl	4,15	1,90	0,93	8,23
Clothianidine urée	1,31	2,48	1,00	1,79
Imidaclopride guanidine	3,11	0,36	1,69	1,05
Imidaclopride oléfine	1,70	0,81	1,24	3,05
Imidaclopride urée	1,94	3,71	1,19	3,28
Nicotinique acide	Non validé			
Thiaclopride amide	1,43	3,37	1,10	2,25

A : Azoles, Ki : Coefficient de réponse, LQ : Limite de Quantification, M : Métabolites des néonicotinoïdes, N : Néonicotinoïdes

vert foncé : rapport inférieur à 0,50, vert clair : rapport compris entre 0,50 et 1,50, rouge : rapport supérieur à 1,5

Pour caractériser les effets matriciels plumes entre les espèces d'oiseaux échantillonnées, les LQ extrapolées des étalons internes ajoutés lors de l'analyse des échantillons ont été étudiées (Figure 77). Pour les EI azolés, de meilleures sensibilités sont obtenues en matrice plume de poulet pour le fenbuconazole d5. Pour le propiconazole d5 c'est en matrice plume de goélands bruns ou argentés que les LQ sont plus faibles. Quant au tébuconazole d6, les sensibilités sont équivalentes selon les espèces. Des différences matricielles sont également présentes pour les EI des néonicotinoïdes. De meilleures sensibilités sont obtenues pour tous les EI en matrice plume de poulet et les plus élevées sont engendrées par la matrice plume de merles noirs. Les écarts entre espèce sont néanmoins moins importants qu'en matrice plasma.

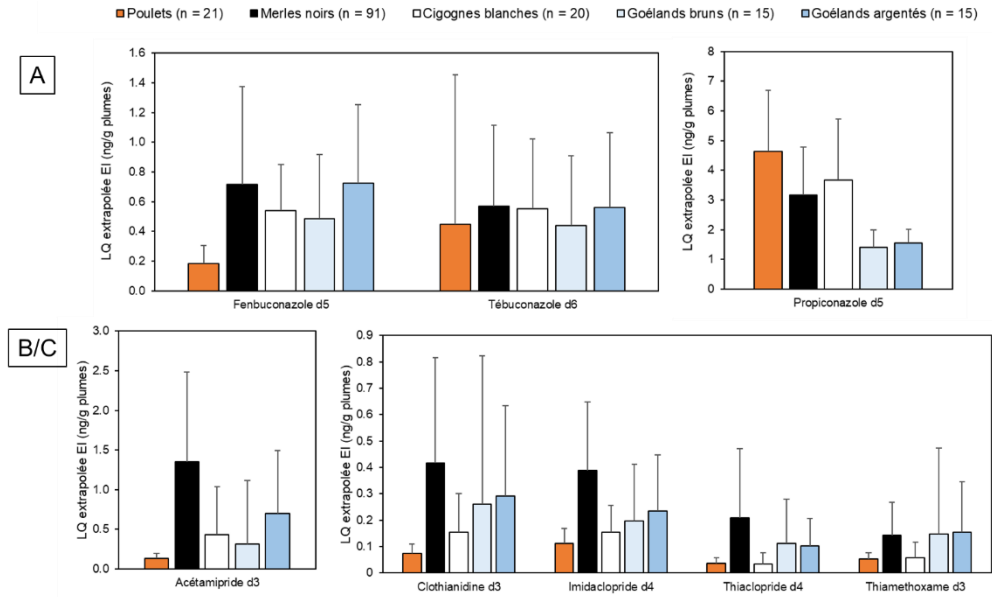


Figure 76 : LQ extrapolées des étalons internes (EI) dans les échantillons de plumes des différentes espèces afin de regarder l'effet matriciel pour les azoles (A), les néonicotinoïdes et leurs métabolites (B/C)

Ne pouvant réduire cet effet matriciel par la purification par SPE qui fait perdre des composés, un autre levier a été mis en œuvre au niveau de l'injection.

### e. Optimisations à l'injection

De façon à améliorer les sensibilités en matrice plume à l'injection, plusieurs paramètres ont été testés.

Tout d'abord, la tension EMV au niveau du détecteur, préalablement fixée à + 200 V peut être augmentée à + 400 V. Cette augmentation de signal peut également générer une élévation du bruit. Le rapport des sensibilités (LQ obtenue avec EMV de 200 divisée par la LQ avec EMV de 400 V) est observé pour toutes les molécules (Figure 78). Dans notre cas, les rapports de LQ montrent une amélioration de la sensibilité pour la plupart des molécules bien que les LQ de certaines soient augmentées.

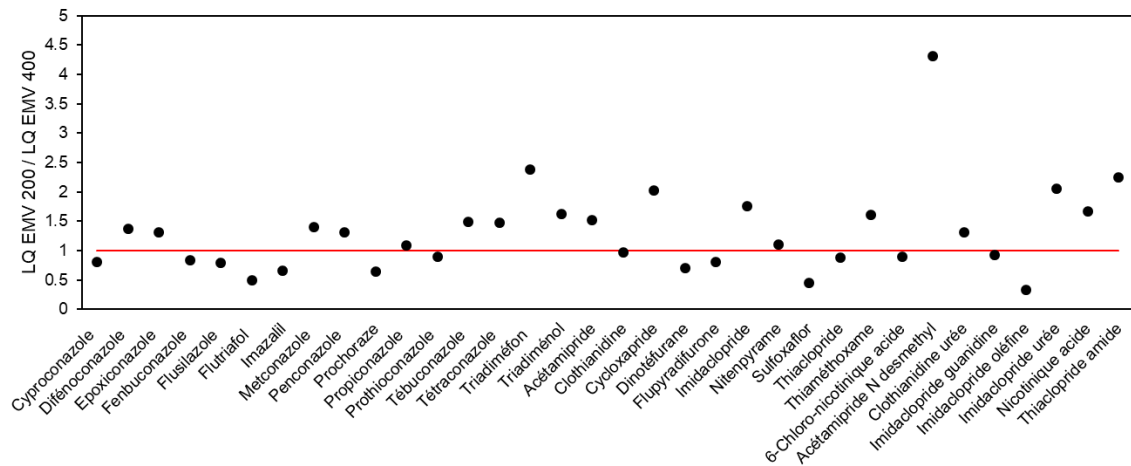


Figure 77 : Impact de la tension EMV sur les LQ de la plume de référence dopée à la LQ

En faisant varier les « dwell time » afin d’avoir des temps d’acquisition plus longs pour une transition donnée, le signal peut également être augmenté. Cela a été testé en réalisant une méthode d’acquisition uniquement pour 5 néonicotinoïdes s’agissant des molécules analysées dans une publication (Humann-Guillemot et al., 2021, 2019) à titre de comparaison entre leur méthode et la nôtre (appelée 5N dans le chapitre 2 matériel et méthodes). Celle-ci réunit l’acétamipride, la clothianidine, l’imidaclopride, le thiaclopride et le thiaméthoxame et sont les deux seules publications mentionnant l’analyse des néonicotinoïdes en matrice plume. Cette séparation a engendré une nette amélioration (Figure 79) en termes de sensibilité pour trois néonicotinoïdes sur les cinq. Le premier point, avec un « dwell time » plus faible est la LQ obtenue pour la méthode d’acquisition avec toutes les molécules. D’autres méthodes d’acquisitions, en dMRM ou en MRM, ont été testées avec d’autres temps d’acquisition. C’est finalement la méthode en dMRM 5N avec un temps de cycle augmenté à 1200 ms (contre 800 ms initialement) qui a été sélectionnée présentant des « dwell time » respectivement pour les 5 molécules de : 200, 130, 130, 400 et 200 ms.

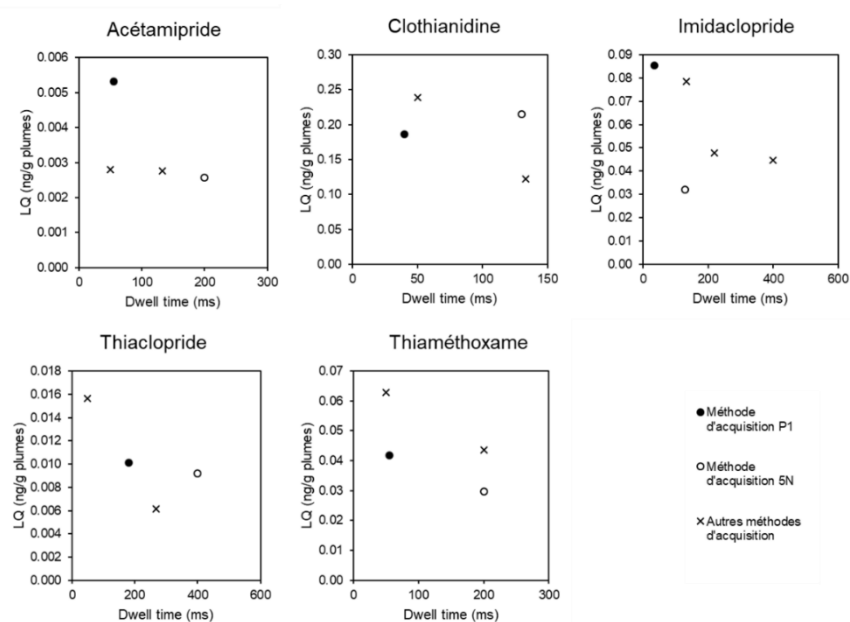


Figure 78 : Impact des « dwell time » pour les 5 néonicotinoïdes sur la sensibilité de la plume de référence dopée à la LQ

Les publications mentionnent souvent une dilution de l'extrait avec de l'eau MQ avant son injection. Cette dilution peut permettre une amélioration si la dilution a un impact plus sur l'effet matriciel ainsi que sur la séparation chromatographique et la forme des pics, que sur la dilution des molécules. Pour ce faire, des extraits de plumes dopés à la LQ et à forte concentration ont été analysés selon trois conditions : sans dilution, une dilution par deux et une dilution par quatre. Les sensibilités obtenues, recensées dans le Tableau 54, montrent une amélioration seulement pour quelques molécules (en vert lorsque le rapport des LQ est inférieur à 1 par rapport à la référence non diluée). Les extraits seront donc finalement injectés sans dilution puisque la dilution diminue non seulement l'effet matriciel mais également les signaux des molécules.

Tableau 54 : Impact de la dilution des extraits plumes par deux et par quatre sur les LQ

	Dopage plume à la LQ		Dopage plume à forte concentration		
	LQ (Dil 2 / non dilué)	LQ (Dil 4 / non dilué)	LQ (Dil 2 / non dilué)	LQ (Dil 4 / non dilué)	
A	Bitertanol	Absent de la solution	0,6	1,5	
	Bromuconazole	Absent de la solution	0,9	1,7	
	Cyproconazole	1,1	2,8	1,5	2,0
	Difénoconazole	1,5	2,2	1,9	1,5
	Epoxiconazole	1,0	1,8	1,2	1,3
	Fenbuconazole	1,2	1,4	1,2	1,1
	Fluquinconazole	Absent de la solution		Non validé	Non validé
	Flusilazole	2,0	2,1	3,4	3,2
	Flutriafol	0,7	0,7	2,4	1,7
	Imazalil	1,6	3,7	2,8	4,7
	Ipconazole	Absent de la solution		2,3	2,2
	Metconazole	1,9	Non validé	0,8	1,0
	Myclobutanil	Absent de la solution		2,4	3,5
	Penconazole	1,2	1,2	1,2	1,8
	Prochloraze	1,2	2,9	2,2	5,4
	Propiconazole	1,2	2,2	2,2	3,3
	Prothioconazole			Non validé	
	Tébuconazole	1,1	1,2	1,3	1,5
	Tétraconazole	0,8	0,7	1,0	1,0
	Triadiméfon	1,2	0,7	1,2	1,8
	Triadiménol	1,0	1,4	1,1	0,9
	Triticonazole	Absent de la solution		1,0	1,7
N	Acétamipride	1,4	4,4	1,9	3,9
	Clothianidine	Non validé	Non validé	2,0	3,5
	Cyclozapride	1,6	1,4	1,8	1,0
	Dinotéfurane	0,2	0,8	1,5	2,4
	Flupyradifurone	1,2	1,6	1,0	0,8
	Imidaclopride	1,4	2,5	1,7	4,3
	Nitenpyrame	0,9	1,4	1,0	1,1
	Sulfoxaflor	2,2	1,2	1,8	3,1
	Thiaclopride	0,7	1,1	2,0	1,4
	Thiaméthoxame	1,8	3,3	2,4	4,0
	M	6-Chloro-nicotinique acide	2,1	3,5	1,6
Acétamipride N desmethyl		0,4	Non validé	3,3	3,1
Clothianidine urée		1,5	2,2	0,2	0,4
Imidaclopride guanidine		1,8	3,2	2,1	5,3
Imidaclopride oléfine		1,3	2,9	1,5	3,2
Imidaclopride urée		0,8	1,1	0,8	0,8
Nicotinique acide				Non validé	
Thiaclopride amide		0,5	1,2	2,4	2,5

A : Azoles, Dil : Dilution, LQ : Limite de Quantification, M : Métabolites des néonicotinoïdes, N : Néonicotinoïdes, vert : rapport inférieur à 1

## f. Comparaison des LQ avec la bibliographie

Les limites de quantifications en matrice plume obtenues pour les azoles ne peuvent pas être comparées avec la bibliographie. En effet, c'est la première fois que cette famille de molécule est analysée dans cette matrice.

Quant aux néonicotinoïdes, seules deux publications retracent leur analyse en matrice plume (Humann-Guillemot et al., 2021, 2019). La comparaison des LQ pour les molécules en commun est compilée dans la Figure 80 (réalisée à partir de la Figure 39 chapitre 2 matériel et méthodes). Les LQ finalement validées avec la méthode 5N se rapprochent de celles obtenues par Humann-Guillemot et al. (2019) avec le même ordre de grandeur tout en étant légèrement supérieures dans le cas de notre étude. Le léger gain est visible lorsque les 5 molécules sont analysées séparément.

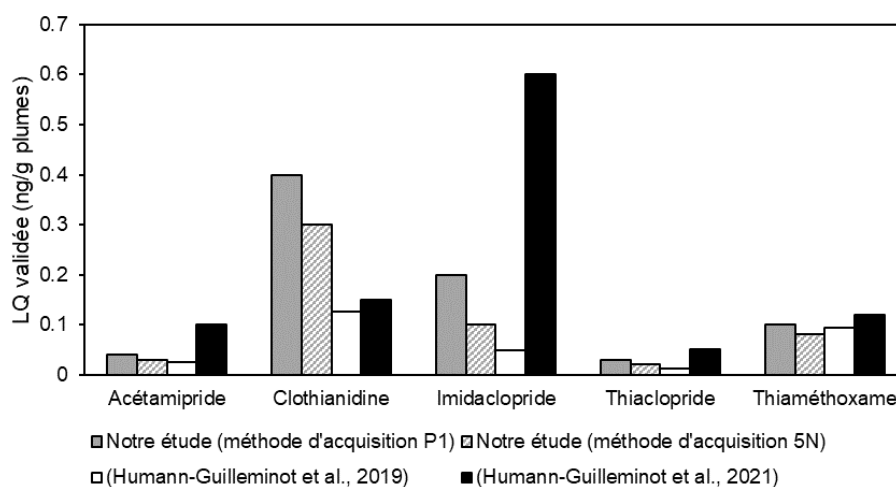


Figure 79 : Comparaison des LQ validées en matrice plume avec la littérature

La publication mentionne l'analyse avec un débit de phase mobile fixé à 0,2 mL/min et la colonne chromatographique qu'ils emploient est l'Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7  $\mu$ m). Les sensibilités obtenues avec ces conditions chromatographiques testées au laboratoire ont été comparées avec celles de la publication où il a été impossible de les égaler.

Les différences peuvent alors provenir de l'effet matrice qui est très élevé avec le protocole employé dans nos travaux. La publication, dont la méthode analytique a été entièrement décrite dans le chapitre bibliographie, mentionne une extraction à l'acétonitrile suivie d'une purification QuEChERS.

On peut aussi envisager que lors de cette étude de 2018, les LQ aient été calculées de façon approximatives car par la suite une publication plus récente des mêmes auteurs en 2021 annonce des LQ rehaussées par rapport la publication de 2018 alors que les conditions d'extraction et d'analyse sont identiques.

Il se peut alors que ce soit en effet le calcul d'obtention des LQ qui expliquent ces différences. En effet, ces auteurs mentionnent le calcul par extrapolation de la concentration calculée lorsque la molécule a été quantifiée. Néanmoins, dans notre cas, ce sont des LQ validées qui ont été vérifiées en dopant des plumes au niveau LQ et suivant tout le protocole.



Pour trois molécules seulement à savoir l'acétamipride, l'acétamipride N desmethyl et le tébuconazole, les LQ ont été calculées de la même manière que dans les deux publications en question à partir de la concentration calculée dans la matrice de référence. En effet, ces trois molécules étant déjà présentes dans la matrice plume de référence, il a été impossible de déterminer leur LQ de la même manière que toutes les autres molécules. Finalement, de meilleures sensibilités sont obtenues dans le cadre de notre étude pour ces cinq néonicotinoïdes comparé à la dernière publication de 2021 excepté pour la clothianidine qui a des résultats semblables.

Pour toutes les autres molécules dans le cadre de notre étude, les LQ validées en matrice plume sont comprises entre 0,02 et 200 ng/g plumes pour le thiaclopride et le bitertanol respectivement.

## 2. Expérience d'exposition en laboratoire

Les plumes prélevées sur les moineaux domestiques (*Passer domesticus*) de l'expérience d'exposition au tébuconazole ont été analysées uniquement en tébuconazole. La prise d'essai a été abaissée à 10 mg car la quantité de matière disponible était faible. Plusieurs échantillons semblables ont été réunis de façon à pouvoir atteindre ce poids de prise d'essai de 10 mg. La sensibilité du tébuconazole est équivalente à celle du protocole avec 25 mg de prise d'essai en raison du rehaussement des temps d'acquisition (une seule molécule étant dosée).

La Figure 81 résume les concentrations en tébuconazole quantifiées dans les plumes. Les individus provenant du groupe témoin n'ont pas été exposés au tébuconazole. Les individus du groupe expérimental ont été exposés au tébuconazole pendant 6 mois via l'eau de boisson avec une concentration de 1 mg/L. Les plumes, normalement formées en amont du début de l'expérience, ont été retirées au bout de 5 mois d'exposition (appelés pré-expérience). De nouvelles plumes se sont donc formées pendant un mois d'exposition et ont ensuite été retirées (appelées post expérience).

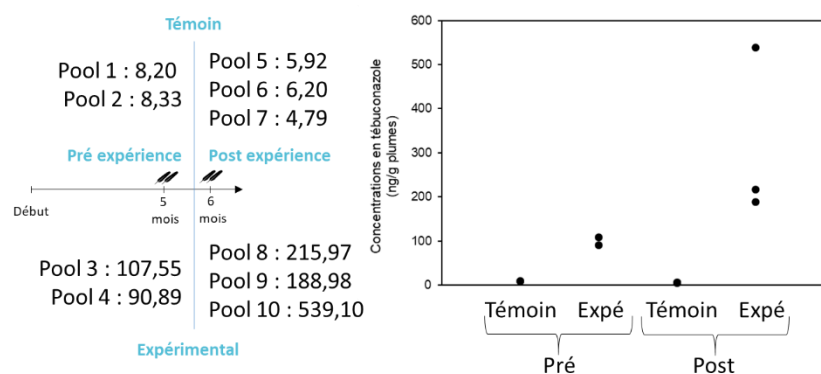


Figure 80 : Résultats de l'expérience d'exposition au tébuconazole en matrice plume

Une différence est bien observée entre les individus du groupe témoin et ceux exposés au tébuconazole. En revanche, les concentrations obtenues en tébuconazole dans les groupes témoins ne sont pas nulles ( $6,69 \pm 1,53$  ng/g plumes pré et post expérience confondus). Il aurait été logique d'attendre des concentrations inférieures à la LQ pour les groupes témoins puisqu'ils ne sont pas exposés. Ces concentrations obtenues peuvent être reliées à l'usage biocide du tébuconazole pour protéger divers matériaux de construction tels que le bois.

Les concentrations de préexposition du groupe expérimental devraient normalement être de concentrations égales à celles du groupe témoin soit inférieures à la LQ. Concernant le groupe pré expérience, ses plumes se sont totalement formées en amont du début de l'exposition au tébuconazole. L'approvisionnement en sang s'atrophie et la plume devient alors isolée du reste du corps où l'accumulation des contaminants présents dans le sang n'est pas possible. Néanmoins, des concentrations élevées et non négligeables proches de 100 ng/g plumes sont retrouvées. Il a été observé lors de l'échantillonnage de ces plumes pré expérience après 5 mois d'exposition que certaines plumes étaient manquantes sur les individus. Il se peut alors que durant ces 5 mois de vie que certaines plumes soient tombées puis auraient alors repoussées pendant l'exposition des individus. La plume ainsi nouvellement formée aurait accumulé du tébuconazole.

Durant 5 mois (au maximum dans le cas où la plume se serait formée suite à sa chute dès le lancement de l'exposition) entre la formation de la plume et son prélèvement, le tébuconazole peut être quantifié dans cette matrice. La notion de persistance et de stabilité en matrice plume est alors questionnée. Il faudrait néanmoins réaliser une expérience dédiée et conçue de façon à vérifier cette hypothèse. En effet, le plan d'expérience n'a initialement pas été réalisé pour répondre à cette question de persistance. Il était initialement conçu pour étudier l'impact du tébuconazole sur la physiologie des individus.

Les plumes post expérience, elles, ont bien poussé durant un mois d'exposition puisqu'elles ont été toutes retirées à partir de 5 mois après le début de l'expérience. Les concentrations finales  $314,68 \pm 194,82$  ng/g plumes sont alors fiables. Elles représentent bien des concentrations de plumes qui se sont formées lors d'une exposition quotidienne à 1 mg/L dans de l'eau de boisson. Le transfert de la molécule via l'eau de boisson dans les plumes est donc prouvé. Cependant, la variabilité pour ces trois valeurs est élevée et peut se justifier par la réalisation des regroupements d'échantillons ainsi d'une variabilité individuelle forte qui n'est pas lissée par l'effet des échantillons mélangés du fait d'un trop petit effectif. La variabilité individuelle inclut de nombreux facteurs tels que la quantité d'eau bue par individu, son métabolisme ou encore sa masse corporelle.

Le but est ensuite de corrélérer la dose totale ingérée par rapport aux valeurs de NOEC et DL50 du tébuconazole avec les concentrations quantifiées en matrice plume. En revanche, cette liaison ne peut être établie puisque la quantité d'eau bue par jour n'est pas connue. Connaissant cette quantité d'eau, les taux d'incorporation calculés auraient pu être comparés avec ceux mentionnés dans la littérature. Par exemple, en matrice poil de rat, le taux d'incorporation du tébuconazole est de 0,10 % par rapport au poids total de l'animal (Polledri et al., 2018) ou encore de 0,12 % pour le pesticide terbuthylazine (Mercadante et al., 2012). Il est à noter que des différences entre espèces liées à leur métabolisme variable peuvent être constatées en matrice poil pour une même dose ingérée (entre le rat et de lapin pour le diazinon (Tutudaki et Tsatsakis, 2005)) ce qui justifie l'intérêt de réaliser des études d'accumulation sur l'espèce étudiée. A ce jour, aucune publication ne permet la corrélation entre les concentrations obtenues dans les plumes (toutes espèces d'oiseaux confondues) avec la toxicité et effet de ces molécules sur l'organisme.

Ces résultats d'exposition au tébuconazole prouvent que la matrice plume peut s'avérer être un bon proxy indicateur d'une exposition à une contamination dans l'environnement. Cela a d'ailleurs été prouvé pour les cheveux humains où les concentrations retrouvées dans cette matrice sont bien corrélées avec les quantités appliquées sur leur site agricole pour le penconazole et tébuconazole (Polledri et al., 2019) (Mercadante et al., 2018). Des plumes de provenance environnementale peuvent donc être analysées. Les concentrations obtenues en matrice plume issue de l'environnement ne pourront néanmoins pas être reliées avec la toxicité pour l'individu puisqu'aucune publication ne mentionne cette corrélation.

### 3. Applications environnementales

Les données brutes des concentrations en matrice plume pour les merles noirs, cigognes blanches et goélands sont présentées en Annexe 10, Annexe 11 et Annexe 12 respectivement. Au sein de chacune de ces annexes, la partie (i) mentionne les résultats en azoles puis la partie (ii) pour les néonicotinoïdes et leurs métabolites.

Les résultats des plumes merles noirs de l'année 2017 seront très peu exploités par la suite. Ces plumes ont servi de test afin d'évaluer la faisabilité du protocole développé et la potentielle contamination des plumes d'oiseaux. Le nombre d'échantillons est faible et ne permet pas de réaliser une interprétation poussée. Les 6 « nouveaux » azoles développés par la suite n'ont pas été analysés dans ces extraits. De plus, ces extraits n'ont pas été analysés avec la méthode 5N qui a permis d'obtenir de meilleures LQ pour 5 néonicotinoïdes.

A la suite de ces premiers résultats il a fallu ajuster la gamme d'étalonnage. En effet, la première gamme vérifiait une linéarité jusqu'à seulement 20 ng/g plumes. Puis, celle-ci a été élargie à des concentrations supérieures allant jusqu'à 2000 ng/g plumes pour certains composés du fait des premiers résultats obtenus avec le set préliminaire d'échantillons de merles noirs de 2017.

D'autres échantillons, en plus grand nombre ont pu être sélectionnés pour les merles noirs capturés en 2016 et en 2019, cigognes blanches de 2019 et goélands de plusieurs années. Les résultats de ces espèces seront comparés en fonction de leur type d'habitat, de la saisonnalité de capture ainsi que de l'année de capture. Les espèces entre elles seront comparées ainsi qu'avec les valeurs mentionnées dans la littérature.

#### a. Azoles

Différents tableaux sont exposés ci-dessous pour les différentes espèces d'oiseaux. Ils compilent les fréquences de quantification, les valeurs minimales et maximales de concentrations lorsqu'elles sont supérieures à la LQ. Ces concentrations ne peuvent être comparées avec les valeurs disponibles dans la bibliographie puisqu'aucune ne mentionne leur analyse dans cette matrice. Néanmoins, cette famille de molécule a été analysée et quantifiée en matrice cheveu (Béranger et al., 2020; Mercadante et al., 2018; Peng et al., 2020; Polledri et al., 2020, 2018; Schummer et al., 2012). Les concentrations maximales pourront être alors comparées entre espèces et par rapport à cette littérature.

*i. Merles noirs*

Le Tableau 55 compile les données en azoles quantifiés dans les plumes de merles noirs. Comme dit précédemment, les 6 « nouveaux » azoles n'ont pas été analysés dans les plumes de 2017 puisqu'ils n'étaient pas encore développés au moment de l'analyse.

Le bitertanol, le bromuconazole, le flutriafol, l'ipconazole, le triadiméfon, le triadiménol et le triticonazole n'ont jamais été quantifiés lorsqu'ils ont été analysés. Le propiconazole n'a été quantifié qu'une seule fois dans un échantillon de merle de forêt de l'année 2017.

La concentration moyenne des plumes de l'expérience d'exposition au tébuconazole ( $314,68 \pm 194,82$  ng/g plumes) est comparée aux concentrations moyennes retrouvées dans les plumes des merles noirs capturés dans l'environnement du site viticole ( $239,51 \pm 315,38$  g/g plumes en 2016,  $341,96 \pm 241,60$  ng/g plumes en 2017 et  $105,27 \pm 184,67$  ng/g plumes en 2019). Les concentrations sont du même ordre de grandeur ce qui implique que la concentration 1 mg/L dans l'eau de boisson imite bien la contamination environnementale. Dans cette matrice, c'est d'ailleurs le tébuconazole qui est quantifié en plus grandes concentrations que le tétraconazole avec des rapports de concentrations de 3 en 2016, 7 en 2017 et 3 en 2016 avec un rapport dans le même sens pour les quantités vendues pour usages viticoles qui est de 6.

A première vue, les fréquences de quantification mentionnées dans le Tableau 55 ne seront pas suffisantes pour comparer les types d'habitats. Comme attendu, de nombreuses molécules sont quantifiées avec des fréquences élevées dans les plumes provenant des merles noirs des zones viticoles. En revanche, de nombreuses molécules identiques sont également fréquemment quantifiées dans les sites forestier et urbain (par exemple le difénoconazole pour les années 2016 et 2019 ainsi que le tébuconazole). Pour ces deux molécules, les niveaux sont néanmoins supérieurs en site viticole comparés aux sites témoins (forestier et urbain). La suite de la réflexion va permettre de différencier ces habitats en s'appuyant sur des figures.

Chapitre 5 : Développements analytiques et applications en matrice plume

Tableau 55 : Fréquence de quantification et moyenne des concentrations pour les azoles quantifiés dans les plumes de merles noirs 2016, 2017 et 2019

Concentrations (ng/g plumes)	2016						2017				2019			
	Forêt		Urbain		Viticole		Forêt		Viticole		Forêt		Viticole	
	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD
Bitertanol	0% (0/7)	< LQ	0% (0/8)	< LQ	0% (0/29)	< LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ
Bromuconazole	0% (0/7)	< LQ	0% (0/8)	< LQ	0% (0/29)	< LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ
Cyproconazole	86% (6/7)	0,91 ± 0,26	38% (3/8)	0,40 ± 0,02	45% (13/29)	1,87 ± 3,33	0% (0/1)	< LQ	25% (3/12)	2,87 ± 1,09	33% (1/3)	1,43	50% (16/32)	0,50 ± 0,51
Difénoconazole	29% (2/7)	0,63 ; 3,29	75% (6/8)	22,39 ± 46,79	59% (17/29)	62,29 ± 89,82	0% (0/1)	< LQ	100% (12/12)	65,69 ± 66,80	67% (2/3)	0,79 ; 0,85	97% (31/32)	38,5 ± 62,72
Epoxiconazole	29% (2/7)	3,30 ; 7,29	50% (4/8)	41,8 ± 77,71	31% (9/29)	229,02 ± 670,73	0% (0/1)	< LQ	42% (5/12)	4,84 ± 2,16	0% (0/3)	< LQ	9% (3/32)	2,78 ± 0,42
Fenbuconazole	14% (1/7)	46,53	50% (4/8)	4,25 ± 2,34	52% (15/29)	142,49 ± 245,53	0% (0/1)	< LQ	92% (11/12)	60,15 ± 50,24	0% (0/3)	< LQ	91% (29/32)	26,06 ± 44,6
Flusilazole	0% (0/7)	< LQ	25% (2/8)	1,02 ; 1,40	10% (3/29)	1,12 ± 0,69	0% (0/1)	< LQ	17% (2/12)	1,48 ; 2,44	0% (0/3)	< LQ	6% (2/32)	0,44 ; 2,25
Flutriafol	0% (0/7)	< LQ	0% (0/8)	< LQ	0% (0/29)	< LQ	0% (0/1)	< LQ	0% (0/12)	< LQ	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ
Imazalil	0% (0/7)	< LQ	13% (1/8)	0,86	10% (3/29)	0,61 ± 0,15	0% (0/1)	< LQ	0% (0/12)	< LQ	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ
Ipconazole	0% (0/7)	< LQ	0% (0/8)	< LQ	0% (0/29)	< LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ
Metconazole	14% (1/7)	0,43	25% (2/8)	0,60 ; 4,08	34% (10/29)	63,13 ± 126,05	0% (0/1)	< LQ	25% (3/12)	32,02 ± 54,07	33% (1/3)	1,39	63% (20/32)	2,08 ± 2,38
Myclobutanil	29% (2/7)	3,29 ; 8,62	63% (5/8)	9,36 ± 13,16	55% (16/29)	46,47 ± 117,38	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0% (0/3)	< LQ	41% (13/32)	2,05 ± 2,30
Penconazole	14% (1/7)	0,31	25% (2/8)	0,26 ; 0,44	34% (10/29)	1,47 ± 1,19	0% (0/1)	< LQ	100% (12/12)	12,23 ± 10,94	0% (0/3)	< LQ	69% (22/32)	12,65 ± 14,75
Prochloraze	14% (1/7)	7,22	0% (0/8)	< LQ	3% (1/29)	3,72	0% (0/1)	< LQ	0% (0/12)	< LQ	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ
Propiconazole	0% (0/7)	< LQ	0% (0/8)	< LQ	0% (0/29)	< LQ	100% (1/1)	142,58	0% (0/12)	< LQ	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ
Tébuconazole	86% (6/7)	12,91 ± 20,62	88% (7/8)	43,05 ± 88,52	90% (26/29)	239,51 ± 315,38	100% (1/1)	110,27	100% (12/12)	341,96 ± 241,60	67% (2/3)	2,86 ; 4,14	100% (32/32)	105,27 ± 184,67
Tétraconazole	14% (1/7)	26,06	25% (2/8)	53,3 ; 92,26	48% (14/29)	81,65 ± 90,21	0% (0/1)	< LQ	100% (12/12)	52,83 ± 57,22	0% (0/3)	< LQ	91% (29/32)	37,88 ± 42,34
Triadiméfon	0% (0/7)	< LQ	0% (0/8)	< LQ	0% (0/29)	< LQ	0% (0/1)	< LQ	0% (0/12)	< LQ	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ
Triadiménol	0% (0/7)	< LQ	0% (0/8)	< LQ	0% (0/29)	< LQ	0% (0/1)	< LQ	0% (0/12)	< LQ	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ
Triticonazole	0% (0/7)	< LQ	0% (0/8)	< LQ	0% (0/29)	< LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ

F<sub>q</sub> : Fréquence de quantification, LQ : Limite de Quantification, M ± SD : Moyenne ± écart-type, N.A. : Non analysé

Tout d'abord, les profils des concentrations en azoles dans les échantillons de merles noirs sont illustrés Figure 82. Pour ce faire, la concentration d'une molécule quantifiée est divisée par la somme de tous les azoles quantifiés dans ce même échantillon. La somme est alors égale à 1 et lorsqu'aucune molécule n'a été quantifiée dans l'échantillon, la valeur 0 est indiquée. Cette figure permet d'identifier les proportions pour chaque molécule et ainsi savoir lesquelles sont majoritaires. Chacune des molécules est réunie en fonction de son application ce qui permet d'observer des tendances de profil.

Pour l'année 2016, le profil des concentrations est exprimé pour chacun des individus puisqu'une diversité d'empreinte est observée.

Certains des échantillons ont une empreinte à moitié grandes cultures et viticole (représentées par les molécules suivantes : le cyproconazole et l'époxiconazole à usage grandes cultures et le tébuconazole pour des usages mixtes grandes cultures et/ou viticoles). La concentration totale pour ce premier profil en azoles n'excède pas 10 ng/g plumes (représentée par \* sur la figure). Ces échantillons sont généralement échantillonnés dans les premiers mois de l'année d'avril/mai. Le deuxième profil d'échantillons est plus orienté viticoles (représentés par les molécules suivantes en plus fortes proportions : le difénoconazole, le tébuconazole, le tétraconazole et le fenbuconazole). Ce deuxième profil survient pour les mois juin/juillet correspondant aux dates d'application de ces azoles en milieu viticole (avril/août d'après la Figure 40 du chapitre 3). De plus, les données des mousses PUF ont montré des concentrations maximales dans l'air pour les azoles appliqués en zone viticole aux mois de juin. Une date clé du 21/06/2016 peut permettre de différencier ces deux profils tout en maintenant des échantillons provenant des sites forestier et urbain après cette date également.

Pour les autres années, 2017 et 2019, les profils moyennés par type d'habitat sont synthétisés puisque les profils par individu étaient similaires. Les profils des merles noirs des zones viticoles sont bien viticoles avec les quatre mêmes molécules précédemment décrites qui prédominent. Le penconazole est également quantifié tout comme dans certains échantillons viticole et urbain de l'année 2016.

Cette différence de profil se justifie non seulement par la date de capture mais également par l'âge (juvénile ou adulte) des oiseaux. En effet, la période de reproduction débutant en mai/juin, plus de juvéniles ont été capturés après cette date. Cette information sera plus explicitée par la suite en observant la saisonnalité des concentrations.

Un bruit de fond constant et à faible concentration en tébuconazole est présent dans la plupart des échantillons et ce quel que soit l'habitat. Cela peut être relié à son usage biocide pour protéger divers matériaux de construction tels que le bois. Ces concentrations non nulles en tébuconazole ont également été obtenues dans les groupes témoins de l'expérience en laboratoire d'exposition au tébuconazole ( $6,69 \pm 1,53$  ng/g plumes).

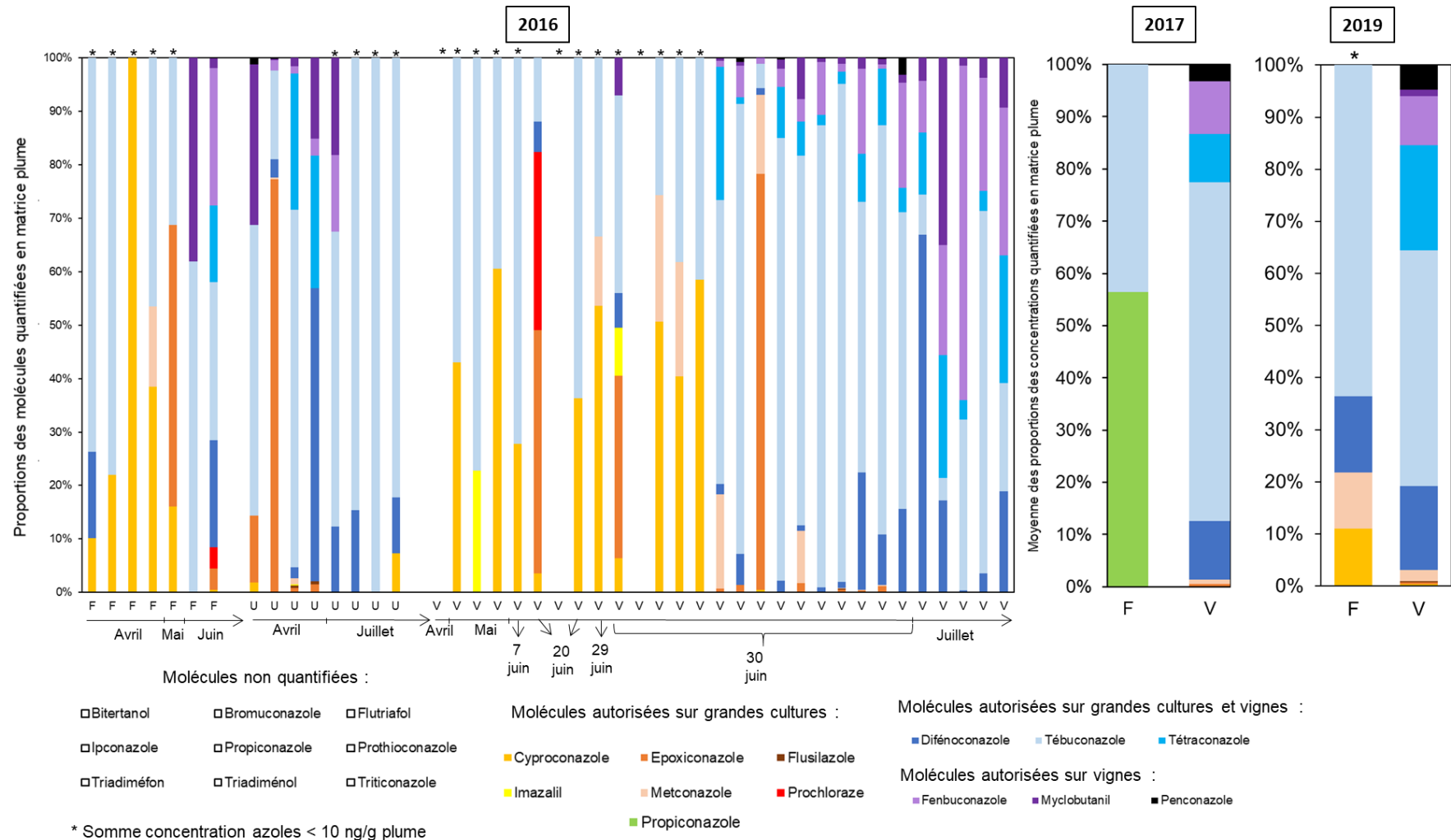


Figure 81 : Proportion des concentrations quantifiées en matrice plume pour les échantillons de merles noirs avec au moins une molécule quantifiée par individus en 2016 et moyenné par sites pour 2017 et 2019

Pour chacune des années, les sites sont comparés entre eux (Figure 83). Seules les molécules quantifiées dans au moins un échantillon apparaissent sur les graphiques. Des concentrations plus élevées sont observées pour le difénoconazole, le fenbuconazole, le tébuconazole, le tétraconazole et sur un échantillon de site viticole pour l'époxiconazole. Ces quatre premières molécules mentionnées coïncident avec les molécules retrouvées en plus fortes proportions d'après l'étude des profils précédemment explicitée.

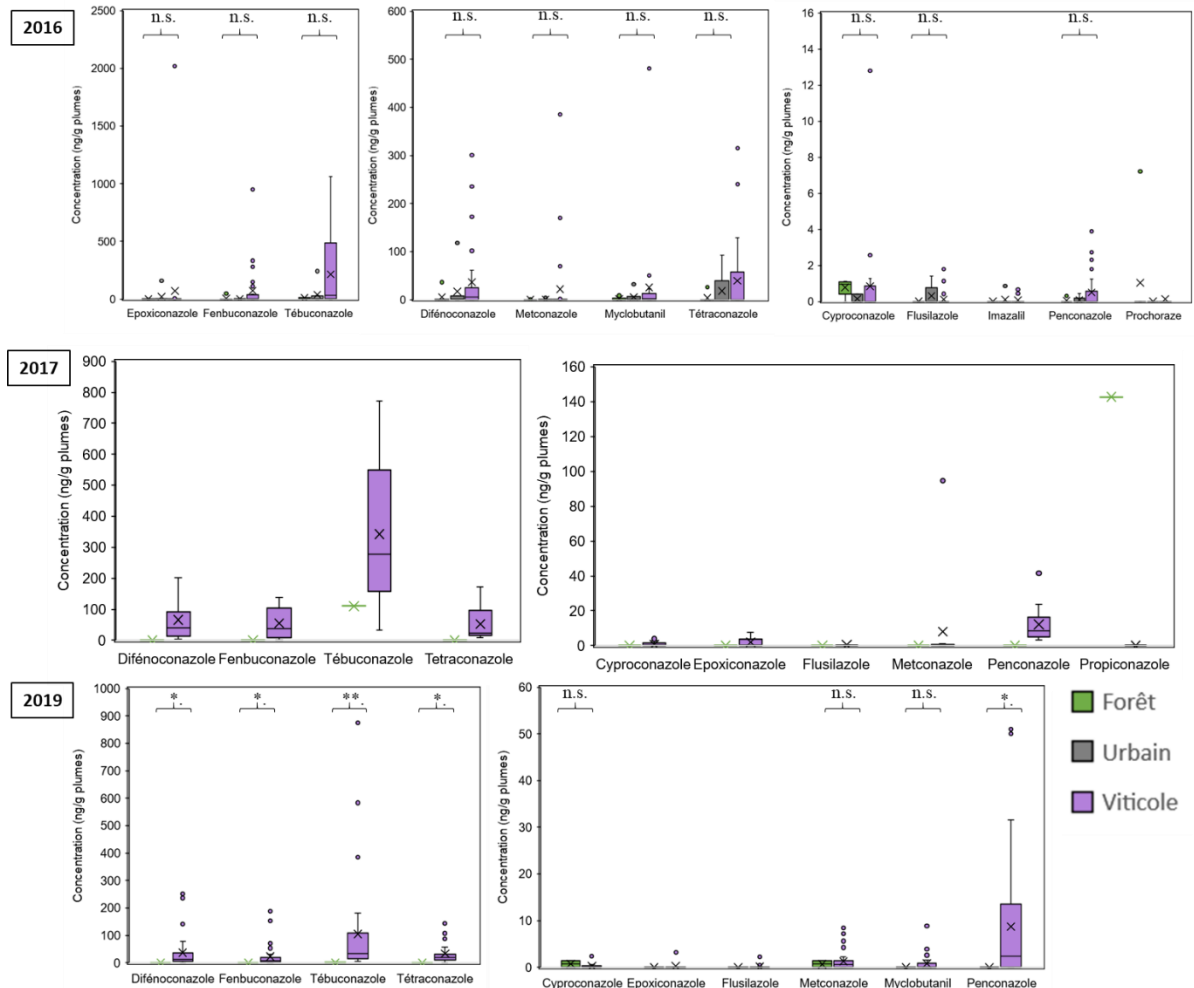


Figure 82 : Boîtes à moustaches représentant les azoles quantifiés dans les plumes de merles noirs pour les trois habitats et pour les trois années accompagnées du test statistique Kruskal-Wallis pour 2016 et Mann-Whitney pour 2019 (\* indique p-value < 5 %, \*\* < 1 %, \*\*\* < 0,1 %, n.s. : non significatif)

Des tests non-paramétriques ont ensuite été réalisés sur les molécules avec une fréquence de quantification supérieure à 20 % sur au moins un site. Les valeurs inférieures à la LQ sont remplacées par la moitié de celle-ci. Les résultats des tests de Kruskal-Wallis sont synthétisés en Annexe 13 pour les azoles.

La sous-partie (a) de cette annexe mentionne les résultats concernant la différence d'habitat. Aucune différence significative n'a été observée en comparant les trois sites de l'année 2016. Ce même test est réalisé sur l'année 2016 avec seulement les valeurs des merles noirs capturés après le 21/06/2016. Comme vu précédemment les échantillons avant cette date n'ont pas le même profil de concentrations que ceux capturés à la fin des mois de juin et juillet. Avec ce nouveau jeu de données, aucune différence de signification n'a été observée entre les trois



habitats. Dans ces deux cas, la comparaison multiple post hoc par paire n'a donc pas été réalisée puisque ces premiers tests de Kruskal-Wallis sont non significatifs.

Les tests statistiques n'ont pu être réalisés en 2017 puisqu'un seul échantillon provenant du site forestier a été analysé. Sans ces tests on peut néanmoins observer des différences entre les deux sites pour le difénoconazole, le fenbuconazole, le tébuconazole, le tétraconazole et le penconazole. Ces molécules étant plus fréquemment quantifiées et avec de plus fortes concentrations en milieu viticole.

En ce qui concerne l'année 2019, le test statistique de Mann Withney a été appliqué afin de comparer les deux niveaux viticole et forestier. Des différences significatives ont été observées pour le difénoconazole, le fenbuconazole, le penconazole, le tébuconazole et le tétraconazole entre le site forestier et viticole (où les concentrations viticoles sont supérieures à celles en milieu forestier). Toutes ces molécules sont autorisées et ont été vendues pour être appliquées sur les sites viticoles des départements de l'étude. Aucune différence n'a néanmoins été observée pour le myclobutanil et le triadiménol (non quantifié) qui sont normalement vendus et appliqué sur les sites viticoles.

Pour la suite des comparaisons, uniquement les molécules qui ont eu au moins une différence significative avec le précédent test sont retenues à savoir : le difénoconazole, le fenbuconazole, le penconazole et le tébuconazole et le tétraconazole. Toutes ces molécules sont autorisées à être appliquées en zone viticole tout comme le myclobutanil qui a également été ajouté bien que non significatif entre les milieux. Le myclobutanil, qui n'a pas été analysé sur les échantillons de 2017, n'apparaît pas pour cette année sur les graphiques.

La saisonnalité des concentrations pour ces molécules dans les plumes est observée Figure 84. Le difénoconazole et le penconazole ont été quantifiés dans les échantillons mousses PUF sur le mois d'application juin. Les autres molécules sélectionnées ont été quantifiées sur les mois avril/juin sur ce même site de capture (site n°6) des merles noirs.

Une tendance est visible pour toutes les molécules avec des concentrations plus élevées obtenues de fin juin à juillet qui coïncident avec les valeurs retrouvées dans l'air et les dates d'application de ces azoles. Cette constatation est encore plus marquée pour les individus juvéniles. En effet, ceux-ci permettent de mieux retracer la saisonnalité d'exposition puisque leurs premières plumes viennent tout juste de pousser. Celles-ci ont donc intégrée la contamination de leur mois de capture correspondant aux dates d'application des pesticides étudiés (Eulaers et al., 2011).

Pour les adultes, la mue des plumes a lieu entre les mois d'août et septembre de l'année précédant leur capture. Les concentrations retrouvées dans les plumes de merles adultes ne témoignent donc pas uniquement de la contamination de leur mois de capture. Cela peut être constaté pour le tébuconazole et tétraconazole où certains individus ont des concentrations élevées dès le mois d'avril. Même des mois après leur pousse, les plumes seraient alors capables de conserver certains pesticides. Les incertitudes sur ces concentrations de plumes adultes sont plus élevées puisque les individus ont vécu déjà un an avec leur plumage. Il se peut que celui-ci se soit reformé à des dates variables suite à des aléas de vie. L'évaluation de la contamination est alors plus représentative de la date de capture pour les juvéniles. Ceci peut également expliquer la différence non significative entre les sites sur l'année 2016 où de nombreux merles adultes ont été capturés avant le 21/06/2016. Cette variabilité entre les individus juvéniles et adultes renforce l'intérêt de comparer les habitats (forêt, urbain, viticole) uniquement sur les individus juvéniles idéalement et sur les mois de juin/juillet. En effet, ces individus juvéniles permettent plus aisément de visualiser la saisonnalité des applications en azoles et donc de différencier les habitats.

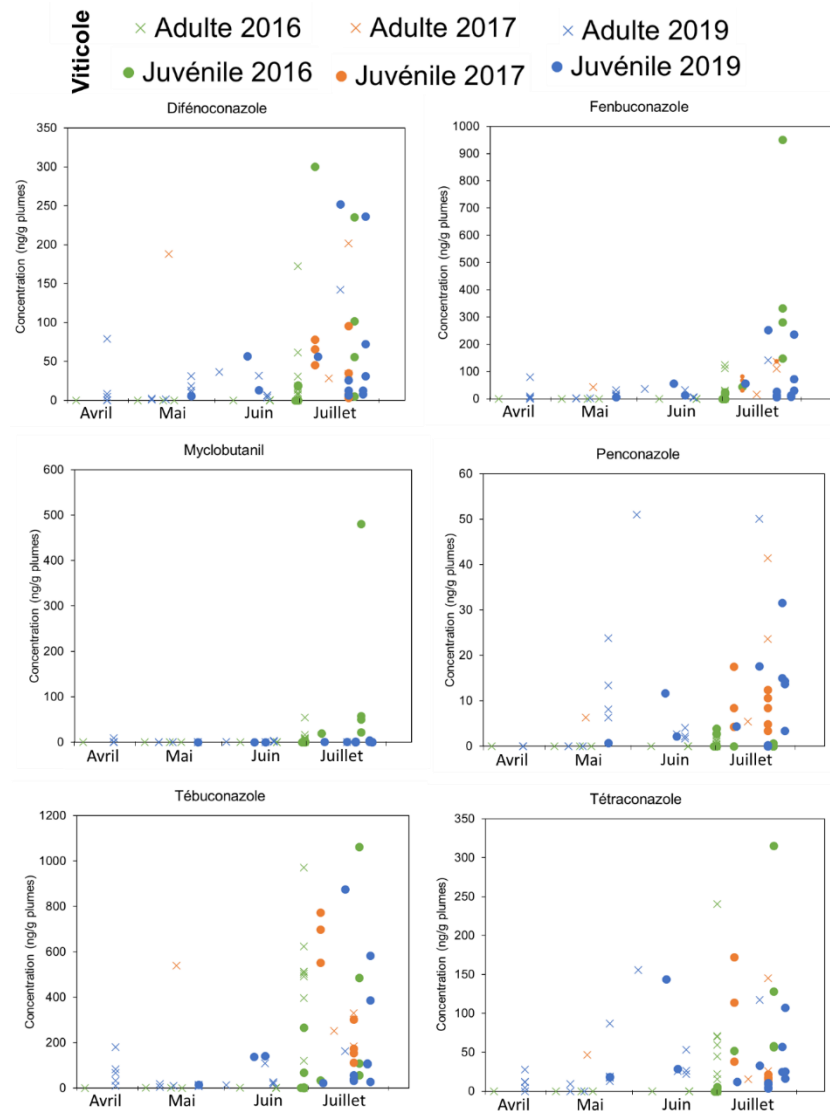


Figure 83 : Concentrations plumes pour 6 azoles reliées à la date de capture du merle noir en site n°6 viticole

Les tests de Kruskal-Wallis ont été réalisés afin de visualiser d'éventuelles différences entre les années 2016, 2017 et 2019. Ces tests ont été réalisés uniquement sur les individus juvéniles tous capturés sur les mois de juin/juillet. Sur les concentrations en myclobutanil, c'est le test de Mann-Whitney qui a été appliqué puisque seulement deux niveaux sont représentés avec les années 2016 et 2019. Les résultats de ces tests sont présentés en Annexe 13 sous-partie (b).

Aucune différence significative n'a été observée entre les trois années pour le difénoconazole, le fenbuconazole, le tébuconazole ni pour le tétraconazole. Aucune différence significative n'a été mise en évidence pour le myclobutanil entre les deux années 2016 et 2019.

A contrario, des différences significatives ont été observées pour le penconazole. Un test Post Hoc a donc été réalisé pour cette molécule où une différence significative est présente entre 2016 et 2017 ainsi qu'entre 2016 et 2019. L'année 2016 est plus faible en termes de fréquences de quantification du penconazole mais également en termes de concentrations comme vu graphiquement. Ces deux différences significatives pour le penconazole ne peuvent

pas s'expliquer par les quantités vendues entre ces années. En effet, en 2016 les quantités vendues en Nouvelle-Aquitaine (d'après le Tableau 13 du chapitre 2) pour ces deux molécules sont maximales en 2016 (199 kg pour le penconazole) contrairement à 2017 (67 kg) et 2019 (42 kg) bien que les quantités vendues soient du même ordre de grandeur.

## ii. Cigognes blanches

Chez les cigognes blanches de l'année 2019, deux sites ont été étudiés. Les données de fréquence de quantification et concentration moyenne sont compilées dans le Tableau 56. En zone marais Brouage, seul le tébuconazole a été quantifié dans 40 % des échantillons. En revanche, en zone estuaire de la Gironde plusieurs azoles ont été quantifiés avec une fréquence supérieure ou égale à 10 % à savoir : le bromuconazole, le cyproconazole et le fenbuconazole. Le difénoconazole et tébuconazole ont été les plus souvent quantifiés.

Tableau 56 : Fréquence de quantification et moyenne des concentrations pour les azoles quantifiés dans les plumes de cigognes blanches 2019

Concentrations (ng/g plumes)	2019			
	Brouage		Estuaire de la Gironde	
	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD
Bitertanol	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
Bromuconazole	0% (0/10)	< LQ	10% (1/10)	9,09
Cyproconazole	0% (0/10)	< LQ	10% (1/10)	2,13
Difénoconazole	0% (0/10)	< LQ	40% (4/10)	2,67 ± 3,74
Epoxiconazole	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
Fenbuconazole	0% (0/10)	< LQ	10% (1/10)	0,70
Flusilazole	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
Flutriafol	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
Imazalil	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
Iponazole	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
Metconazole	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
Myclobutanil	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
Penconazole	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
Prochloraze	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
Propiconazole	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
Tébuconazole	40% (4/10)	0,61 ± 0,10	100% (10/10)	1,65 ± 1,26
Tétraconazole	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
Triadiméfon	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
Triadiménol	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
Triticonazole	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ

F<sub>q</sub> : Fréquence de quantification, LQ : Limite de Quantification, M ± SD : Moyenne ± écart-type

La Figure 85 illustre le tableau sous forme de boîtes à moustaches qui permettent de prendre en compte le nombre d'échantillon quantifiés.

Les tests statistiques de Mann-Whitney ont été réalisés pour les trois molécules ayant une fréquence de quantification supérieure à 20 % chez au moins l'un des deux sites à savoir : le difénoconazole et le tébuconazole. Les valeurs à la LQ ont été remplacées par la LQ divisée par deux à savoir 0,25 et 0,20 ng/g plumes respectivement.

Le test a été réalisé afin d'évaluer la significativité de la différence observée visuellement pour ces deux molécules en fonction de leur habitat. Les différences sont significatives pour le difénoconazole ( $p$ -value = 0,035 /  $Z = -2,11$ ) et encore plus pour le tébuconazole ( $p$ -value = 0,0009 /  $Z = -3,33$ ). Bien que cette molécule soit quantifiée dans tous les habitats avec un bruit de fond constant, une différence existe en termes de fréquence et de concentration plus élevées en zone estuaire de la Gironde. Les échantillons de plumes de cigognes ont été prélevés chez des juvéniles. Elles se sont donc formées pendant les mois de capture et représentent donc l'exposition potentielle locale, pendant la période d'élevage.

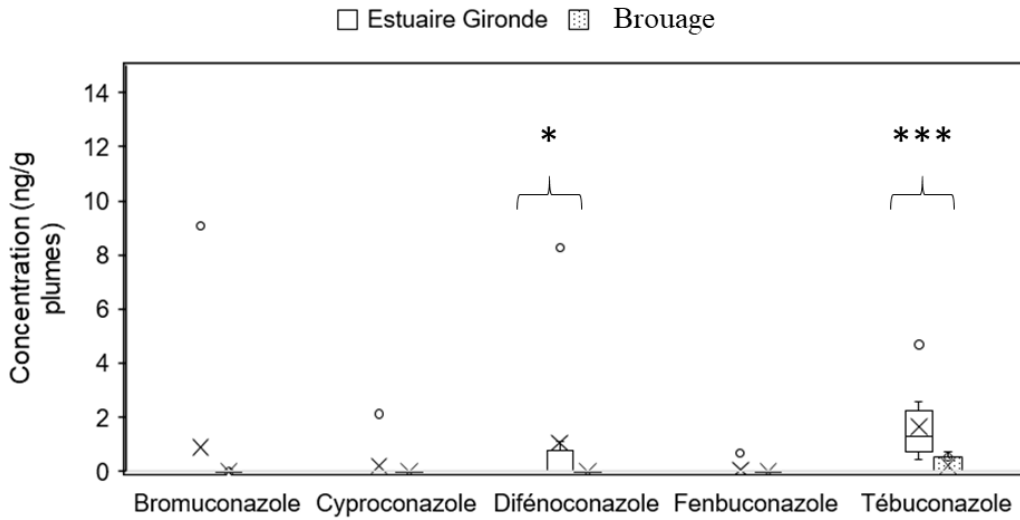


Figure 84 : Boîtes à moustaches représentant les azoles quantifiées dans les plumes de cigognes blanches pour les deux habitats accompagnées du test statistique Mann-Whitney (\* indique  $p$ -value < 5 %, \*\* < 1 %, \*\*\* < 0,1 %, n.s. : non significatif)

### iii. Goélands

Le Tableau 57 résume les moyennes et écart-types des concentrations obtenues pour les deux espèces de goélands selon les années de prélèvement de leur plume. Huit molécules sont quantifiées dans au moins un échantillon. Il s'agit du cyproconazole, du difénoconazole, du fenbuconazole, de l'imazalil, du myclobutanil, du penconazole, du propiconazole ainsi que du tébuconazole.

Aucun test statistique ne sera réalisé sur cette espèce puisque le nombre de données analysées par année et par espèce est trop faible. En effet, le critère de fréquence de quantification qui doit être supérieur à 20 % peut correspondre, selon l'espèce et l'année, à un unique échantillon positif.

Tableau 57 : Fréquence de quantification et moyenne des concentrations pour les azoles quantifiés dans les plumes de goélands bruns et argentés

Concentrations (ng/g plumes)	Goélands bruns (GB)						Goélands argentés (GA)					
	2016		2019		2020		2016		2019		2020	
	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD
Bitertanol	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
Bromuconazole	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
Cyproconazole	20% (1/5)	0,46	0% (0/5)	< LQ	14% (1/7)	0,20	20% (1/5)	0,48	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
Difénoconazole	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	60% (3/5)	0,96 ± 0,73	0% (0/3)	< LQ
Epoxiconazole	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
Fenbuconazole	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	33% (1/3)	24,28
Flusilazole	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
Flutriafol	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
Imazalil	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	14% (1/7)	0,37	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
Ipconazole	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
Metconazole	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
Myclobutanil	40% (2/5)	0,95 ; 1,94	0% (0/5)	< LQ	14% (1/7)	0,59	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
Penconazole	20% (1/5)	0,27	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	20% (1/5)	2,49	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
Prochloraze	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
Propiconazole	20% (1/5)	16,48	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
Tébuconazole	60% (3/5)	5,62 ± 6,68	40% (2/5)	0,89 ; 1,12	57% (4/7)	1,04 ± 0,43	100% (5/5)	3,54 ± 2,93	40% (2/5)	0,59 ; 0,69	100% (3/3)	0,88 ± 0,12
Tétraconazole	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
Triadiméfon	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
Triadiménol	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
Triticonazole	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ

F<sub>q</sub> : Fréquence de quantification, GA : Goélands Argentés, GB : Goélands Bruns, LQ : Limite de Quantification, M ± SD : Moyenne ± écart-type



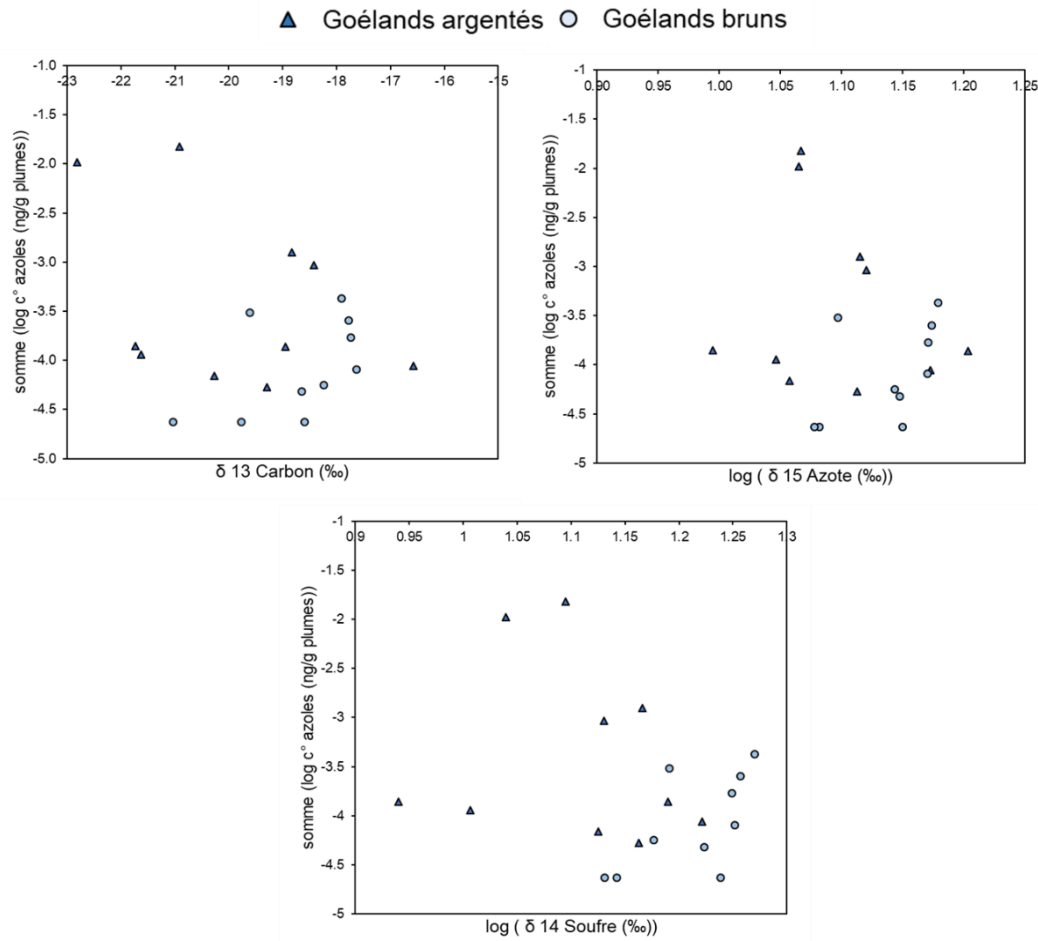


Figure 86 : Relation entre la somme des concentrations en azoles avec les taux isotopiques pour les deux espèces de goélands argentés et bruns en matrice plume, tests statistiques en Annexe 14 sous-partie a

#### iv. Comparaison entre espèces et avec la littérature

Les concentrations maximales des azoles sur toutes les espèces selon leur habitat sont compilées Figure 88. Les concentrations pour quasiment tous les azoles analysés sont largement maximales dans les plumes de merles noirs viticoles. Une unique concentration en bromuconazole a été quantifiée dans un échantillon de plume de cigogne blanches de l'estuaire de la Gironde tout comme le propiconazole chez un goéland brun. La concentration en imazalil et celle en prochloraze sont maximales chez l'espèce merle noire qui provient de l'habitat urbain. Le tébuconazole est quantifié chez toutes les espèces avec un bruit de fond résiduel. Cette contamination constante est identique dans les plumes de l'expérience d'exposition des moineaux. Le tébuconazole étant autorisé à être appliqué sur différents matériaux de construction, il potentiellement se retrouver partout.

Les espèces seront plus amplement comparées ci-dessous (cf page 348) à l'aide d'une analyse en composantes principales qui inclura également les résultats en néonicotinoïdes.

A titre de comparaison, les concentrations maximales en azoles recensées dans la littérature en matrice cheveu sont ajoutées à la Figure 88. Ces valeurs sont issues du Tableau 9 présent dans le chapitre 1 bibliographie. Les azoles n'ayant jamais été analysés dans la matrice plume pour l'instant, la comparaison ne peut en effet se faire qu'avec les concentrations en matrice cheveu. Cette matrice est semblable à celle des plumes de par sa composition en kératine. Une différence majeure entre ces deux matrices réside sur leur vitesse de pousse. Les cheveux ont une vitesse de pousse de 1 cm/mois en moyenne (Lehmann et al., 2018b). Les publications peuvent être comparées puisqu'il s'agit de la même portion des cheveux qui est prélevée à savoir la nouvellement formée proche du crâne. La concentration peut varier en fonction de la longueur des poils sélectionnée (Mercadante et al., 2012). Quant aux plumes, une fois formée entièrement, elles ne sont plus irriguées. Des mues entraînent la chute des plumes ce qui peut ensuite entraîner leur renouvellement. Les plumes intégreront donc la contamination au moment de leur croissance.

Les concentrations les plus élevées recensées en matrice cheveu sont obtenues pour l'époxiconazole avec 110 ng/g cheveux (Schummer et al., 2012) et le tébuconazole avec 245,2 ng/g cheveux (Mercadante et al., 2018). Les valeurs pour le penconazole et le tébuconazole pour deux publications (Polledri et al., 2019) (Mercadante et al., 2018) sont semblables puisqu'il s'agit des mêmes données utilisées.

Les molécules ayant des concentrations maximales en matrice plume sont les mêmes. En revanche, la concentration maximale quantifiée pour l'époxiconazole en matrice plume est bien supérieure à celle en matrice cheveu (Peng et al., 2020; Schummer et al., 2012) soit de 2017,63 ng/g plumes contre 110 ng/g cheveux. Il en est de même pour le difénoconazole (Peng et al., 2020; Polledri et al., 2020), le fenbuconazole, le myclobutanil, le tétraconazole (qui n'a pas été quantifié en matrice cheveu (Peng et al., 2020)), le prochloraze et le propiconazole. Des concentrations du même ordre de grandeur ont été obtenues pour le cyproconazole et le flusilazole. Dans la littérature, des concentrations plus élevées ont été recensées pour l'imazalil et le penconazole bien qu'ils soient du même ordre de grandeur. Le triadiménol a été quantifié dans une étude à une concentration maximale de 18,3 ng/g cheveux alors qu'il n'a pas été quantifié dans le cadre de notre étude. Le bitertanol n'a pas été quantifié dans la matrice cheveu (Peng et al., 2020) ni dans la matrice plume de notre étude mais a été détecté dans 24 % des échantillons de cheveux (Béranger et al., 2020).

D'un point de vue global, les concentrations obtenues dans le cadre de ces travaux de thèse se rapprochent, tout en étant largement supérieures, des concentrations obtenues dans la matrice cheveu des agriculteurs ou vigneron. Cette constatation est logique puisque les agriculteurs se rendent moins fréquemment sur site d'exploitation que les espèces animales y vivant. Dans la littérature, l'ordre décroissant des valeurs de concentrations selon l'habitat (concentration dans les cheveux provenant agriculture > rural > urbain) est respecté pour les cheveux (Polledri et al., 2020) et pour les plumes (notre étude).



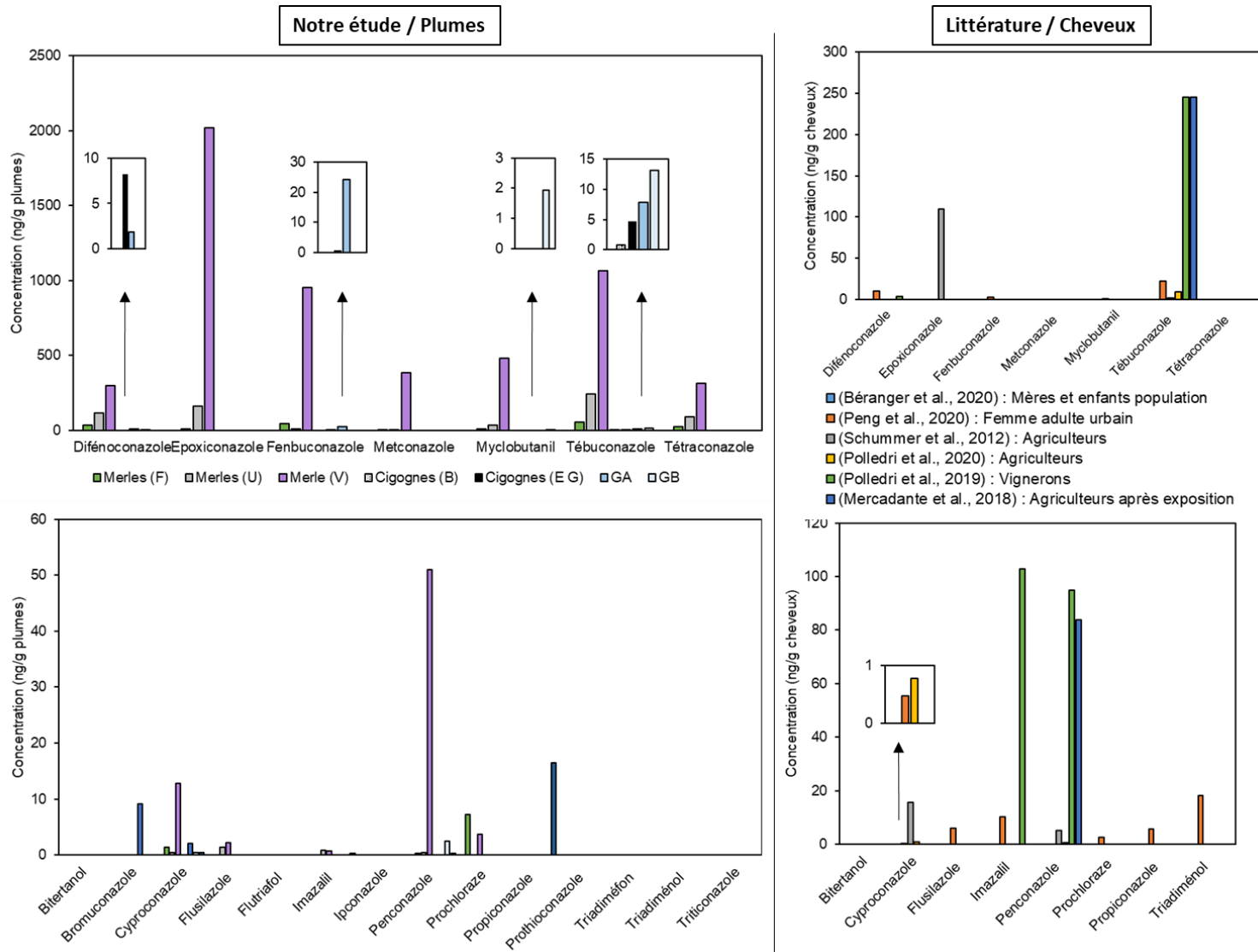


Figure 87 : Comparaison des concentrations maximales en matrice plume dans le cadre de notre étude avec celles en matrice cheveu dans la littérature pour les azoles

## b. Néonicotinoïdes et leurs métabolites

i. *Merles noirs*

Le Tableau 58 récapitule les fréquences de quantification, les moyennes et les écarts-types pour les néonicotinoïdes et leurs métabolites. L'acétamipride, la clothianidine, l'imidaclopride, le thiaclopride ainsi que le thiaméthoxame sont fréquemment quantifiés. Le flupyradifurone est quantifié dans deux uniques échantillons en 2016. En habitat forêt (et urbain pour 2016) en 2016 et 2017 certaines de ces molécules sont quantifiées alors qu'en 2019, les néonicotinoïdes le sont uniquement en site viticole. Sur ce même site, l'imidaclopride et le thiaméthoxame sont les deux molécules quantifiées aux plus fortes concentrations.

Les résultats des tests statistiques non-paramétriques Kruskal-Wallis sont montrés (sous forme \*) sur la Figure 89 et les résultats sont mentionnés dans l'Annexe 15. Les tests sont réalisés seulement sur les cinq molécules les plus fréquemment quantifiées (fréquences de quantification supérieures à 20 % sur au moins un site).

Ces tests permettent d'évaluer la différence entre les différents habitats sur les trois années (résultats présentés en sous-partie a de l'Annexe 15 Annexe 14 : Valeurs des p-value pour les corrélations entre concentrations dans les plumes de goélands et les valeurs isotopiques pour les azoles (a) et les néonicotinoïdes (b))

## a) Azoles

## b) Néonicotinoïdes

		Variance	
		Somme (log concentration néonicotinoïdes) = a x taux isotopiques	
		R <sup>2</sup>	P-value
GA (Goéland Argenté)	δ 13 C	0,156	0,258
	Log δ 15 N	0,009	0,933
	Log δ 14 S	0,006	0,948
GB (Goéland Brun)	δ 13 C	0,228	0,163
	Log δ 15 N	0,434	0,038
	Log δ 14 S	0,213	0,179

*Annexe 15*). Aucune différence significative n'est repérée pour ces cinq molécules entre les trois habitats de l'année 2016. Aucun test Post Hoc par paire n'a donc été ensuite réalisé.

Ces tests n'ont pu être réalisés sur l'année 2017 puisqu'un unique échantillon de forêt a été analysé. L'année 2019 n'est pas non plus concernée par ce test puisque la variance sur les échantillons forêt est nulle. En effet, aucune molécule n'a été quantifiée dans les plumes provenant de l'habitat forestier. La différence entre les deux habitats est bien significative si on prend en compte les fréquences de quantification pour cette année sans les données quantitatives puisque plusieurs molécules ont été quantifiées seulement dans les plumes de merles noirs provenant du site viticole.

Les résultats des tests statistiques sont à nuancer au vu du faible nombre de données disponibles pour cette espèce.

Chapitre 5 : Développements analytiques et applications en matrice plume

Tableau 58 : Fréquences de quantification et moyennes des concentrations pour les néonicotinoïdes et leurs métabolites quantifiés dans les plumes de merles noirs 2016, 2017 et 2019

Concentrations (ng/g plumes)	2016						2017				2019			
	Forêt		Urbain		Viticole		Forêt		Viticole		Forêt		Viticole	
	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD
Acétamipride	14% (1/7)	0,04	63% (5/8)	0,12 ± 0,12	41% (12/29)	10,25 ± 32,54	0% (0/1)	< LQ	17% (2/12)	0,05 ; 0,08	0% (0/3)	< LQ	31% (10/32)	0,58 ± 1,43
Clothianidine	14% (1/7)	2,68	13% (1/8)	0,82	45% (13/29)	5,42 ± 6,29	0% (0/1)	< LQ	92% (11/12)	2,16 ± 2,25	0% (0/3)	< LQ	34% (11/32)	4,30 ± 4,26
Cycloxapride	0% (0/7)	< LQ	0% (0/8)	< LQ	0% (0/29)	< LQ	0% (0/1)	< LQ	0% (0/12)	< LQ	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ
Dinotéfurane	0% (0/7)	< LQ	0% (0/8)	< LQ	0% (0/29)	< LQ	0% (0/1)	< LQ	0% (0/12)	< LQ	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ
Flupyradifurone	0% (0/7)	< LQ	13% (1/8)	2,32	3% (1/29)	2,72	0% (0/1)	< LQ	0% (0/12)	< LQ	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ
N Imidaclopride	100% (7/7)	3,10 ± 4,34	100% (8/8)	2,13 ± 1,59	97% (28/29)	7,63 ± 15,79	100% (1/1)	1,76	83% (10/12)	2,78 ± 2,81	0% (0/3)	< LQ	72% (23/32)	6,58 ± 20,86
Nitenpyrame	0% (0/7)	< LQ	0% (0/8)	< LQ	0% (0/29)	< LQ	0% (0/1)	< LQ	0% (0/12)	< LQ	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ
Sulfoxaflor	0% (0/7)	< LQ	0% (0/8)	< LQ	0% (0/29)	< LQ	0% (0/1)	< LQ	0% (0/12)	< LQ	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ
Thiaclopride	57% (4/7)	0,27 ± 0,08	88% (7/8)	0,56 ± 0,44	76% (22/29)	1,59 ± 3,72	100% (1/1)	0,13	58% (7/12)	0,75 ± 0,90	0% (0/3)	< LQ	56% (18/32)	0,21 ± 0,16
Thiaméthoxame	43% (3/7)	5,27 ± 8,89	38% (3/8)	0,75 ± 0,82	52% (15/29)	13,61 ± 22,81	0% (0/1)	< LQ	100% (12/12)	16,68 ± 13,89	0% (0/3)	< LQ	53% (17/32)	1,45 ± 2,06
6-chloronicotinique acide	0% (0/7)	< LQ	0% (0/8)	< LQ	0% (0/29)	< LQ	0% (0/1)	< LQ	0% (0/12)	< LQ	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ
Acétamipride N desmethyl	0% (0/7)	< LQ	13% (1/8)	0,26	3% (1/29)	24,38	0% (0/1)	< LQ	0% (0/12)	< LQ	0% (0/3)	< LQ	9% (3/32)	0,97 ± 0,43
Clothianidine urée	0% (0/7)	< LQ	0% (0/8)	< LQ	0% (0/29)	< LQ	0% (0/1)	< LQ	0% (0/12)	< LQ	0% (0/3)	< LQ	3% (1/32)	2,98
M Imidaclopride guanidine	100% (7/7)	1,2 ± 1,27	100% (8/8)	0,72 ± 0,30	100% (29/29)	1,50 ± 2,04	100% (1/1)	0,32	100% (12/12)	1,82 ± 2,27	0% (0/3)	< LQ	91% (29/32)	1,20 ± 2,44
Imidaclopride oléfine	0% (0/7)	< LQ	0% (0/8)	< LQ	3% (1/29)	25,58	0% (0/1)	< LQ	0% (0/12)	< LQ	0% (0/3)	< LQ	3% (1/32)	13,43
Imidaclopride urée	0% (0/7)	< LQ	0% (0/8)	< LQ	0% (0/29)	< LQ	0% (0/1)	< LQ	0% (0/12)	< LQ	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ
Thiaclopride amide	0% (0/7)	< LQ	0% (0/8)	< LQ	7% (2/29)	0,99 ; 1,14	0% (0/1)	< LQ	8% (1/12)	0,50	0% (0/3)	< LQ	0% (0/32)	< LQ

F<sub>q</sub> : Fréquence de quantification, LQ : Limite de Quantification, M ± SD : Moyenne ± écart-type, M : Métabolites des néonicotinoïdes, N : Néonicotinoïdes

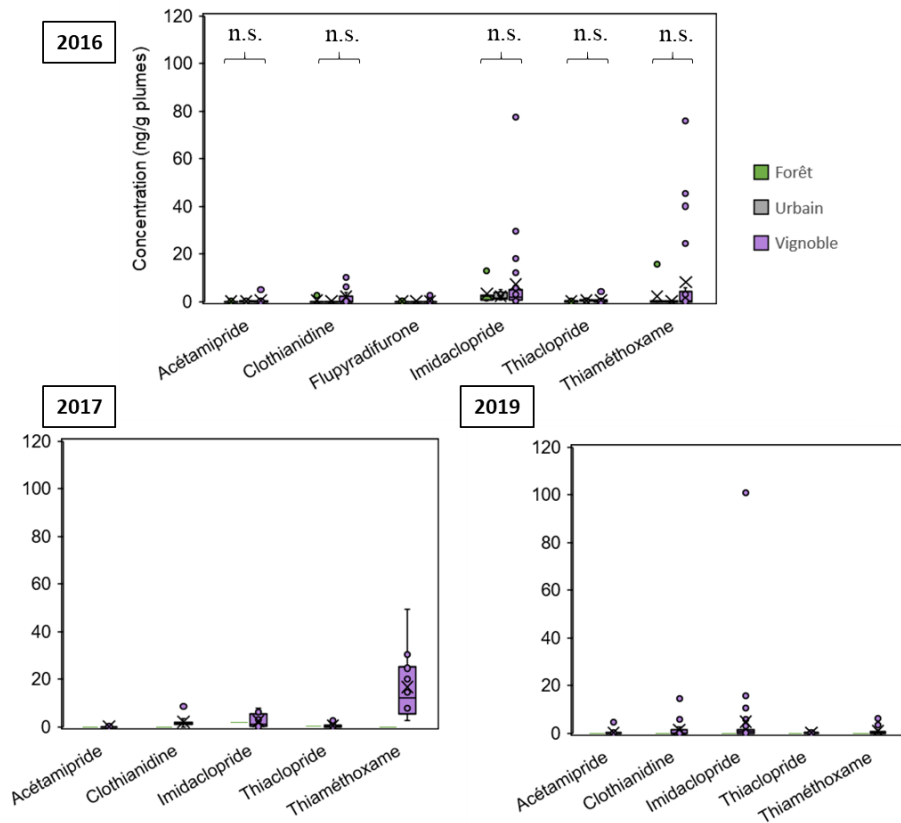


Figure 88 : Boîtes à moustaches représentant les néonicotinoïdes quantifiés dans les plumes de merles noirs pour les trois habitats et pour les trois années accompagnées du test statistique Kruskal-Wallis (\* indique p-value < 5 %, \*\* < 1 %, \*\*\* < 0,1 %, n.s. : non significatif)

La saisonnalité des données de capture avec séparation des individus selon leur âge est mentionnée sur la Figure 90. Les concentrations sont plus faibles pour les juvéniles et plus élevées chez les individus adultes pour l'acétamipride et le thiaclopride. Comme expliqué dans la partie azoles, les plumes des adultes se sont formées l'année précédente. Les concentrations dans ces individus ne témoignent donc pas de la contamination de la période de capture. De plus fortes concentrations chez les juvéniles ont été obtenues pour les trois autres molécules imidaclopride, thiaméthoxame et clothianidine. L'augmentation des concentrations au cours de la saison est observée chez les individus juvéniles pour les trois molécules : clothianidine, imidaclopride et thiaméthoxame.

Les concentrations en mousses PUF sont comparées avec celles obtenues chez les individus juvéniles. Les concentrations relevées dans l'air ne se superposent pas avec celles relevées dans les plumes juvéniles pour l'acétamipride, l'imidaclopride, la clothianidine et le thiaclopride. La clothianidine n'a pas été quantifiée dans les échantillons de mousses PUF et n'est pas une molécule vendue dans les départements étudiés. Sa provenance est donc autre qu'agricole. Elle pourrait éventuellement provenir de la métabolisation du thiaméthoxame (Nauen et al., 2003). Cette hypothèse sera explicitée ultérieurement dans la partie concernant les métabolites. L'imidaclopride non plus n'a pas été quantifié dans les échantillonneurs passifs atmosphériques alors que des concentrations élevées sont observées dans les plumes juvéniles. La saisonnalité concorde entre les données mousses PUF et plumes pour le thiaclopride et le thiaméthoxame. Les concentrations élevées dans l'air pour le thiaméthoxame sont en adéquation avec les concentrations élevées en plumes viticoles.

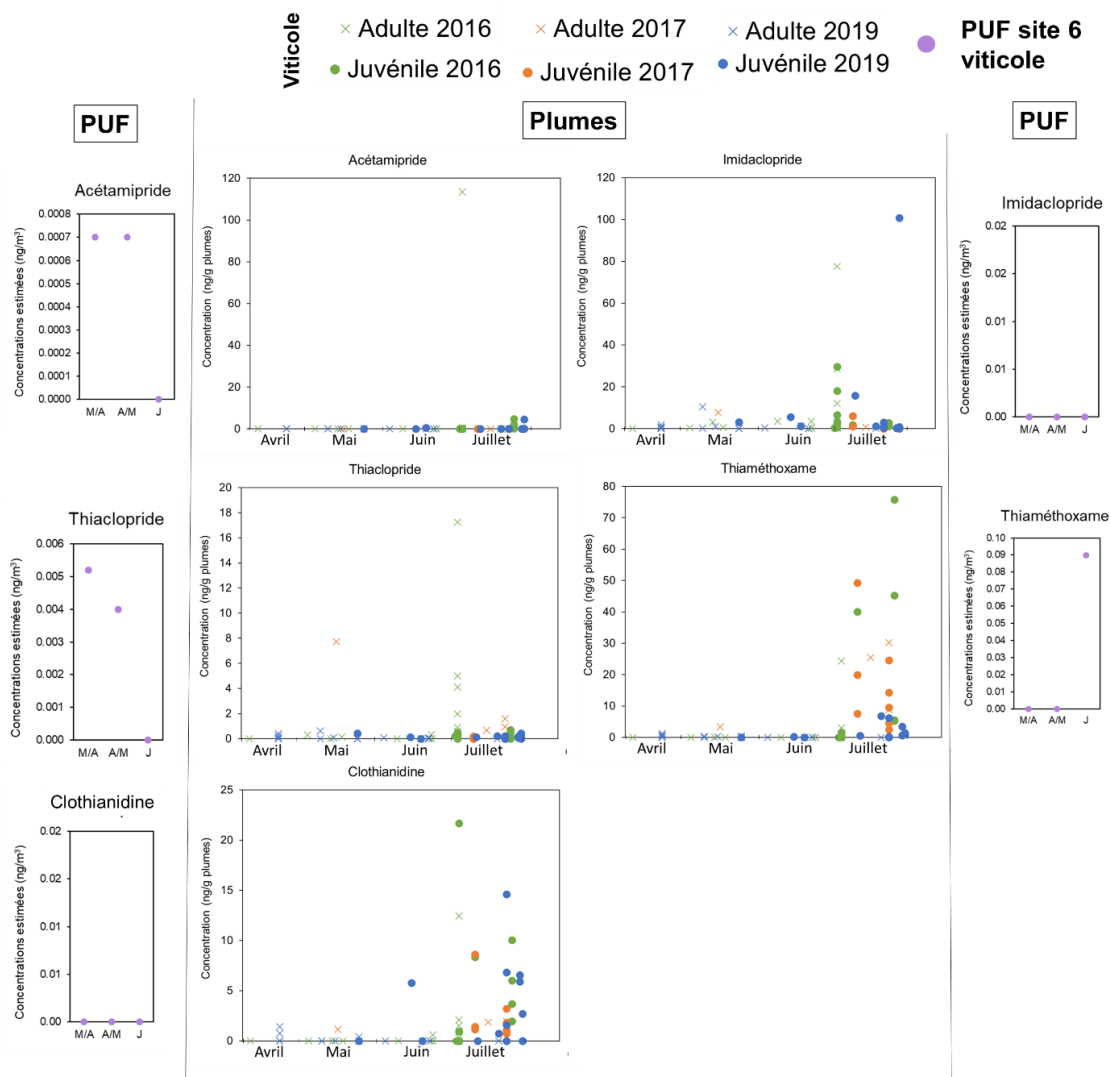


Figure 89 : Concentrations plumes et mousses PUF pour 5 néonicotinoïdes reliées à la date de capture du merle noir en site n°6 viticole

Sachant que les néonicotinoïdes ont connu une restriction d'usage en septembre 2018, une différence peut éventuellement être attendue entre les années d'échantillonnage. Les concentrations maximales sont obtenues pour toutes les molécules en 2016 excepté pour l'imidaclopride chez un juvénile de l'année 2019. Un abaissement des concentrations est donc visible pour l'acétamipride, le thiachlopride et le thiaméthoxame.

Afin de comparer les années entre elles d'un point de vue statistique, uniquement les individus juvéniles capturés entre les mois de juin et juillet ont été sélectionnés pour réaliser le test statistique de Mann-Whitney. L'année 2017 ne peut être comparée avec les deux autres années 2016 et 2019 puisque les LQ validées en néonicotinoïdes sont différentes. En effet, ces échantillons n'ont pas été analysés avec la méthode 5N qui a permis des LQ plus faibles. Les résultats de ces tests statistiques entre l'année 2016 et 2019 pour les cinq molécules sont donnés en sous-partie b de l'Annexe 15.

Aucune différence significative n'a été observée entre ces années et pour les cinq molécules. L'impact de cette interdiction ne s'est pas encore fait ressentir significativement sur les concentrations dans les plumes mais peut être attendu avec un nombre plus élevé de données. Les molécules peuvent encore être présentes dans l'environnement comme ceci a été démontré dans le chapitre sur le plasma.

### ii. Cigognes blanches

Le Tableau 59 centralise les résultats pour les deux habitats des cigognes blanches capturées en 2019. Plus de molécules différentes et avec des fréquences plus élevées ont été quantifiées en site marais Brouage. La clothianidine, le flupyradifurone, l'imidaclopride et le thiaclopride ont été quantifiés dans les plumes provenant de ce site. En site estuaire de la Gironde les mêmes molécules ont été quantifiées excepté le thiaclopride. En revanche, tous les résultats sont à nuancer puisque les fréquences de quantification sont faibles et n'excèdent pas les 20 %. De plus, aucun métabolite des néonicotinoïdes n'a de donnée supérieure à la LQ. Pour conclure, l'analyse des néonicotinoïdes en matrice plume ne permet pas de différencier significativement les deux sites de capture des cigognes blanches. Les plumes de cigognes blanches juvéniles ne sont pas forcément des bons marqueurs de la contamination en néonicotinoïdes sur cette échelle locale lorsqu'elles sont prélevées sur le mois de mai.

Tableau 59 : Fréquence de quantification et moyenne des concentrations pour les néonicotinoïdes et leurs métabolites quantifiés dans les plumes de cigognes blanches 2019

Concentrations (ng/g plumes)		2019			
		Brouage		Estuaire de la Gironde	
		F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD
N	Acétamipride	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
	Clothianidine	10% (1/10)	1,18	10% (1/10)	2,01
	Cycloxapride	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
	Dinotéfurane	20% (2/10)	5,55 ; 8,65	0% (0/10)	< LQ
	Flupyradifurone	10% (1/10)	39,17	10% (1/10)	48,63
	Imidaclopride	10% (1/10)	0,39	10% (1/10)	0,58
	Nitenpyrame	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
	Sulfoxaflor	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
	Thiaclopride	10% (1/10)	0,03	0% (0/10)	< LQ
	Thiaméthoxame	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
M	6-chloronicotinique acide	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
	Acétamipride N desmethyl	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
	Clothianidine urée	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
	Imidaclopride guanidine	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
	Imidaclopride oléfine	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
	Imidaclopride urée	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ
	Thiaclopride amide	0% (0/10)	< LQ	0% (0/10)	< LQ

F<sub>q</sub> : Fréquence de quantification, LQ : Limite de Quantification, M ± SD : Moyenne ± écart-type, M : Métabolites des néonicotinoïdes, N : Néonicotinoïdes

### iii. Goélands

Pour les échantillons de plumes de goélands, le cycloxapride, le dinotéfurane, le flupyradifurone, le nitenpyrame, le sulfoxaflor et le thiaméthoxame ne sont pas quantifiés en tant que composés parents (Tableau 60). Quatre néonicotinoïdes sont en revanche quantifiés dans cette matrice à savoir l'acétamipride, la clothianidine, l'imidaclopride et le thiaclopride. Quant aux métabolites, seuls l'acétamipride N desmethyl et l'imidaclopride guanidine sont quantifiés.

Tableau 60 : Fréquence de quantification et moyenne des concentrations pour les néonicotinoïdes et leurs métabolites quantifiés dans les plumes de goélands bruns et argentés

Concentrations (ng/g plumes)	Goélands bruns (GB)						Goélands argentés (GA)						
	2016		2019		2020		2016		2019		2020		
	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	F <sub>q</sub>	M ± SD	
N	Acétamipride	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	14% (1/7)	1,11	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
	Clothianidine	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	14% (1/7)	0,76	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
	Cyclozapride	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
	Dinotéfurane	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
	Flupyradifurone	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
	Imidaclopride	40% (2/5)	0,10 ; 0,42	40% (2/5)	0,68 ; 3,55	57% (4/7)	1,48 ± 1,46	60% (3/5)	3,91 ± 4,11	40% (2/5)	0,20 ; 1,17	100% (3/3)	0,45 ± 0,41
	Nitenpyrame	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
	Sulfoxaflor	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
	Thiaclopride	40% (2/5)	0,02 ; 0,06	40% (2/5)	0,53 ; 1,75	57% (4/7)	0,25 ± 0,20	60% (3/5)	0,31 ± 0,30	60% (3/5)	0,23 ± 0,27	33% (1/3)	0,04
	Thiaméthoxame	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
M	6-chloronicotinique acide	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
	Acétamipride N desmethyl	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	14% (1/7)	0,14	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
	Clothianidine urée	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
	Imidaclopride guanidine	0% (0/5)	< LQ	40% (2/5)	0,14 ; 0,68	43% (3/7)	0,31 ± 0,28	40% (2/5)	0,50 ; 1,23	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
	Imidaclopride oléfine	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
	Imidaclopride urée	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ
	Thiaclopride amide	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/7)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/5)	< LQ	0% (0/3)	< LQ

F<sub>q</sub> : Fréquence de quantification, GA : Goélands Argentés, GB : Goélands Bruns, LQ : Limite de Quantification, M ± SD : moyenne ± écart-type, M : Métabolites des néonicotinoïdes, N : Néonicotinoïdes



Les concentrations cumulées pour ces composés parents et leurs métabolites sont illustrées Figure 91. La somme n'excède pas les 10 ng/g plumes. L'imidaclopride est le composé quantifié le plus souvent et avec les plus fortes concentrations. Le thiaclopride est également quantifié souvent mais avec de plus faibles concentrations. L'acétamipride et la clothianidine n'ont été quantifiés que dans un seul échantillon. Si on compare les années de prélèvement, aucune tendance temporelle ne semble être visible puisque ces molécules sont retrouvées dans toutes les années et dans les deux espèces. La concentration maximale en imidaclopride a été quantifiée dans les plumes d'un individu de goéland argenté échantillonné en 2016. Après cette date, les concentrations en imidaclopride semblent décroître. Les restrictions d'usages des néonicotinoïdes depuis septembre 2018 ne se sont pas répercutées de façon significative sur un abaissement des concentrations retrouvées dans les plumes.

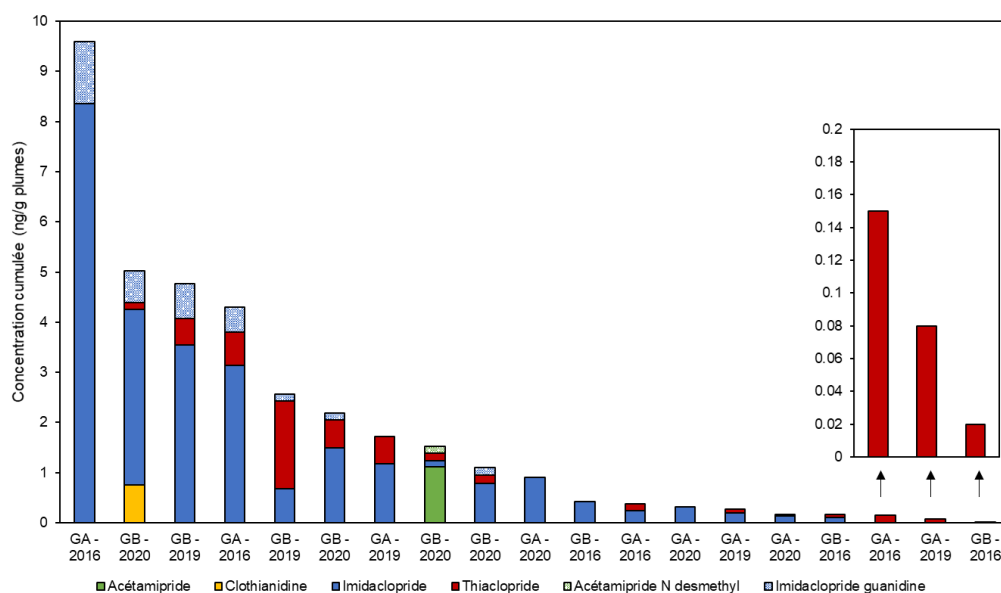


Figure 90 : Concentration cumulée en néonicotinoïdes et leurs métabolites par individus des deux espèces de goélands argentés (GA) et bruns (GB) ordonnée de façon décroissante

Les métabolites sont quantifiés lorsque leur molécule parent l'est. Ceci est le cas pour l'imidaclopride guanidine et l'acétamipride N desmethyl. Cette relation sera plus amplement étudiée dans la partie suivante.

La corrélation entre les taux isotopiques est observée pour ces concentrations pour les deux espèces goélands argentés et goélands bruns capturés en 2016 et en 2019 (Figure 92). Les résultats des variances et des p-value sont exprimés en Annexe 14 sous-partie b. Une seule droite a une variance  $R^2$  significative avec une pente de 0,4341 et une p-value de 3,8 %, il s'agit de la somme des concentrations en néonicotinoïdes chez le goéland brun en fonction de l'isotope 15 de l'azote. Plus la somme des concentrations en néonicotinoïdes est élevée plus ce taux est faible. Les goélands bruns utilisant d'avantage les milieux terrestres qui sont d'avantage contaminés. C'est d'ailleurs sur ces zones terrestres qu'ils pourront être en contact de ces pesticides. Cette tendance n'a pas été vérifiée pour l'espèce goéland argenté qui est assez logique puisque cette espèce est plus marine que les goélands bruns.

Pour conclure, la matrice plume peut être un marqueur de l'habitat terrestre des goélands bruns grâce à l'isotope de l'azote et montre une exposition aux néonicotinoïdes. Sachant que ces plumes de goélands proviennent d'individus adultes, les concentrations doivent témoigner de la contamination des mois d'août/septembre de l'année précédente. Par ailleurs, les goélands bruns nicheurs de la réserve du Lilleau des Niges, sur l'Île de Ré sont migrateurs et gagnent en hiver les côtes du Portugal, du sud de l'Espagne et du Maroc (données de suivis GPS par la LPO et le CEBC). La contamination des adultes pourrait être également réalisée pendant l'hiver, hors de la région Nouvelle-Aquitaine.

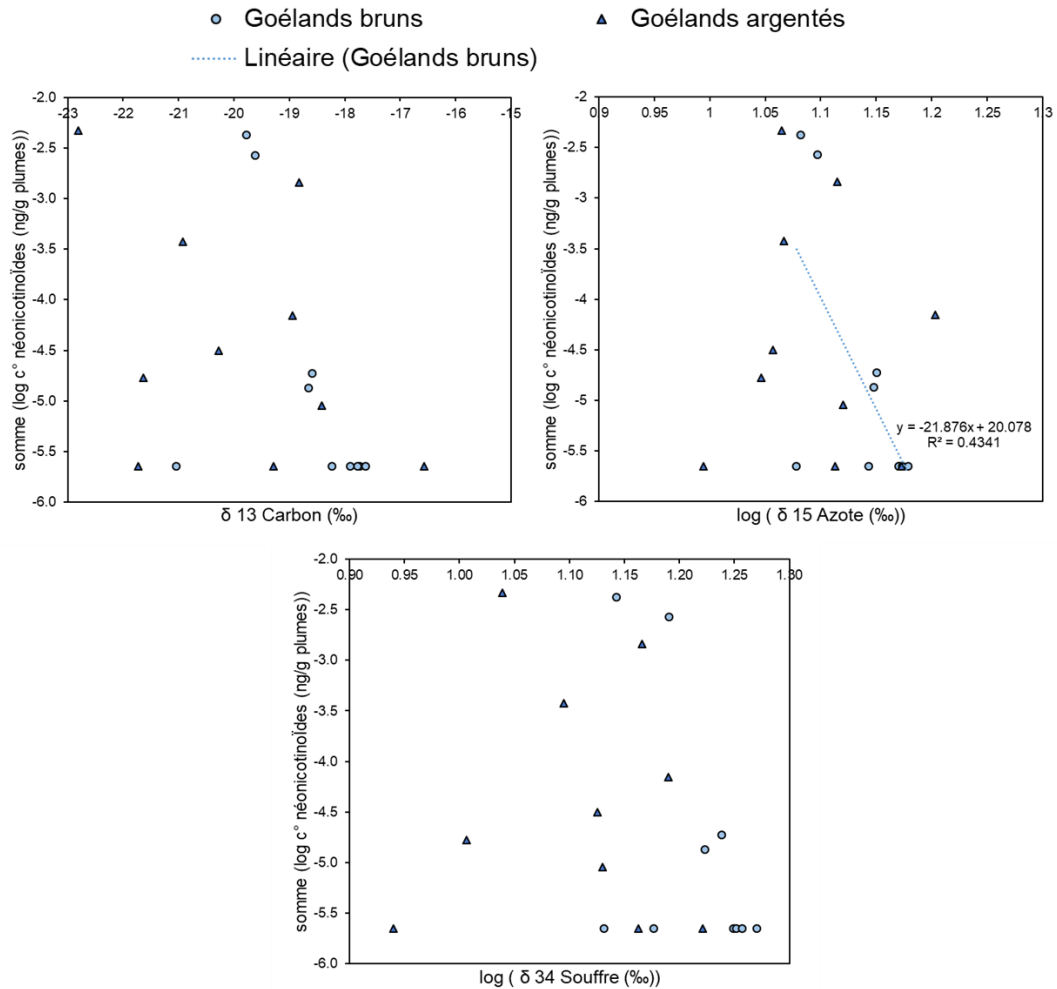


Figure 91 : Relation entre la somme des concentrations en néonicotinoïdes avec les taux isotopiques pour les deux espèces de goélands argentés et bruns en matrice plume, tests statistiques en Annexe 14 sous-partie b

*iv. Corrélation entre les composés parents et leurs métabolites*

Dans cette partie la corrélation entre la concentration en métabolites par rapport à leur composé parent est étudiée. La corrélation avec les métabolites suivant ne peut être réalisée puisqu'aucun n'a été quantifié en matrice plume : le 6-chloro nicotinique acide et l'imidaclopride urée. L'imidaclopride urée a pourtant été quantifié dans un échantillon de miel dans la littérature (Gbylik-Sikorska et al., 2015). Seulement une valeur en clothianidine urée a été quantifiée (2,98 pour 1,59 ng/g plumes en clothianidine) dans une plume de merle noir.

Deux valeurs ont été quantifiées pour l'imidaclopride oléfine chez le merle noir également avec comme concentrations respectives pour le métabolite et la molécule parent (l'imidaclopride) de 25,58/29,62 ng/g plumes et 13,43/15,79 ng/g plumes. Le rapport parent/métabolite est équivalent pour ces deux valeurs soit de 1,16 et 1,18 respectivement. Le rapport dans la littérature est dans le même ordre de grandeur dans différents organes d'oiseaux en variant de 0,19 à 3,40 (Roy et al., 2020). L'accumulation dans les plumes n'a pas été étudiée dans cette publication. Il est également proche en matrice plante et substrat de sol avec une valeur de 1,13 (Seifrtova et al., 2017). Aucune corrélation ne pourra être réalisée pour la clothianidine urée et l'imidaclopride oléfine.

L'acétamipride N desmethyl a été quantifié dans 6 échantillons (5 merles noirs et 1 goéland) et le thiaclopride amide dans 3 échantillons de plumes de merle noir.

Les graphiques mentionnés Figure 93 tracent les concentrations en métabolites en fonction de celles en composés parents.

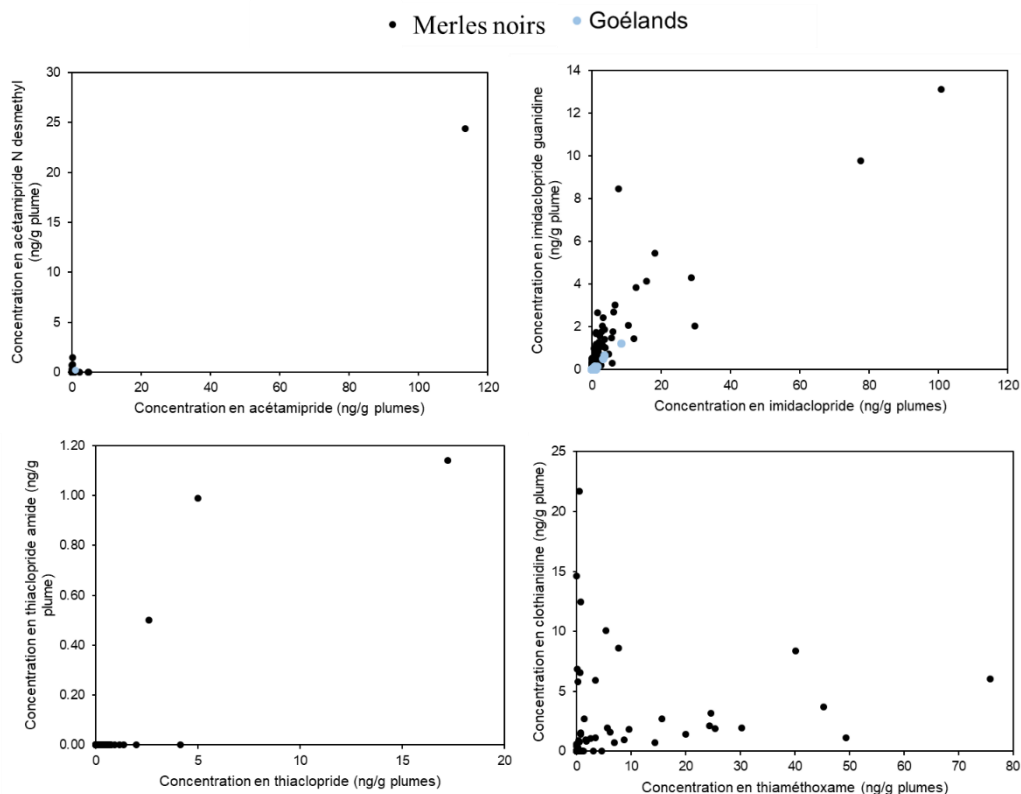


Figure 92 : Corrélation entre les métabolites quantifiés en matrice plume par rapport à leur molécule parent

Trois molécules sont concernées : les deux précédemment mentionnées ainsi que l'imidaclopride guanidine qui a été quantifié dans 93,5 % des échantillons de plumes de merles noirs (86/92) ainsi que dans 7 plumes de goélands. Pour justifier la présence de la clothianidine alors qu'il n'est pas appliquée, elle sera intégrée au graphique en tant que métabolite du thiaméthoxame (Nauen et al., 2003). Pour cette molécule, seuls les échantillons de plumes de merle noir ont été étudiés puisque le thiaméthoxame n'a pas été quantifié dans les plumes des cigognes blanches ni celles des goélands.

Les concentrations maximales en parent et métabolite sont corrélées pour l'acétamipride N desmethyl, le thiaclopride amide et l'imidaclopride guanidine. La comparaison du rapport des concentrations parent/métabolite ne peut être réalisée pour l'acétamipride N desmethyl. Une publication mentionne la quantification de l'acétamipride dans 5 échantillons de miel et dans 2 pour l'acétamipride N desmethyl mais la corrélation pour les échantillons en commun n'est pas explicitée (Hou et al., 2019).

L'imidaclopride guanidine paraît être un métabolite pertinent de l'imidaclopride à suivre dans cette matrice. En traçant une courbe de tendance de type  $ax + b$  pour les deux espèces réunies, un coefficient de corrélation de 0,7503 est obtenu. Pour le thiaclopride il est difficile de conclure sur une tendance. Le composé parent est souvent quantifié sans que le métabolite ne le soit. Deux tendances peuvent être observées pour la clothianidine. Une première où les concentrations semblent reliées à celles en thiaméthoxame. Et une deuxième où elles ne semblent pas corrélées en obtenant des concentrations élevées en clothianidine alors que celles en thiaméthoxame sont faibles. La clothianidine ne proviendrait pas uniquement de la transformation du thiaméthoxame. Il pourrait, soit être le métabolite d'une autre molécule ou alors il pourrait être fabriqué par métabolisation du thiaméthoxame dans l'environnement (par exemple chez les plantes ou par les micro-organismes du sol) et non directement dans l'organisme. Pour évaluer les autres possibilités, la formule chimique de la clothianidine est mise en parallèle avec celle des autres néonicotinoïdes vendus en région Nouvelle-Aquitaine (Figure 94) issue du Tableau 14 du chapitre 2 matériel et méthodes. La clothianidine est formée d'un cycle à 5 atomes incluant un atome d'azote et de soufre et sur ce cycle est fixé un atome de chlore. Cette configuration est uniquement présente chez le thiaméthoxame, et le reste de la formule chimique ressemble à celle de la clothianidine, c'est pourquoi il s'agit de la principale molécule suspectée pour se métaboliser en clothianidine.

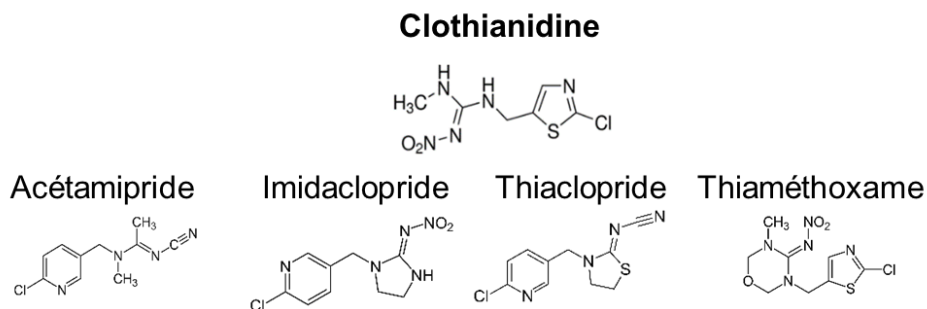


Figure 93 : Formule chimique des 5 néonicotinoïdes vendus en région Nouvelle-Aquitaine

v. *Comparaison entre espèces et avec la littérature*

Dans un premier temps, les concentrations maximales recensées dans nos travaux de thèse sont comparés (Figure 95). Ils sont ensuite comparés à ceux mentionnés dans la littérature.

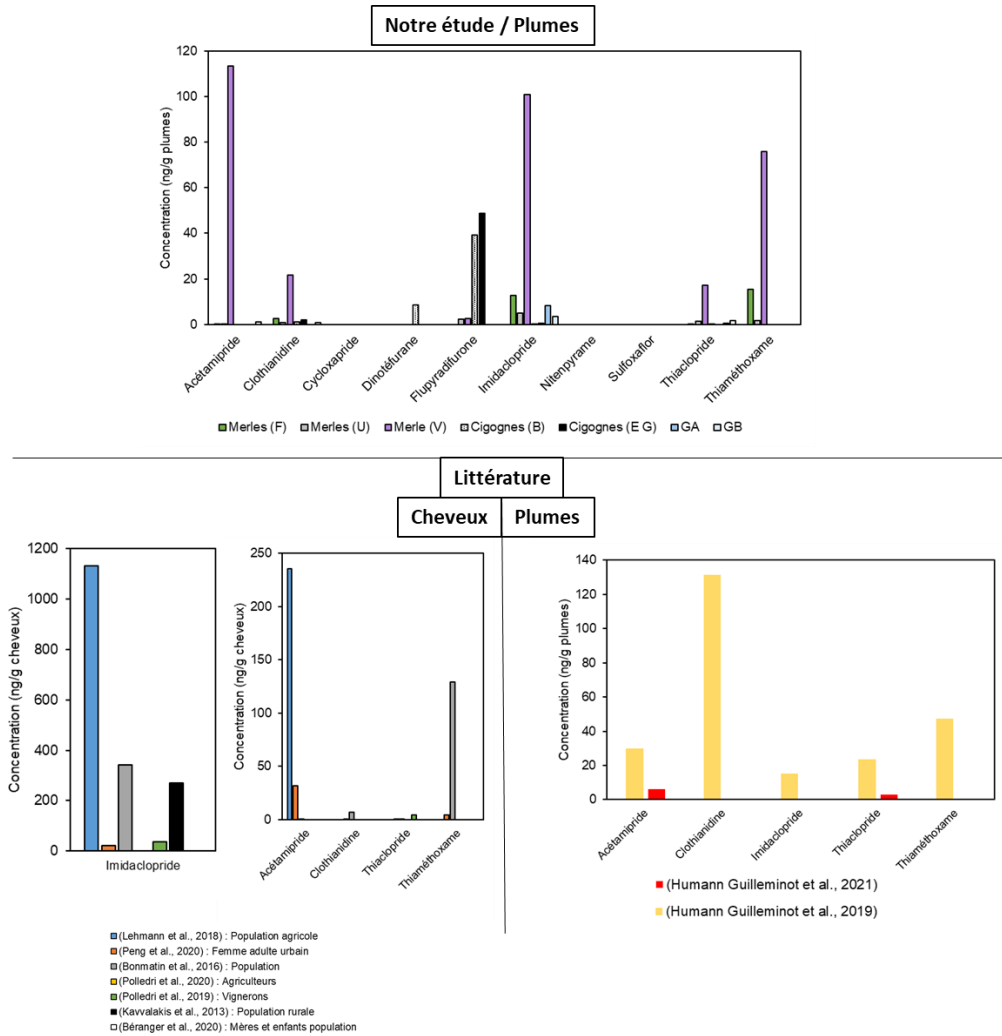


Figure 94 : Comparaison des concentrations maximales en matrice plume dans le cadre de notre étude avec celles en matrices cheveu et plume dans la littérature pour les néonicotinoïdes

Des concentrations maximales sont obtenues pour tous les néonicotinoïdes quantifiés en matrice plume de merle noir provenant du site viticole excepté pour le flupyradifurone et le dinotéfurane qui sont obtenues chez la cigogne blanche. Les concentrations maximales référencées dans la littérature en matrice cheveu sont ajoutées à la figure. De plus, deux publications d'un même auteur mentionnant l'analyse des néonicotinoïdes dans la matrice plume figurent sur le graphique (Humann-Guilleminot et al., 2021, 2019). Une autre publication mentionne l'analyse des plumes associées à la carcasse (Graves et al., 2019). Or celle-ci réalise une analyse qualitative avec uniquement des fréquences évoquées sans valeur de concentration. Aucun n'a analysé les métabolites dans ces deux matrices plumes et cheveux c'est pourquoi les résultats ne peuvent être comparés et n'apparaissent pas sur la figure. Les métabolites ont essentiellement été recherchés dans la matrice miel jusque-là (Codling et al., 2016; Gbylik-Sikorska et al., 2015; Hou et al., 2019; Jones et Turnbull, 2016; Rolke et al., 2016).

Les concentrations maximales en matrice cheveu sont supérieures à celles obtenues en matrice plume pour l'imidaclopride, l'acétamipride et le thiaméthoxame. Par contre, les concentrations obtenues dans le cadre de notre étude sont supérieures à celles référencées dans la littérature en matrice plume pour l'acétamipride, l'imidaclopride et le thiaméthoxame (Humann-Guillemot et al., 2021, 2019). L'inverse est obtenu pour la clothianidine et des ordres de grandeur équivalents sont observés pour le thiaclopride. Aucune publication ne mentionne l'analyse du cycloxypride dans ces matrices. Le nitenpyrame et le sulfoxaflor n'ont pas été détectés et le dinotéfurane ne l'a été que dans quelques échantillons (4,7 %), comme dans notre cas, dans la publication ayant une approche qualitative (Graves et al., 2019).

### c. Corrélation entre les azoles et néonicotinoïdes

Tous les individus sont comparés selon leurs concentrations en azoles et néonicotinoïdes sans inclure les métabolites. Les molécules non quantifiées dans toutes les espèces n'ont pas été conservées à savoir : le bitertanol, le flutriafol, l'ipconazole, le triadiméfon, le triadiménol, le triticonazole, le cycloxypride, le nitenpyrame et le sulfoxaflor. Pour les molécules restantes, lorsque leur concentration est inférieure à la LQ, elle est remplacée par la moitié de sa LQ. Le logarithme de toutes les valeurs est utilisé. Comme certaines concentrations sont comprises entre 0 et 1, des valeurs négatives peuvent être obtenues. Ensuite, pour chaque molécule, les valeurs sont centrées et réduites. L'analyse en composantes principales (ACP) est alors réalisée (Figure 96).

L'axe 1 explique 31,97 % de la variation avec la plupart des molécules qui dirigent cet axe. La contribution est apportée par de nombreuses molécules appliquées en grandes cultures. Certaines molécules sont orientées négativement le long de cet axe. Une séparation distincte selon l'application des molécules est observée selon cet axe où la contribution est maximale pour les molécules autorisées à être appliquées sur les vignes. La distinction est réalisée en fonction de leur application et non de la famille azole ou néonicotinoïde. L'ordre de contribution décroissante pour ces molécules viticoles est le suivant : le fenbuconazole, le tétraconazole, le difénoconazole, le tébuconazole, le thiaméthoxame, le myclobutanil et penconazole. Cet ordre ne coïncide pas avec les quantités vendues pour ces molécules. D'autres facteurs tels que les propriétés physico-chimiques des molécules doivent intervenir. La contribution positive est apportée par la majorité des merles noirs viticoles, un forestier et un urbain. Les échantillons de cigognes blanches et goélands se situent du côté négatif de cet axe. Les deux échantillons de cigognes blanches ayant une concentration maximale en flupyradifurone et l'autre en dinotéfurane sont visibles sur cette portion de l'axe.

L'axe 2 explique seulement 9,53 % de la variation. Selon cet axe toutes les contributions sont positives sauf pour trois molécules : le difénoconazole, le propiconazole et le penconazole. Aucune conclusion sur l'organisation des molécules ou des individus selon cet axe ne peut être tirée. Les échantillons de merle peuvent aussi bien être situés du côté positif que négatif tout comme les cigognes blanches. Les individus de goélands bruns sont très proches du centre de cette ACP.

Pour conclure, cette représentation illustre une projection des individus plus dispersée pour les individus merles viticoles qui est dirigée essentiellement par les azoles autorisés à être appliqués sur site viticole. Cette conclusion est logique et est à nuancer. En effet, le résultat présente un biais puisque les espèces capturées ne sont pas présentes dans tous les habitats. La comparaison entre espèces inclut également leur type d'habitat.

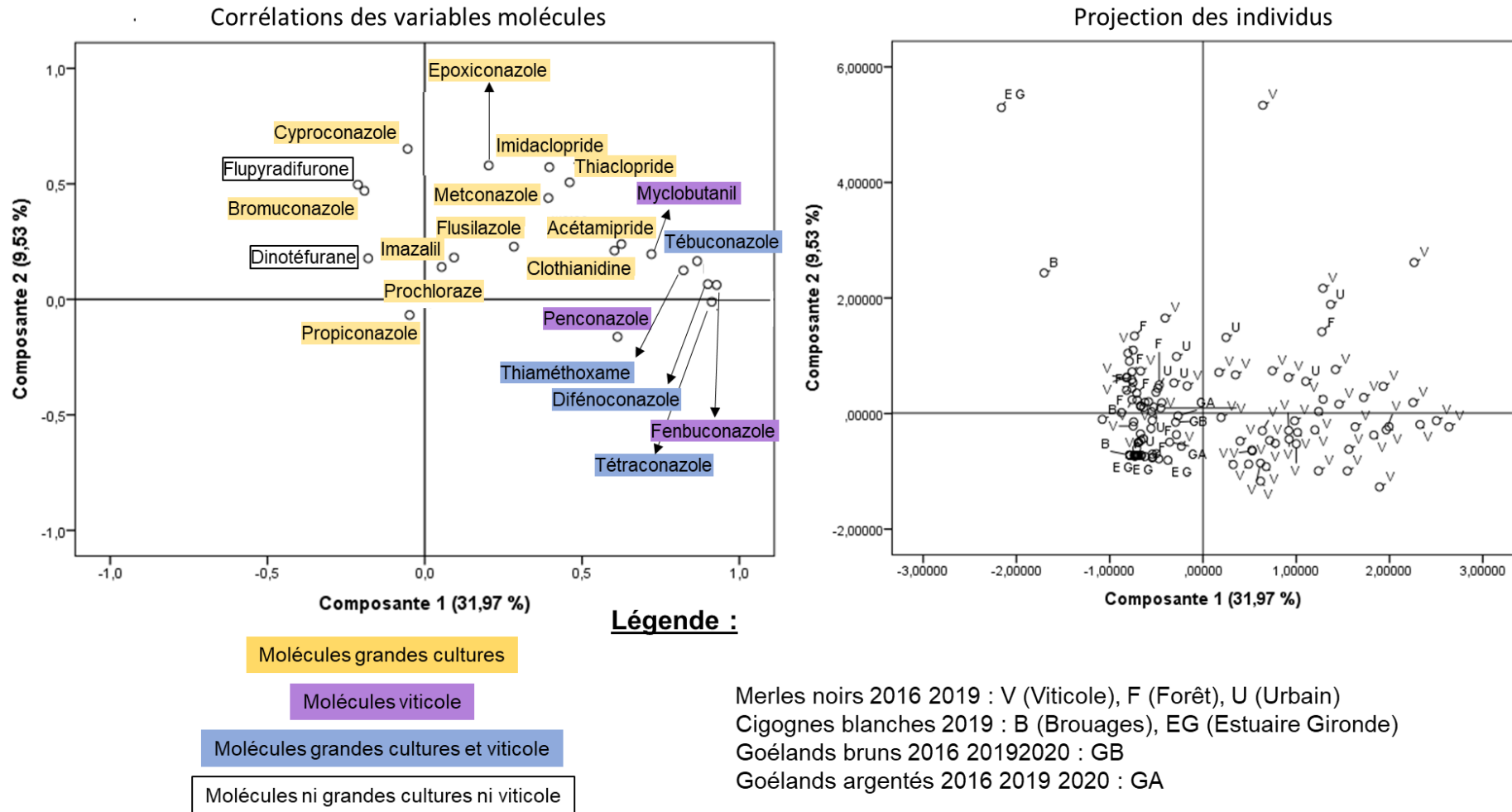


Figure 95 : Analyse en composantes principales sur les azoles et néonicotinoïdes quantifiés en matrice plume de trois espèces d'oiseaux

#### d. Corrélation avec la matrice plasma

Les polluants peuvent entrer au sein de la plume uniquement via le sang durant leur période de pousse. Les plumes sont de bons indicateurs de la pollution pour les POP (polluants organiques persistants) et certains métaux mais il ne faut pas généraliser à toutes les familles de molécules (Jaspers et al., 2019). La corrélation entre les concentrations dans le sang et celles dans les plumes a été mise en évidence pour la somme de chacune des familles PCB, le dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE) et les PBDE avec des coefficients de corrélations supérieurs à 0,775 (Eulaers et al., 2011).

##### i. Azoles

Le plasma des individus dont les plumes ont été sélectionnées ont également été analysé afin d'étudier la corrélation entre les deux matrices (excepté pour les merles noirs 2017 et les goélands). Il a fallu réaliser des choix ne pouvant analyser tous les échantillons. La préparation de l'échantillon plume et son extraction sont plus longues à réaliser que l'analyse du plasma d'où un nombre d'échantillons restreints.

La corrélation n'a pas pu être réalisée pour les concentrations en azoles entre le plasma de mésanges charbonnières et leur plume. La quantité de matière disponible en plumes pour cette espèce est bien trop faible et non compatible avec la technique de broyage employée. Ces plumes pourraient potentiellement être analysées après un simple pré-découpage de la matrice directement dans le matras micro-ondes. Des tests devront être menés au préalable, par exemple avec des échantillons contaminés, pour comparer les techniques de broyage et de pré-découpage. Par manque de temps et par choix, ces tests et ces analyses des plumes de mésanges charbonnières n'ont pas été réalisés.

L'étude de corrélation est réalisée sur les 4 molécules d'intérêt sélectionnées en matrice plume et plasma. Cela concerne le difénoconazole, le fenbuconazole, le tébuconazole ainsi que le tétraconazole. Le myclobutanil n'a pas été analysé dans le plasma puisque la priorisation était non complète lors de l'analyse de cette matrice. Cette molécule s'est avérée pertinente à suivre par la suite puisqu'elle a été quantifiée dans les échantillons de mousses PUF et de plumes. Le penconazole n'a pas été quantifié en matrice plasma. Ce point laisse penser que la matrice plume est capable de fournir plus d'informations.

Les graphiques de corrélation entre les concentrations plasmatiques (axe x) et dans les plumes (axe y) sont présentés Figure 97 en logarithme. Lorsque les données de concentrations sont inférieures à la LQ, elles sont remplacées par la moitié de la LQ de la molécule. Les résultats sur les goélands n'ont pu être ajoutés au graphique puisque les échantillons sélectionnés ne sont pas identiques pour les deux matrices. Pour rappel, seul un petit nombre d'échantillons de goélands bruns et de marins ont été analysés en azoles avec tous les résultats inférieurs à la LQ. Au total, 93 données ont été prises en compte dans chacun des graphiques soit 73 données pour les merles noirs (n = 38 pour 2016 et n = 35 pour 2019) et 20 données concernant les cigognes blanches.

De nombreuses données se situent le long de l'axe y représentant la concentration en matrice plume. Plus d'informations sont fournies par cette matrice où les fréquences de quantification sont plus élevées qu'en matrice plasma. Ceci coïncide avec la dégradation rapide des molécules étudiées en matrice plasma alors que les concentrations dans les plumes sont stables une fois celles-ci formées.



Les concentrations plasmatiques peuvent donc fournir une information à court terme de l'exposition alors que les plumes seront pertinentes sur une période plus longue pendant leur formation (Lennon et al., 2020a).

Les résultats fournis par l'espèce cigogne blanche ne s'avèrent pas pertinentes pour l'analyse de la corrélation puisque seulement deux valeurs sont quantifiées et ce dans une seule des deux matrices. En revanche, les corrélations entre les concentrations plasmatiques et de plumes des merles noirs peut être réalisées au vu du plus grand nombre d'échantillons. Le fenbuconazole et le tétraconazole présentent des corrélations significatives avec une p-value égale à 0,1 % pour des variance  $R^2$  de 0,275 et 0,255 respectivement. A contrario, les droites linéaires ne sont pas tracées pour le difénoconazole et le tébuconazole puisque les valeurs de p-value ne prouvent pas une corrélation significative (0,179 et 0,975 respectivement).

Pour cette famille de molécules, aucune publication n'étudie la corrélation entre les concentrations plasmatiques et de poils/cheveux/plumes.

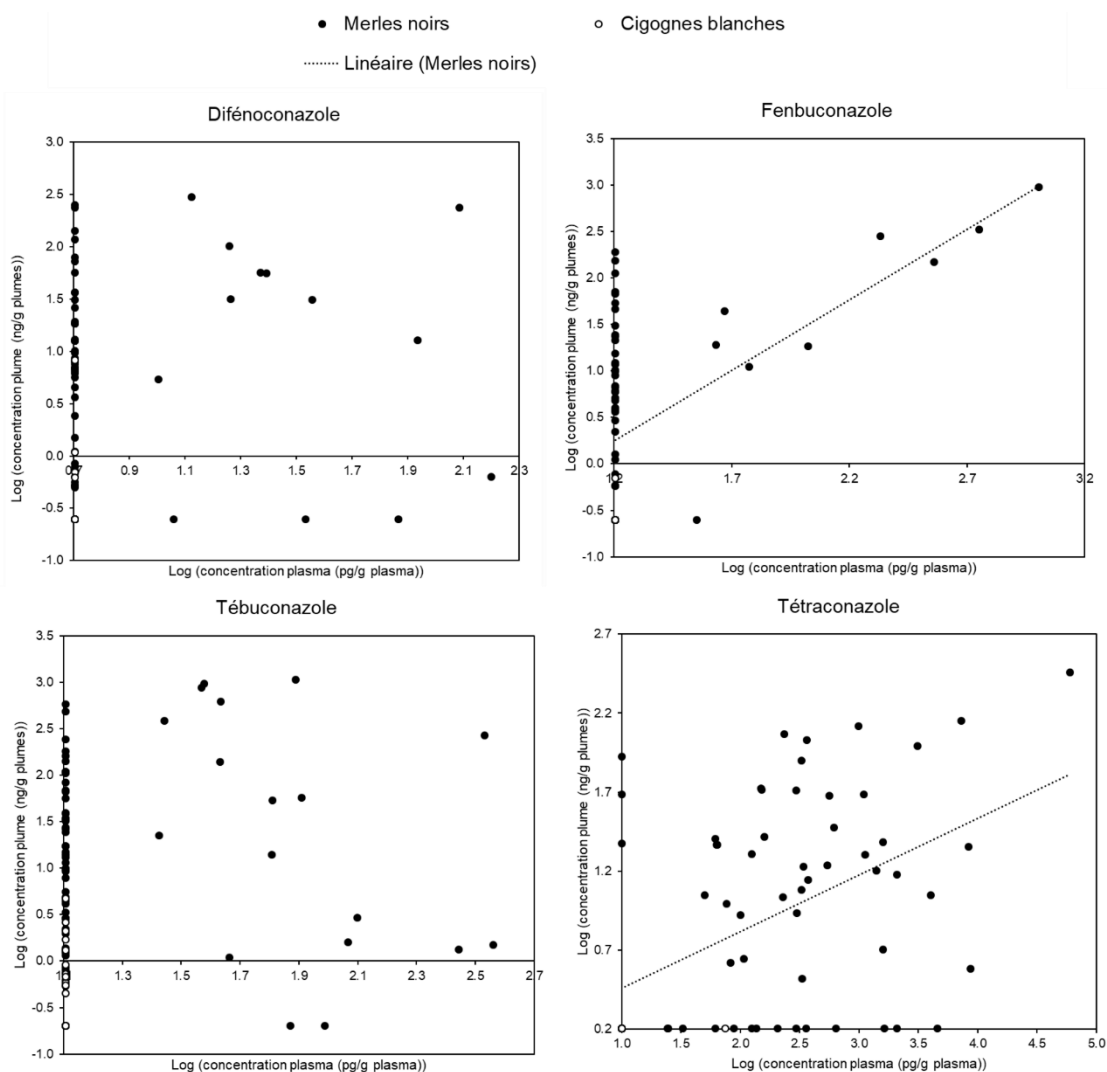


Figure 96 : Corrélation entre les concentrations en azoles plasmatiques et dans les plumes

## ii. Néonicotinoïdes

La corrélation entre les concentrations en néonicotinoïdes plumes et plasma peut être étudiée pour les échantillons merles noirs (n = 30), cigognes blanches (n = 20) et goélands argentés (n = 12) (Figure 98). Les données brutes, y compris celles incluses entre la LD et la LQ, sont incluses sans passer au logarithme.

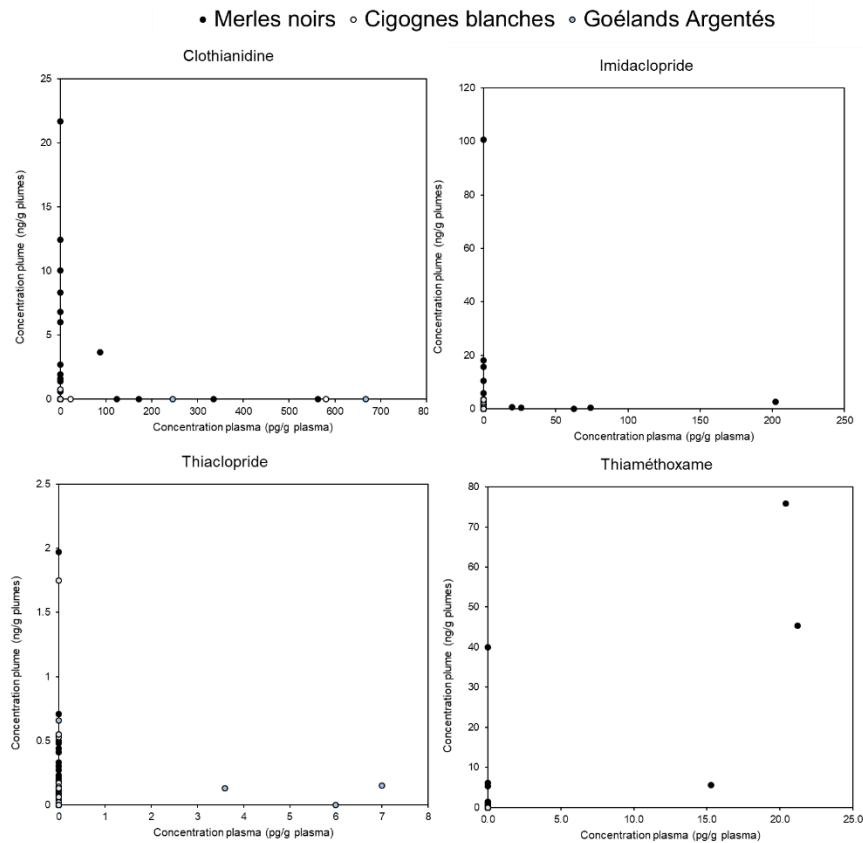


Figure 97 : Corrélation entre les concentrations en néonicotinoïdes plasmatiques et dans les plumes

Les goélands bruns n'ont pas été pris en compte puisque tous les échantillons analysés en plumes ont des concentrations inférieures à la LQ en matrice plasma. Les néonicotinoïdes ont été quantifiés uniquement dans des échantillons de plasma des années de capture 2017 et 2018 mais les plumes pour ces années n'ont pas été prélevées. L'acétamipride n'a pas été quantifié en matrice plasma et n'apparaît donc pas sur les graphiques. Pour les autres molécules, (clothianidine, imidaclopride, thiaclopride et thiaméthoxame) très peu de points se superposant sur les deux matrices sont obtenus. De nombreux points s'organisent le long de l'axe y mais également le long de l'axe x représentant les concentrations plasmatiques. Quand le thiaméthoxame est détecté en matrice plasma (les valeurs sont comprises entre la LD et la LQ), il est quantifié en matrice plume. La matrice plume fournit donc plus d'informations que le plasma pour les molécules thiaclopride et thiaméthoxame.

*iii. Propriétés physico-chimiques*

Les pesticides qui sont retrouvés dans les plumes ont été apportés via le sang. Plusieurs paramètres physico-chimiques sont importants à considérer alors étudiés afin de comprendre la différence entre ces deux matrices. Les propriétés telles que la masse moléculaire, la solubilité, le log  $K_{ow}$ , le  $pK_a$  et donc la forme ionique dans les deux matrices ainsi que la réactivité sont rapportées dans le Tableau 61 et ont été extraites du Tableau 14 pour les azoles et Tableau 17 pour les néonicotinoïdes du chapitre 2 matériel et méthodes. Certaines propriétés sont manquantes. A ce tableau, sont également ajoutées les quantités vendues dans les départements étudiés selon les usages ainsi que les concentrations maximales quantifiées en matrice plasma et en matrice plume. L'influence des propriétés sur la présence des composés dans les différentes matrices est étudiée et s'appuie également sur les résultats de publications portant sur l'analyse dans les poils à défaut d'en avoir des disponibles qui analysent les plumes.

Chapitre 5 : Développements analytiques et applications en matrice plume

Tableau 61 : Quantités vendues, concentrations maximales en matrices plasma et plume, propriétés physico-chimiques et réactivité des azoles et néonicotinoïdes d'après le Tableau 14 pour les azoles et Tableau 17 néonicotinoïdes issus du chapitre 2

	Quantité vendues dans les 2 départements en 2017 (kg)		Concentrations maximales		M (g/mol)	Solubilité (mg/L)	Log K <sub>ow</sub>	Acidité, forme ionique			Réactivité aqueuse DT50 hydrolyse aqueuse (jours)	
	usage grandes cultures	usage vigne	Plasma (pg/g plasma)	Plume (ng/g plumes)				pK <sub>a</sub>	Plasma	Plume		
A	Bitertanol	0	0	Non analysé	< 200	337,42	3,8	4,10	-	-	-	> 365
	Bromuconazole	1586	0	Non analysé	9,09	377,06	48,3	3,24	2,75	Neutre	Neutre	30
	Cyproconazole	4128	0	211,6	12,79	291,78	93	3,09	2 / 13	Neutre	Neutre	> 365
	Difénoconazole	835	720	156,7	300,44	406,26	15	4,36	1,07	Neutre	Neutre	> 365
	Epoxiconazole	10295	0	< 160	2017,63	329,76	7,1	3,30	2	Neutre	Neutre	> 365
	Fenbuconazole	0	545	945,0	950,81	336,82	3,8	3,79	2	Neutre	Neutre	> 365
	Fluquinconazole	0	0	Non analysé	Non validé	376,17	1,15	3,24	0,9	Neutre	Neutre	21,9
	Flusilazole	0	0	16,4	2,25	315,39	41,9	3,87	2,5	Neutre	Neutre	> 365
	Flutriafol	1	0	< 400	< 0,3	301,29	95	2,30	2,3	Anion	Anion	> 365
	Imazalil	0	0	< 400	0,86	297,18	184	2,56	6,5	Cation	Cation	30-100
	Ipconazole	47	0	Non analysé	< 3,0	333,90	9,34	4,30	- 5,4	Anion	Anion	64
	Metconazole	4360	0	167,4	385,88	319,83	30,4	3,85	1,1 / 11,4	Neutre	Neutre	> 365
	Myclobutanil	0	477	Non analysé	480,57	288,78	132	2,89	2,3	Neutre	Neutre	> 365
	Penconazole	0	13	< 25	51,01	284,18	73	3,72	1,51	Neutre	Neutre	> 365
	Prochloraze	23229	0	< 25	3,72	376,70	26,5	3,50	3,8	Neutre	Neutre	> 365
	Propiconazole	4833	0	< 200	16,48	342,22	100	3,72	1,1	Neutre	Neutre	53,5
	Prothioconazole	20746	0	< 5000	Non validé	344,26	22,5	2,00	6,9	Anion	Neutre	> 365
	Tébuconazole	20563	5359	521,8	1062,54	307,82	36	3,70	5	Anion	Neutre-Anion	> 365
	Tétraconazole	38	829	59976,5	315,22	372,15	156,6	3,56	0,65	Neutre	Neutre	> 365
Triadiméfon	0	0	< 150	< 1,5	293,80	70	3,18	2	Neutre	Neutre	> 365	
Triadiménol	0	32	< 1500	< 40	295,76	72	3,18	2 / 13	Neutre	Neutre	> 365	
Triticonazole	220	0	Non analysé	< 30	317,82	9,3	3,29	-	-	-	7,4	
N	Acétamipride	14	0	10,1	113,47	222,67	2950	0,80	0,7	Neutre	Neutre	> 365
	Clothianidine	0	0	1371,2	21,67	249,70	340	0,905	11,1	Cation	Cation	> 365
	Cyclozapride	0	0	< 50	< 0,4	322,75	-	-	-	-	-	-
	Dinotéfurane	0	0	< 600	8,65	202,21	39830	-0,549	12,6	Cation	Cation	> 365
	Flupyradifurone	0	0	< 25	48,63	288,68	3200	1,20	-	-	-	-
	Imidaclopride	16918	0	202,2	100,75	255,66	610	0,57	-	-	-	> 365
	Nitenpyrame	0	0	< 100	< 0,5	270,72	590000	-0,66	3,1	Neutre	Neutre	> 365
	Sulfoxaflor	0	0	< 10	< 0,2	277,27	568	0,802	-	-	-	-
	Thiaclopride	5638	0	81,0	17,23	252,72	184	1,26	-	-	-	> 365
	Thiaméthoxame	41	1723	< 50	75,79	291,71	4100	-0,13	-	-	-	> 365

- information non disponible, A : Azoles, DT50 : Temps de demi-vie, K<sub>ow</sub> : Coefficient de partage octanol/eau, M : Masse moléculaire, N : Néonicotinoïdes, pK<sub>a</sub> : - log de Constante de dissociation dans l'eau, pH : Potentiel Hydrogène

Code couleur : Jaune/Grandes cultures-Violet/Vignes-Bleu/Grandes cultures et vignes

L'influence de la masse moléculaire est tout d'abord étudiée. Pour toutes les molécules des travaux, les masses moléculaires sont inférieures à 400 g/mol. Les deux molécules aux valeurs extrêmes, avec la plus faible masse moléculaire (dinotéfurane : 202,1 g/mol) et la plus élevée (difénoconazole : 406,25 g/mol), ont été quantifiées en matrice plume. Les concentrations plus élevées pour cette deuxième peuvent dépendre de la quantité appliquée. Cette propriété ne semble pas impacter la présence des substances dans ces matrices d'autant plus que l'amplitude de masse moléculaire pour les molécules étudiées est faible. Pour des molécules ayant des masses moléculaires inférieures 500 g/mol, la même conclusion a été émise (Chata et al., 2016).

La solubilité pourrait éventuellement justifier de plus fortes concentrations en plasma puisque celui-ci est composé à 90 % d'eau. Cette propriété physico-chimique néanmoins ne semble pas justifier toutes les différences dans notre cas et dans la littérature (Chata et al., 2016). Les néonicotinoïdes sont plus solubles que les azoles. Prenons l'exemple du thiaméthoxame et du tétraconazole. Le premier est deux fois plus vendu pour application en site viticole et a une solubilité 26 fois supérieures pourtant ces concentrations sont inférieures à la LQ. La plus forte solubilité du tétraconazole peut en revanche justifier les plus fortes concentrations en matrice plasma quantifiées par rapport au tébuconazole.

La lipophilie de la molécule est également étudiée. Elle se traduit par le log  $K_{ow}$  : plus il est élevé plus la molécule est lipophile. Les néonicotinoïdes ne sont pas lipophiles mais plutôt hydrophiles avec des log  $K_{ow}$  inférieurs à 1,3. Les azoles sont moyennement lipophiles avec des valeurs de log  $K_{ow}$  comprises entre 2 et 4,4. De faibles valeurs traduisent une faible accumulation dans l'organisme en privilégiant les environnements aqueux plutôt que gras. Les valeurs plus élevées traduisent une accumulation au sein des tissus gras. Les molécules lipophiles sont plus fréquemment retrouvées dans la glande uropygienne sécrétée par les oiseaux pour laver et rendre les plumes imperméables (Jaspers et al., 2019). Cette hypothèse permet d'expliquer la différence des concentrations dans les plumes entre le thiaméthoxame, hydrophile, et le tétraconazole, moins hydrophile. Les concentrations en thiaméthoxame dans les plumes sont faibles comparés à la quantité de substance active vendue. Cette donnée ne peut être exploitée pour comparer les valeurs du tébuconazole et du tétraconazole puisque leur log( $K_{ow}$ ) sont égaux. Dans la littérature, pour certains pesticides dont le penconazole, le tébuconazole et l'imidaclopride, la concentration retrouvée dans les cheveux est corrélée à la quantité appliquée et la lipophilie des molécules n'améliore pas cette corrélation. Cette propriété ne joue pas un rôle significatif pour expliquer la corrélation (Polledri et al., 2019).

La charge des molécules dans les deux matrices est comparée. Le pH dans le plasma est de 7,3 en moyenne et celui des cellules des plumes composées de kératines est plus faible et varie entre 3 et 6 (Kintz, 2007). Une différence de pH est donc effective entre ces deux matrices. Connaissant ce pH, le  $pK_a$  des molécules et la formule chimique de la molécule, son état ionique peut être déterminé. La plupart des molécules étudiées sont présentes dans ces deux matrices sous forme neutre. Le flutriafol, l'imazalil, l'ipconazole, la clothianidine et le dinotéfurane sont sous formes ioniques dans les deux matrices. Lors du passage de la matrice plasma vers les plumes, un changement de forme est réalisé pour le prothioconazole et le tébuconazole qui passent de la forme anionique à neutre selon le pH. D'après Pragst et Balikova (2006), la basicité d'une molécule favorise son incorporation en matrice cheveu. Cette hypothèse permettrait de justifier la différence de comportements entre le tébuconazole et le tétraconazole. En matrice plasma, les concentrations en tétraconazole sont supérieures à celles en tébuconazole. L'inverse a été observé en matrice plume. Le tétraconazole étant sous forme anionique, donc basique en matrice plume, il pourrait être plus facilement accumulé dans cette matrice. C'est d'ailleurs la matrice plume qui corrèle le mieux aux rapports des quantités vendues en sites viticoles entre le tébuconazole (plus vendu) et le tétraconazole. Le rapport des

quantités vendues est de 6,4 (tébuconazole/tétraconazole) contre 3,4 en concentrations plumes et 0,009 en matrice plasma. Quant aux autres molécules, celles sous formes anioniques, cationiques ou neutres, elles sont quantifiées dans les deux matrices.

Ces propriétés physico-chimiques expliquent difficilement les différences, aucune tendance n'est réellement observée de façon générale. Les quantités vendues ne permettent pas non plus d'expliquer une corrélation pour les concentrations quantifiées dans les différentes matrices. Sachant que les concentrations maximales sont essentiellement les merles viticoles, une corrélation est réalisée avec les quantités vendues pour application en site viticole : un  $R^2$  de 0,0609 est obtenu en plasma et  $R^2$  de 0,1588 en matrice plume. Il se peut que les estimations de quantités vendues ne correspondent pas à la réalité des quantités appliquées sur le terrain.

Un biais est également à prendre en compte entre la date d'application du traitement et celle du prélèvement. En supposant que la concentration de la molécule, une fois accumulée, reste stable dans la plume, les concentrations plumes d'individus adultes sont donc maximales. En revanche, ceci n'est pas le cas pour les concentrations plasmatiques où les concentrations en azoles et néonicotinoïdes diminuent rapidement.

La réactivité de la molécule pourrait expliquer les principales différences. La réactivité aqueuse est mentionnée dans le tableau puisqu'il s'agit de celle s'apparentant au mieux à la matrice plasma étant composée principalement d'eau. Le temps de demi-vie par photolyse aqueuse ne sera pas développé puisque le plasma n'est pas exposé au rayonnement ultraviolet. Le temps de demi-vie par hydrolyse aqueuse est la réactivité étudiée pour tenter de justifier les différences entre les matrices. Cette donnée informe que la plupart des azoles et tous les néonicotinoïdes ne sont pas hydrolysés en matrice aqueuse. Ils sont persistants avec des temps de demi-vie supérieurs à 365 jours. Seuls les bromuconazole, fluquinconazole, imazalil, ipconazole, propiconazole et triticonazole ont des valeurs de temps de demi-vie par hydrolyse aqueuse inférieures à 365 jours mais ces molécules ne présentent pas d'intérêt majeur dans le cadre de notre étude.

Dans la littérature, il a été prouvé que les azoles (Burkina et al., 2016; Gross et al., 2020; Li et al., 2017) ainsi que les néonicotinoïdes (Bean et al., 2019; Kapoor et al., 2014; Roy et al., 2020) qui sont transportés via le sang/plasma sont rapidement répartis dans différents organes (foie, cerveau, rein, muscle, ovaire, ...). La dégradation n'a donc pas lieu au sein du plasma, comme le prouve la non hydrolyse aqueuse de ces molécules, mais plutôt au sein des organes qui vont ensuite excréter en dehors de l'organisme les molécules ou métabolites de ces dernières. Le foie permet la dégradation ainsi que l'excrétion via les fèces (Gross et al., 2020; Tomizawa et Casida, 2005) et les reins permet l'excrétion via les urines (Ford and Casida, 2006; Fustinoni et al., 2014; Harada et al., 2016; Kapoor et al., 2014; Kavvalakis et al., 2013).

Les temps de présence dans les différents tissus de l'organisme est inférieur à 7 jours pour le triadiméfon qui est à ce terme est entièrement excrété/dégradé (Li et al., 2017) ou encore de l'ordre de 24 h (Bean et al., 2019; Roy et al., 2020) ou 48 h pour l'imidaclopride (Kapoor et al., 2014).

Le triadiméfon a une concentration maximale dans le sang dans les deux heures suivant l'exposition de l'espèce (Li et al., 2017). Au bout d'une heure après exposition à une faible dose au tébuconazole, il n'est pas quantifié dans le plasma et ne l'est que dans un échantillon sur 11 lors de l'exposition à forte dose (Gross et al., 2020). La concentration maximale pour l'imidaclopride varie selon les publications entre 1 h après exposition (Eng et al., 2021) voire jusqu'à 12 h (Kapoor et al., 2014). Il en est de même pour le thiaméthoxame où les temps de concentrations maximales plasmatiques varient de quelques heures (Bednarska et al., 2013) jusqu'à 12 h (Kapoor et al., 2014) après exposition.

Pour conclure, ces faibles valeurs prouvent la non accumulation des azoles et néonicotinoïdes dans les différents tissus organiques bien qu'aucune étude ne se soit portée sur les phanères. Les temps de demi-vie dans le plasma sont encore plus faibles puisqu'il s'agit d'un fluide en mouvement permettant d'irriguer les organes. Les concentrations plasmatiques dépendent donc essentiellement de ce critère de demi-vie qui est discriminant accompagné des quantités vendues.

#### 4. Bilan des concentrations dans les plumes

La première partie de ce chapitre a porté sur le développement de la méthode de préparation des échantillons plumes. Trois techniques d'extraction ont été comparées. La technologie Edge a été éliminée puisqu'elle nécessitait des temps de pré-lavage importants du matériel. C'est la technique micro-ondes qui a ensuite été privilégiée comparée à la technique ultrasons, du fait d'une meilleure répétabilité. Finalement, la méthode a pu être appliquée à l'analyse de 21 azoles, 10 néonicotinoïdes et 7 de leurs métabolites. Deux molécules n'ont pu être validées avec ce protocole. La question de réaliser une purification sur les extraits s'est posée puisque l'effet matrice plume est élevé. La purification SPE entraînant des pertes pour certaines molécules, elle n'a pas été réalisée pour les échantillons environnementaux.

Le protocole analytique a été appliqué dans un premier temps à des échantillons de plumes de moineaux provenant de la manipulation d'exposition au tébuconazole. Les résultats se sont avérés intéressants, prouvant que le protocole peut être appliqué à des plumes de provenance environnementale.

Les azoles ont été quantifiés dans les matrices plumes de différentes espèces. Leur analyse permet bien la comparaison des habitats pour les merles noirs de l'année 2019. Le milieu viticole présente des concentrations plus élevées. La saisonnalité des contaminations a également été comparée chez les individus juvéniles. En effet, pour ces derniers les plumes permettent d'expliquer la contamination des mois de leur capture puisque leurs plumes poussent à cette période. Plus de variations sont observées chez les individus adultes. Néanmoins, les résultats de ces adultes laissent suggérer une persistance des azoles durant plusieurs mois dans la matrice plume. La différence significative entre les habitats a également été observée pour deux molécules chez la cigogne blanche. En revanche, aucune conclusion n'a pu être tirée concernant les goélands. En comparant toutes les espèces entre elles selon leurs habitats, les concentrations maximales ont, presque, toutes été observées chez le merle noir viticole. Ces valeurs ont ensuite été comparées avec la littérature portant sur les concentrations en matrice cheveu. Les concentrations maximales en matrice plume des merles noirs sont, pour la plupart des molécules, très largement supérieures à celles mentionnées pour les cheveux dans la littérature. Les individus de merles noirs habitant à proximité d'un site viticole sont donc fortement contaminés par les azoles.

L'analyse des néonicotinoïdes permet d'établir une différence entre les habitats des merles noirs de l'année 2019. Les deux habitats n'ont pu être différenciés pour les cigognes blanches puisque peu de molécules ont été quantifiées. Au sein des goélands, la différence d'habitat a été observée en corrélant les sommes des concentrations des plumes avec celles des signatures isotopiques et taux de mercure pour les goélands bruns. Les goélands bruns des sites ou nourriture plutôt terrestres ont des concentrations plus élevées en néonicotinoïdes. Aucune tendance significative n'a été observée pour les goélands argentés.

Pour les différentes espèces aucun n'impact de la restriction d'usage de cette famille de molécule n'a été significativement observé sur les fréquences ou encore sur les concentrations retrouvées en matrice plume. Plusieurs années seront très certainement nécessaires avant d'avoir un effet sur ces concentrations. Néanmoins, un abaissement des concentrations maximales en matrice plume est visible, sans être significatif, pour l'acétamipride, le thiaclopride et le thiaméthoxame.

Concernant les métabolites des néonicotinoïdes, l'imidaclopride guanidine semble être un bon marqueur dans cette matrice d'une exposition à l'imidaclopride. En revanche aucune corrélation significative n'a été obtenue. Dans le cas de la clothianidine, il semblerait que sa présence dans cette matrice ne soit pas entièrement reliée à la métabolisation du thiaméthoxame. Une autre source, autre que l'application en tant que substance active, doit justifier sa présence.

En comparant toutes les espèces entre elles, c'est également le merle noir viticole qui présente les concentrations maximales (excepté pour le flupyradifurone). Les données ont ensuite été comparées avec la littérature en matrice cheveu et plume. En matrice cheveu, les concentrations en néonicotinoïdes sont supérieures à celles de notre étude. En revanche, les concentrations de notre étude sont supérieures pour 3 molécules sur 5 à celles en matrice plume de la littérature.

L'analyse en composante principale conforte ces précédentes observations à savoir que c'est le merle viticole qui présente les concentrations maximales en azoles. Une séparation des molécules selon leur autorisation d'application est bien visible avec les molécules viticoles qui expliquent la contribution maximale. Le thiaméthoxame est alors retrouvé parmi les azoles autorisés à être appliqués en sites viticoles.

La dernière partie mentionne la comparaison des matrices plasma et plumes. Un semblant de corrélation est présent entre ces deux matrices uniquement pour le fenbuconazole. La matrice plume fournit plus d'informations avec des fréquences plus élevées de molécules quantifiées. Elle permet de renseigner sur une contamination à plus long terme datant de la période de formation de la plume. L'hypothèse de la persistance des molécules étudiées dans cette matrice serait à vérifier. La matrice plasma, quant à elle, renseigne sur une exposition à court terme puisque les molécules étudiées sont rapidement transportées vers les différents organes pour ensuite y être dégradées, ainsi, leur concentration plasmatique diminue très vite.

Pour expliquer la répartition des molécules dans l'une des deux voire les deux matrices, les propriétés physico-chimiques ont été étudiées. La masse moléculaire, la solubilité, l'hydrophobicité ou le caractère ionique de la molécule ne permettent pas d'expliquer de façon globale l'ensemble des résultats. La quantité de substances vendues n'est pas non plus un facteur explicatif direct des concentrations plasmatiques et dans les plumes. Il faudrait idéalement connaître la relation entre la dose ingérée et la concentration dans les plumes associées. Aucune étude de cinétique n'a été réalisée dans cette matrice plume qui reste encore peu étudiée. Les relations des niveaux dans les plumes avec ceux dans les organes ne sont pas encore établis. Il est alors impossible de corrélérer ces concentrations avec les potentiels effets toxiques.





## Conclusion et perspectives

L'objectif des travaux était dans un premier temps de développer les méthodes analytiques permettant l'analyse des azoles et néonicotinoïdes et certains de leurs métabolites avec de faibles prises d'essai pour les deux matrices biologiques plasma et plumes. Il s'agissait ensuite d'établir l'état des lieux de contamination chez plusieurs espèces de vertébrés localisées en région Nouvelle-Aquitaine en fonction de leurs habitats. Lorsque les données le permettent, une approche physiologique a pu être menée en mettant en relation les concentrations quantifiées avec les paramètres physiologiques des individus capturés.

Tout d'abord, avant d'analyser les matrices biologiques, des échantillonneurs passifs ont permis d'avoir une notion de l'ambiance chimique sur trois sites (un forestier et deux viticoles) dont deux où les merles noirs et mésanges charbonnières ont été capturés. La saisonnalité des molécules présentes dans le compartiment aérien correspond bien avec le calendrier d'application de celles-ci. En revanche, il a été constaté que les données de concentrations dans les mousses PUF ne retracent pas uniquement l'application sur le site étudié. En effet, certaines molécules ont été quantifiées dans le compartiment atmosphérique alors qu'elles sont normalement non appliquées sur le site (molécules quantifiées dans l'air du site forestier ou encore molécules normalement appliquées sur grandes cultures quantifiées dans les trois sites). Ceci est probablement dû à un transport des molécules sur de longues distances qui pourraient donc traverser diverses parcelles. Les concentrations maximales ont été obtenues pour les azoles avec le fenbuconazole, le penconazole, le tébuconazole et le tétraconazole (concentrations estimées en  $\text{ng}/\text{m}^3$  supérieures à 0,35). Les concentrations pour les néonicotinoïdes sont beaucoup plus faibles ce qui est à relier à leur caractère non volatil (au maximum pour le thiaméthoxame :  $0,09 \text{ ng}/\text{m}^3$ ). Ces molécules sont autorisées à être appliquées sur les sites viticoles et leur concentration maximale a été obtenue sur un des sites viticoles au mois de juin.

Ensuite, les développements analytiques ont porté sur l'analyse du plasma à l'aide de la SPE en ligne installée en amont de la LC-MS/MS. Des LQ variant de 10 à 5000  $\text{pg}/\text{g}$  plasma pour les azoles ont été validées, de 4 à 600  $\text{pg}/\text{g}$  plasma pour les néonicotinoïdes et de 10 à 150  $\text{pg}/\text{g}$  plasma pour certains de leurs métabolites.

Au vu des techniques analytiques employées dans la littérature pour l'analyse des néonicotinoïdes en matrice plasma à provenance environnementale (non réalisé à ce jour pour les azoles) et des sensibilités recensées, la technologie SPE en ligne installée en amont de la LC-MS/MS ne semble pas être le choix optimal. En effet, bien qu'elle présente de nombreux avantages (par exemple grâce à son temps de préparation des échantillons réduit), elle génère de fortes interférences notamment pour les azoles ainsi qu'une impossibilité de réunir l'analyse de plusieurs familles en simultanée. La cartouche SPE en ligne et les temps de chargement ont dû être optimisés pour chacune des familles étudiées. Les résultats des travaux de thèse ont notablement contribué à l'augmentation des connaissances sur le comportement des azoles en matrice plasma puisqu'ils n'ont pas été analysés à ce jour dans cette matrice environnementale.

La prise d'essai plasmatique avec ce protocole SPE en ligne est de seulement 25  $\mu\text{L}$  et elle a pu encore être abaissée à 10  $\mu\text{L}$  pour analyser une seule famille de molécules, les azoles, dans le plasma d'une espèce d'oiseau plus petite (mésanges charbonnières). Les développements analytiques menés sur la matrice plume ont conduit à des LQ validées comprises entre 0,02 et 200  $\text{ng}/\text{g}$  plumes pour les trois familles réunies. La prise d'essai est de seulement 20 mg voire 10 mg lorsqu'une seule molécule a été analysée (le tébuconazole dans les plumes de l'expérience d'exposition des moineaux domestiques). Le protocole d'extraction

assistée par micro-ondes a été celui retenu avec aucune purification de l'extrait réalisée en suivant. Cette matrice a semblé être un bon proxy de la contamination suite à l'analyse des plumes de l'exposition des moineaux domestiques au tébuconazole. L'analyse a donc été élargie à différentes espèces d'oiseaux sauvages.

En ce qui concerne le plasma, de faibles fréquences de détection/quantification ont été observées qui permettent néanmoins de différencier les espèces et leurs habitats dans le cas des espèces sauvages capturées. Ces faibles signaux s'expliquent par une cinétique d'élimination rapide. Ces molécules sont rapidement transportées via cette matrice plasma au sein de différents organes où a lieu la dégradation suivie de l'excrétion (foie, reins). Les métabolites (étant produits de façon à excréter plus rapidement le xénobiotique) sont eux-mêmes éliminés rapidement d'où le faible intérêt de l'analyse des métabolites.

Le plasma est ainsi une matrice qui permet d'observer l'exposition des espèces à très court terme calculé en heures voire quelques jours. Pour les azoles, quatre molécules sont mises en évidence en milieu viticole par les merles noirs et les mésanges charbonnières. Il s'agit du fenbuconazole, difénoconazole, tébuconazole et tétraconazole sachant que la saisonnalité correspond avec celle des concentrations quantifiées dans les mousses PUF. Malgré les concentrations élevées en azoles, aucune différence forte n'a été observée pour trois indicateurs de l'état de santé (condition corporelle, hémocrite et densité du plumage) entre les trois habitats des merles noirs (forêt, urbain et viticole). L'interdiction des néonicotinoïdes en septembre 2018 s'est répercutée sur les fréquences de détection/quantification avec une diminution de celles-ci. La clothianidine reste néanmoins la molécule la plus quantifiée, y compris après l'interdiction. Elle est particulière car à la fois un pesticide (mais non appliqué) mais également un métabolite du thiaméthoxame. Ces différents résidus proviendraient de la persistance des néonicotinoïdes dans l'environnement y compris dans l'eau ou dans le sol. Les données ont été mises en relation avec les DL50 et NOEC pour les néonicotinoïdes pour lesquels certaines valeurs s'en approchent. Ceci signifie que des conséquences physiologiques ou comportementales sont envisageables pour les individus les plus exposés.

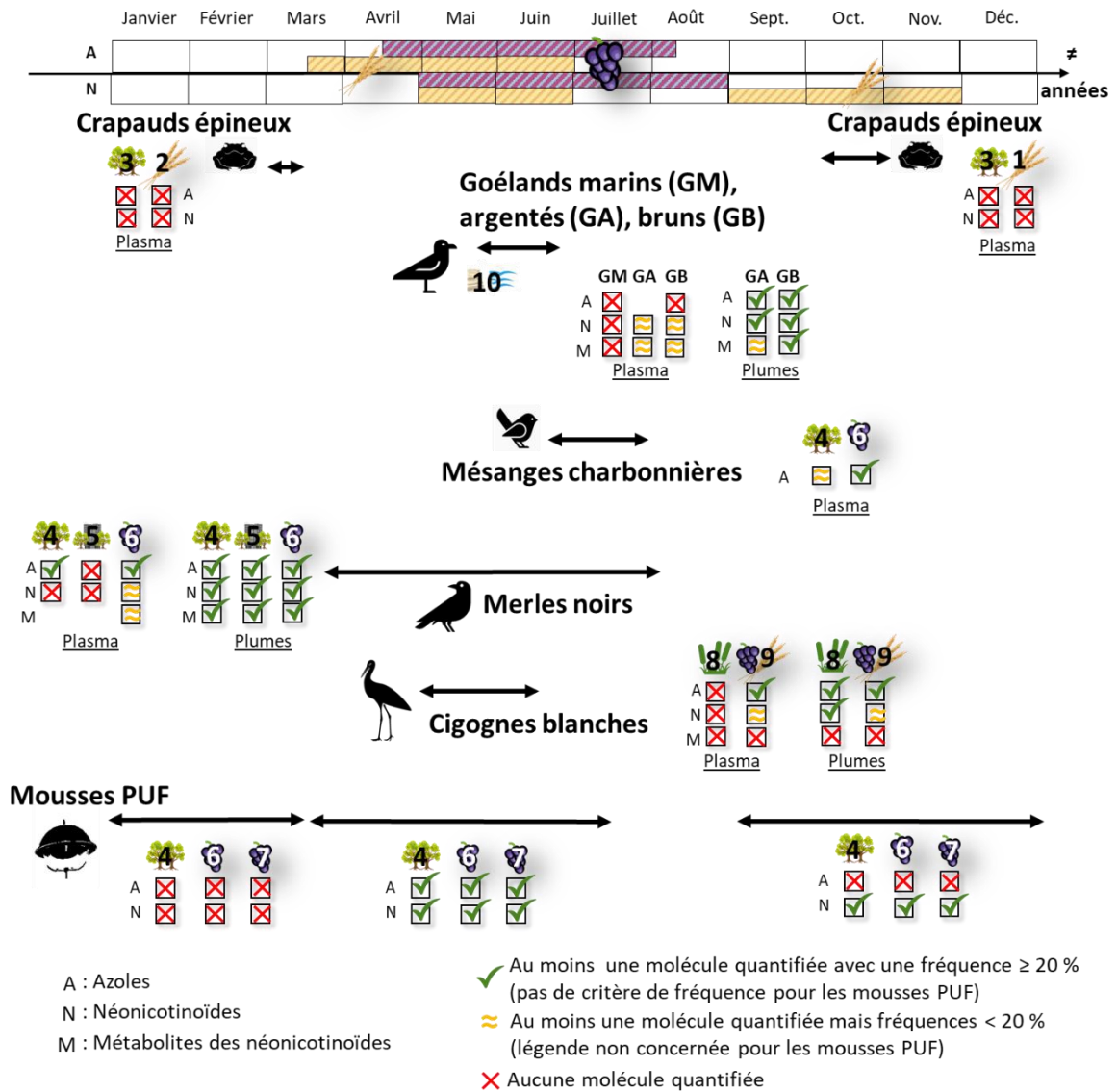
En ce qui concerne les résultats environnementaux en matrice plume, les différences entre les habitats ne sont pas significatives pour toutes les espèces. En revanche, 7 molécules dont 6 azoles (fenbuconazole, difénoconazole, myclobutanil, penconazole, tébuconazole, tétraconazole) et 1 néonicotinoïde (thiaméthoxame) ont été quantifiées avec des concentrations plus élevées et sont caractéristiques d'une utilisation viticole. Les individus juvéniles sont apparus être de meilleurs marqueurs de la contamination d'un site puisque la période de pousse de leurs plumes correspond à leur séjour au nid, lorsqu'ils sont nourris par les parents et témoigne d'une exposition locale. Sur ces individus résidant en site viticole, la saisonnalité des molécules appliquées et retrouvées dans les échantillonneurs passifs correspond à ce qui est retrouvé dans les plumes. En ce qui concerne les individus adultes, leurs plumes permettraient d'évaluer des expositions à plus long terme que le plasma. Néanmoins, cette hypothèse de persistance en matrice plume sera à vérifier pour toutes les molécules étudiées. L'analyse des métabolites s'est avérée plus intéressante qu'en matrice plasma avec des tendances de corrélation entre certaines molécules parentes et leur(s) métabolite(s) associé(s). En revanche, les concentrations obtenues n'ont pu être corrélées avec des données toxicologiques car ces dernières sont manquantes dans la littérature.

Finalement, les deux matrices ont été comparées en fonction des quantités vendues et des propriétés physico-chimiques des molécules étudiées. La masse moléculaire, la solubilité, la lipophilie, le caractère ionique ainsi que la réactivité des molécules étudiées ne permettent pas d'expliquer les concentrations maximales obtenues en matrice plasma ou plume. Ce sont essentiellement les quantités vendues (où un semblant de corrélation est plus élevé en matrice

plume que plasma) ainsi que le temps de demi-vie dans le plasma qui permettent d'expliquer majoritairement les différences de répartition. Les concentrations maximales dans le plasma surviennent dans les heures qui suivent l'exposition à la molécule sachant que ni les azoles ni les néonicotinoïdes s'accumulent dans les organes. Ils sont très rapidement dégradés puis excrétés en dehors de l'organisme. La date d'échantillonnage par rapport à la date réelle d'application est un paramètre non négligeable pour pouvoir corréler les deux concentrations qu'il serait intéressant de documenter dans le futur. Néanmoins, pour certaines molécules la concentration maximale obtenue en matrice plasma d'un individu est également maximale dans sa matrice plume.

Le bilan de tous ces résultats d'analyse est illustré Figure 99.

Conclusion et perspectives



- Grandes cultures **1** Usseau
- Grandes cultures **2** Prissé-la-Charrière
- Forêt **3** Parc animalier Zoodyssé, Villiers-en-Bois
- Forêt **4** CEBC, Villiers-en-Bois
- Urbain **5** Parc de Niort
- Vignes **6** Bercloux
- Vignes **7** Les Beguillères
- Brouage **8** Brouage
- Vignes + Grandes cultures **9** Estuaire de la Gironde
- Littoral **10** Réserve naturelle Lilleau des Niges, île de Ré

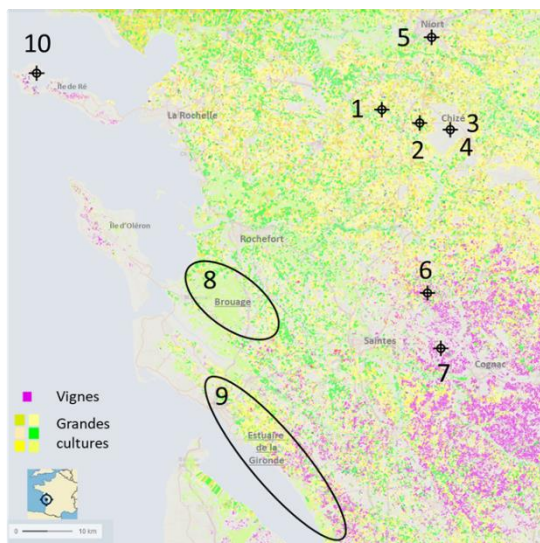


Figure 98 : Bilan des azoles, néonicotinoïdes et certains de leurs métabolites quantifiés en matrices mousses PUF, plasma et plumes des différentes espèces capturées en région Nouvelle-Aquitaine

Ces travaux ont mis en évidence des fréquences de quantification de certains azoles et néonicotinoïdes relativement importantes surtout dans les matrices plumes. 6 azoles sont apparus caractéristiques des sites viticoles à savoir les difénoconazole, fenbuconazole, myclobutanil, penconazole, tébuconazole et tétraconazole. 5 néonicotinoïdes ont été principalement quantifiés dans les différents habitats et espèces tels que l'acétamipride, la clothianidine, l'imidaclopride, le thiaclopride ainsi que le thiaméthoxame. Pour la suite des travaux, la liste de molécules à analyser pourrait se réduire à ces quelques molécules. Afin d'avoir une analyse des données complètes, il faudrait idéalement avoir accès aux quantités réellement appliquées sur chaque site de ces molécules ainsi que leur date d'application (pour les azoles puisque les néonicotinoïdes sont désormais interdits). Il serait également intéressant d'élargir la liste des molécules aux métabolites des azoles en poursuivant le développement entrepris mais non finalisé par manque de temps. Ces métabolites seraient pertinents à observer en matrice plasma (bien que leur temps de demi-vie est probablement très faible) mais également en matrice plume au vu des corrélations en concentrations parents et métabolites étudiés pour les néonicotinoïdes.

La liste des molécules pourrait aussi être élargie en analysant les extraits des mousses PUF et des plumes, sauvegardés au congélateur en solvant méthanol, soit par spectrométrie à haute résolution (HRMS) soit par spectrométrie de masse en tandem mais en balayant une plus large gamme de pesticides dans une logique multi-résidus. En effet, une liste élargie de plusieurs étalons internes pesticides a été ajoutée initialement avant l'extraction pour permettre cette future analyse plus large ciblée et non-ciblée. Les échantillons de plasma pourront également être analysés en réunissant plusieurs échantillons à extraire de façon à pouvoir augmenter la prise d'essai et donc les quantités (initialement en pg/g plasma) car la technique HRMS est moins sensible. Une liste de molécules présentes (aussi bien des pesticides parents que des métabolites) dans ces matrices pourra être établie grâce à cette technique analytique.

En ce qui concerne l'analyse du plasma, les sensibilités pour l'analyse des néonicotinoïdes pourraient être améliorées en employant une autre technique analytique. En effet, certaines molécules de cette famille sont polaires et fuient sur la cartouche employée en SPE en ligne. Il a été recensé dans la littérature de meilleures LQ, tout en ayant une prise d'essai faible, pour certaines molécules. Les développements peuvent donc être approfondis. Quant aux azoles, lorsque les études les concernant seront plus nombreuses, la comparaison des sensibilités pourra être réalisée.

En ce qui concerne l'analyse des plumes, certaines étapes du protocole pourraient être modifiées. Il serait intéressant de tester un protocole de préparation des plumes sans avoir recours à l'étape de broyage une fois qu'elles ont été préalablement prélavées et séchées. Un découpage de la matrice directement dans le flacon adéquat de l'extraction permettrait non seulement une réduction importante du temps de manipulation mais également un abaissement de la quantité de plumes initialement requises. Une quantité non négligeable est perdue le long des parois de la capsule du broyeur à bille. Cette modification, si elle s'avère équivalente à l'étape de broyage, permettrait d'analyser les plumes de plus petites espèces telles que celles des mésanges charbonnières déjà collectées en grand nombre. D'autres méthodes d'extraction pourraient être testées et comparées telles que l'ASE ainsi que la technologie Edge en approfondissant les développements déjà réalisés sur le choix des filtres et la procédure de nettoyage des Q-Cup. Les sensibilités en matrice plume pourraient être largement améliorées en ajoutant une étape de purification sur l'extrait. En effet, un fort écart entre les sensibilités obtenues en solvant et en matrice plume a été mis en évidence sachant que la purification par SPE n'a pas permis d'apporter une amélioration pour la plupart des molécules de l'étude. D'autres techniques pourraient être envisagées telles que la méthode de purification QuEChERS

qui s'appuie sur l'ajout d'une combinaison d'adsorbants dans l'extrait afin de réduire l'effet matriciel.

En matrice plume, de nombreuses données sont manquantes afin de permettre la corrélation entre les concentrations quantifiées et la dose potentiellement exposée. La cinétique de transfert, le temps d'accumulation ainsi que la persistance des azoles et néonicotinoïdes au sein de cette matrice plume n'ont jamais été étudiées. Il a alors été impossible d'estimer la toxicité des molécules en fonction des concentrations quantifiées dans cette matrice.

Au sein des deux matrices biologiques étudiées, il serait intéressant d'approfondir et d'élargir le dosage des azoles et des néonicotinoïdes à d'autres types d'habitats ainsi qu'à d'autres espèces sauvages. Les travaux de cette thèse ont permis de prouver que ces contaminants pouvaient être des marqueurs d'habitat où des différences entre espèces ont également été observées sur un même site (entre merles noirs et mésanges charbonnières en milieu viticole). Plus d'espèces semblables à un même habitat pourraient être échantillonnées en matrice plasma et plume de façon à identifier les différences entre espèces. Par exemple, des individus de merle noir, qui est une espèce ubiquiste, pourraient être étudiés avec pour mêmes sites que ceux de capture des goélands (Ile de Ré) ou ceux des cigognes blanches. Dans cette même logique, plus d'habitats pour une même espèce pourraient permettre une comparaison entre habitats plus élargie.

Il serait également intéressant de continuer à doser les néonicotinoïdes dans les années à venir. Les publications à ce jour mentionnent l'analyse des néonicotinoïdes dans les matrices biologiques des espèces sauvages uniquement avant leur interdiction dans le pays de l'étude. L'analyse des néonicotinoïdes après leur interdiction (septembre 2018 en France) pourrait permettre de confirmer la diminution des fréquences de quantification observées en matrice plasma où l'acétamipride, l'imidaclopride ainsi que le thiaméthoxame n'ont plus été détectés. Cela permettrait également de vérifier si une diminution significative est observée en matrice plume (non significative mais visible sur les plumes d'oiseaux capturés en 2019 et 2020). La molécule clothianidine doit continuer à être analysée bien qu'elle ne soit pas appliquée. Une hypothèse de sa présence dans ces matrices biologiques a été émise : elle est un métabolite du thiaméthoxame. En revanche, d'autres pistes doivent être envisagées pour justifier totalement sa présence. Une autre molécule pourrait se métaboliser en clothianidine ou alors elle pourrait être fabriquée par métabolisation du thiaméthoxame dans l'environnement (par exemple chez les plantes ou par les micro-organismes du sol) et non directement dans l'organisme.

Et enfin, les autres voies de contamination des espèces sauvages pourraient être étudiées. En effet, l'analyse des mousses PUF a permise d'illustrer les concentrations dans le compartiment aérien pouvant potentiellement contaminer les espèces par la voie respiratoire. La voie cutanée pourrait être estimée s'il était possible d'extraire les molécules à la surface des plumes des oiseaux. Quant à la voie via l'alimentation, les différents compartiments situés aux alentours des sites de capture pourraient être échantillonnés. Il s'agirait alors d'analyser les sols, l'eau (sachant que l'expérience d'exposition au tébuconazole chez les moineaux domestiques prouve ce transfert via l'eau) ou encore les insectes ou invertébrés dont se nourrissent de nombreuses espèces d'oiseaux. Grâce à ces multiples analyses, l'exposome entier des oiseaux pourrait être renseigné afin d'identifier la principale source de contamination.





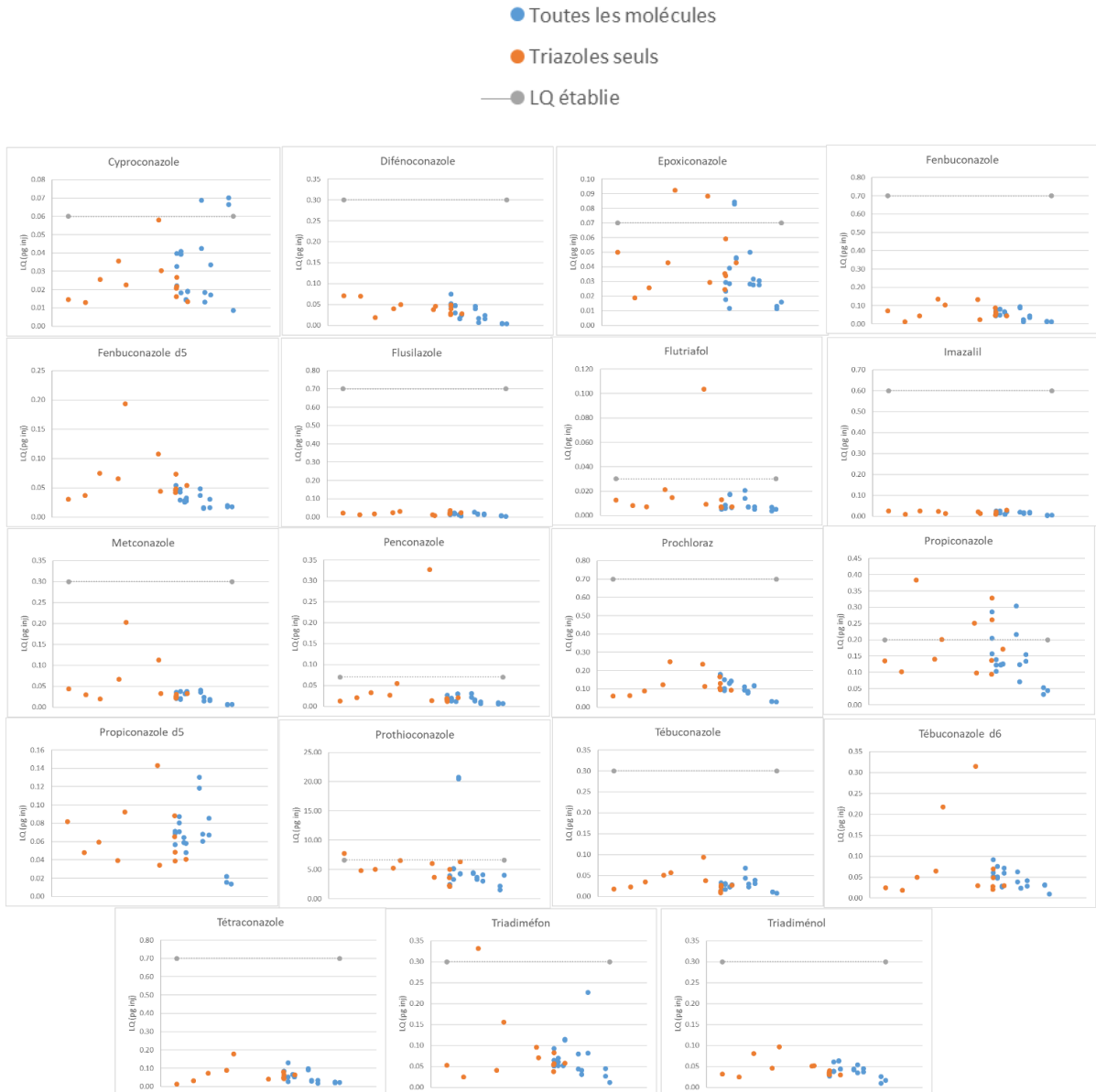
# Annexes

## Annexe 1 : Légende des tableaux de propriétés physico-chimiques des molécules

Propriétés physico-chimiques	log Kow = log P	< 2,7 : Faible accumulation	Constante de Henry volatilité (Pa.m <sup>3</sup> /mol)	< 2,5.10 <sup>-7</sup> : non volatile
		2,7-3 : accumulation modérée		2,5.10 <sup>-7</sup> -2,5.10 <sup>-5</sup> : volatilité moyenne
		> 3 : accumulation élevée		> 2,5.10 <sup>-5</sup> : volatile
Propriétés physico-chimiques	solubilité aqueuse à 20 °C (mg/L)	< 50 : faible	Pression de vapeur à 20°C (mPa)	< 5 : faible volatilité
		50-500 : modérée		5-10 : volatilité moyenne
		> 500 : élevée		> 10 : volatilité élevée
Réactivité	DT50 = t1/2 typique à 20°C aérobic dégradation sol (jours)	< 30 : non persistant	hydrolyse aqueuse DT50 à 20°C et pH7 (jours)	< 30 : non persistant
		30-100 : modérément persistant		30-100 : modérément persistant
		100-365 : persistant		100-365 : persistant
		> 365 : très persistant		> 365 : persistant
Réactivité	Photolyse aqueuse DT50 à 20°C et pH7 (jours)	< 1 : rapide	DT50 air (h)	< 48 h : non persistant
		1-14 : modérément rapide		> 48 h : persistant
		14-30 : lente		
		> 30 : stable		
Ecotoxicologie	BCF = Facteur de Bio-concentration (L/kg)	< 100 : faible potentiel	DL50 par voie orale oiseau (mg/kg)	< 100 : élevée
		100-5000 : modérée		100-2000 : modérée
		> 5000 : fort potentiel		> 2000 : faible
Ecotoxicologie	NOEL oiseau (mg/kg p.c. jour)	Aucune échelle mentionnée		

Annexe 2 : Carte de contrôle LQ injection directe machine, LQ extrapolée en pg injectés suite à l'injection 2xLQ pour les azoles (a), les néonicotinoïdes (b) et les métabolites des néonicotinoïdes (c)

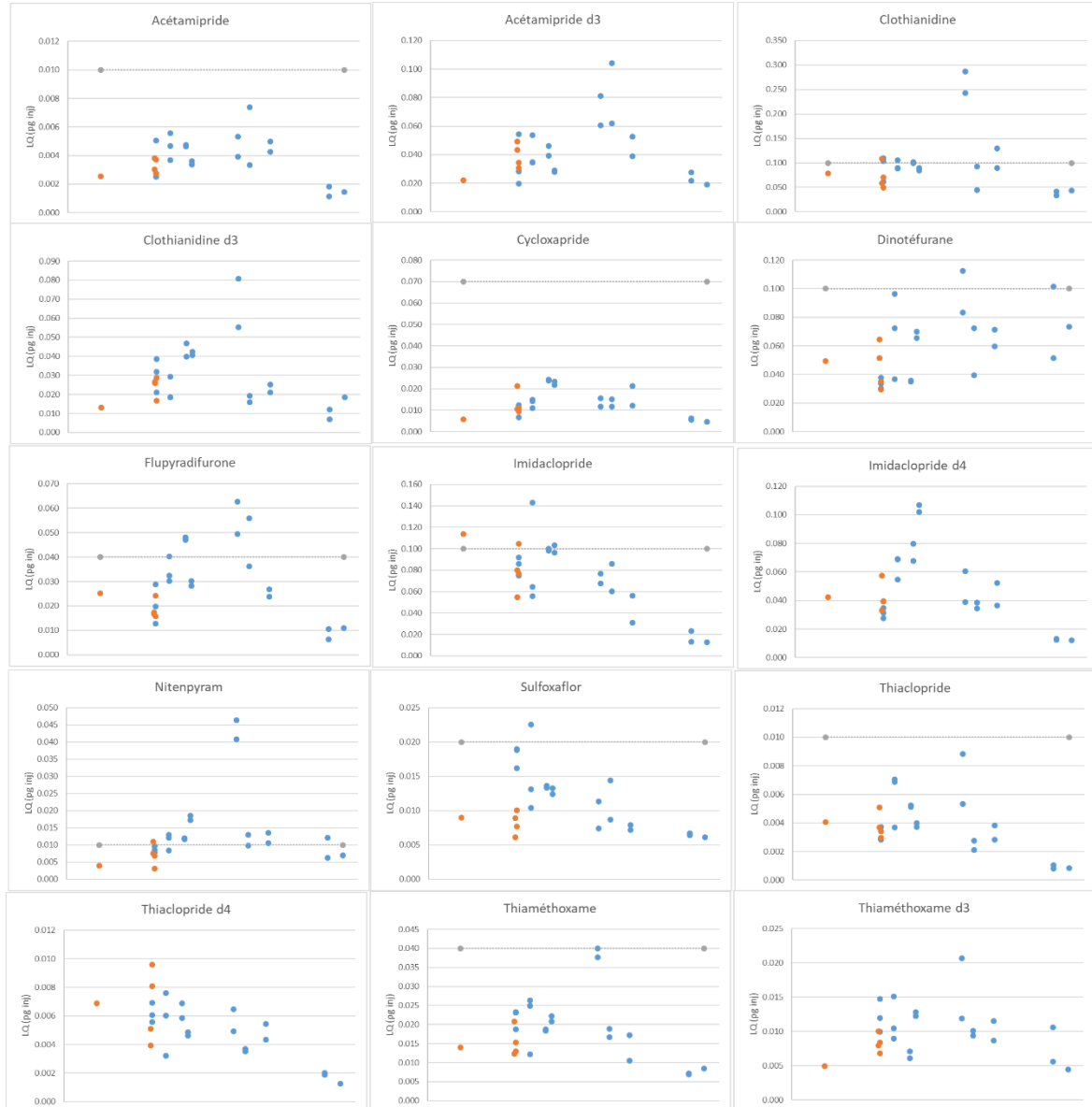
a) Azoles



b) Néonicotinoïdes

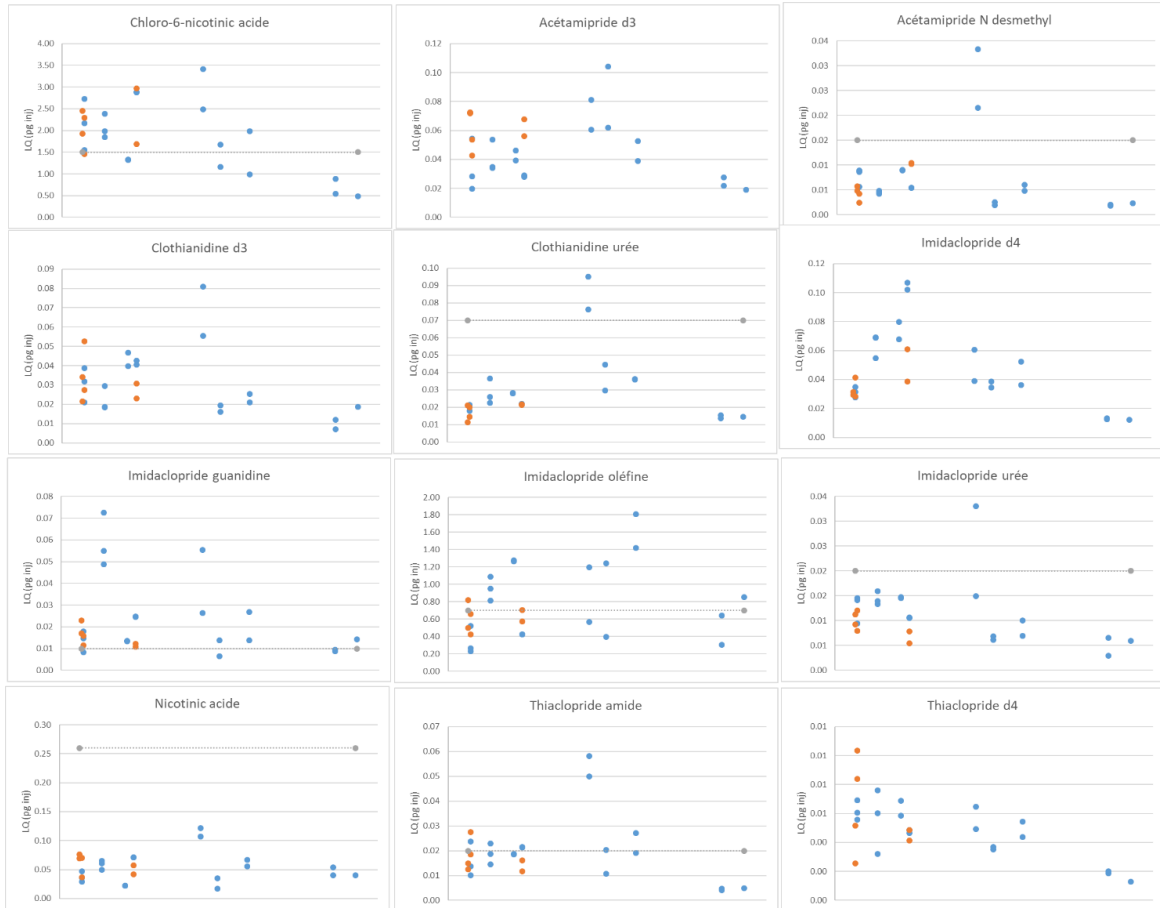
Légende :

- Toutes les molécules
- Néonicotinoïdes seuls
- LQ établie



c) Métabolites des néonicotinoïdes

Légende :  
 ● Toutes les molécules  
 ● Métabolites néonicotinoïdes seuls  
 —● LQ établie



Annexes

Annexe 3 : Carte de contrôle Ki et rendement Ci (%) en injection directe suite à l'injection 2xLQ

	20/05/2020		08/06/2020		30/06/2020		08/07/2020		09/09/2020		25/09/2020		23/10/2020		12/01/2021		02/02/2021	
	Ki	Ci (%)	Ki	Ci (%)	Ki	Ci (%)	Ki	Ci (%)	Ki	Ci (%)	Ki	Ci (%)	Ki	Ci (%)	Ki	Ci (%)	Ki	Ci (%)
Chloro-6-nicotinique acide	47.9	85%	51.1	117%	52.2	87%	58.5	83%	47.9	85%	49.9	112%	42.2	96%	31.1	99%	33.4	125%
Acétamipride	1.0	90%	1.0	100%	1.1	87%	0.9	86%	1.1	90%	1.0	89%	1.1	93%	1.0	101%	1.0	95%
Acétamipride d3	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%
Acétamipride N desmethyl	1.2	110%	1.0	93%	1.0	90%	1.0	78%	1.4	98%	1.0	110%	1.2	91%	0.9	96%	1.0	96%
Clothianidine	1.1	98%	1.0	95%	1.0	75%	1.0	90%	1.1	89%	1.2	122%	1.2	112%	1.1	97%	1.1	95%
Clothianidine d3	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%
Clothianidine urée	0.5	100%	0.5	98%	0.5	91%	0.5	79%	0.6	100%	0.6	102%	0.6	115%	0.5	103%	0.6	96%
Cyclozapride	1.2	83%	1.2	101%	1.0	91%	1.4	100%	1.0	101%	1.8	128%	1.2	94%	1.0	93%	1.0	100%
Cyproconazole	0.7	103%	0.7	95%	0.7	87%	0.8	102%	0.7	99%	0.7	112%	0.8	104%	0.7	101%	0.9	117%
Difénoconazole	0.7	91%	0.7	87%	0.7	82%	0.8	104%	0.9	110%	0.7	102%	0.7	96%	0.7	104%	0.7	101%
Dinotéfurane	0.4	98%	0.5	100%	0.5	101%	0.5	93%	0.5	101%	0.5	102%	0.5	98%	0.5	95%	0.5	99%
Epoxiconazole	0.7	72%	0.8	84%	0.7	92%	1.0	105%	0.9	139%	0.8	117%	0.9	98%	0.8	88%	0.8	103%
Fenbuconazole	1.2	87%	1.3	99%	1.2	94%	1.6	102%	1.3	97%	1.2	100%	1.3	85%	1.3	106%	1.2	96%
Fenbuconazole d5	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%
Flupyradifurone	4.6	96%	4.6	102%	4.7	102%	4.7	88%	3.7	96%	4.5	107%	4.6	106%	3.7	97%	3.8	99%
Flusilazole	0.5	86%	0.5	86%	0.5	98%	0.5	95%	0.6	84%	0.5	106%	0.6	102%	0.7	104%	0.5	91%
Flutriafol	0.8	84%	0.8	89%	0.9	84%	1.0	113%	0.9	103%	0.9	106%	0.9	95%	0.7	99%	0.9	104%
Imazalil	0.4	101%	0.3	102%	0.4	82%	0.5	114%	0.3	66%	0.5	101%	0.5	101%	0.3	99%	0.4	103%
Imidaclopride	1.0	92%	1.0	101%	0.9	104%	1.0	82%	0.9	101%	0.9	89%	1.1	116%	0.9	97%	0.9	105%
Imidaclopride d4	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%
Imidaclopride guanidine	0.7	158%	0.7	134%	1.0	73%	0.9	104%	1.0	58%	0.9	94%	0.7	69%	0.7	108%	0.9	102%
Imidaclopride oléfine	26.3	85%	51.8	133%	51.5	106%	39.4	68%	25.3	104%	42.7	91%	40.8	80%	51.4	89%	69.8	112%
Imidaclopride urée	0.3	97%	0.3	103%	0.3	96%	0.3	86%	0.3	90%	0.3	86%	0.3	86%	0.3	103%	0.3	108%
Metconazole	0.9	110%	0.8	88%	0.8	90%	1.0	110%	0.9	113%	0.8	105%	0.9	89%	0.8	95%	0.8	95%
Nicotinique acide	0.5	92%	0.3	123%	0.3	46%	0.9	132%	1.6	64%	0.9	146%	2.2	106%	1.0	110%	1.2	129%
Nitenpyrame	0.3	82%	0.3	82%	0.3	100%	0.3	82%	0.3	103%	0.3	97%	0.3	95%	0.3	109%	0.3	101%
Penconazole	0.7	83%	0.7	85%	0.7	81%	0.8	114%	0.8	96%	0.7	110%	0.7	104%	0.7	87%	0.8	101%
Prochloraze	0.9	106%	0.9	78%	0.9	90%	1.0	117%	1.1	102%	0.9	115%	0.9	82%	0.7	99%	0.8	101%
Propiconazole	2.2	106%	2.0	91%	2.1	92%	2.3	102%	2.2	112%	2.0	123%	2.1	100%	1.8	91%	2.0	100%
Propiconazole d5	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%
Prothioconazole	43.6	91%	187.3	93%	44.9	346%	83.0	100%	60.5	106%	56.6	84%	76.3	92%	78.6	124%	128.7	84%
Sulfoxaflor	1.2	90%	1.1	94%	1.2	89%	1.1	95%	1.2	93%	1.0	96%	1.0	88%	1.0	100%	1.1	98%
Tébuconazole	0.9	81%	0.8	91%	0.8	82%	1.1	130%	0.9	97%	0.9	127%	0.9	101%	0.8	108%	0.8	99%
Tébuconazole d6	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%
Tétraconazole	2.5	108%	2.4	80%	1.9	87%	3.4	135%	2.0	76%	2.4	104%	3.0	109%	2.0	95%	2.3	107%
Thiaclopride	0.9	102%	0.8	90%	0.8	98%	0.8	84%	0.8	100%	0.8	94%	0.9	115%	0.7	98%	0.8	100%
Thiaclopride amide	3.6	95%	3.6	86%	3.1	103%	3.8	96%	3.2	98%	3.4	98%	3.3	84%	3.0	104%	3.2	97%
Thiaclopride d4	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%
Thiaméthoxame	1.4	97%	1.4	95%	1.4	97%	1.4	92%	1.6	109%	1.4	106%	1.5	94%	1.3	96%	1.2	107%
Thiaméthoxame d3	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%	1.0	100%
Triadiméfon	1.8	87%	1.8	81%	1.8	95%	1.8	94%	1.4	90%	1.8	109%	1.9	119%	1.8	98%	1.7	95%
Triadiménol	3.5	89%	3.6	86%	3.6	85%	4.1	109%	3.3	98%	3.7	112%	3.7	95%	3.4	99%	4.0	96%

Annexe 4 : Données brutes des concentrations pour les trois sites où les mousses PUF ont été appliquées : (a) pour le site n°4 forestier, (b) pour le site n°6 viticole puis (c) pour le site n°7 viticole en azoles (i), néonicotinoïdes (ii)

### Légende

	Concentration supérieure à la LQ
	Concentration inférieure à la LQ mais tous les critères validés : concentrations à garder uniquement pour la thèse et à supprimer de la publication
*	Rendement d'extraction et de quantification du difénoconazole à 57 % (n = 3)

#### a) Site n°4 forestier i. Azoles

Concentration site n°4 forestier (ng/PUF)									
	Septembre (S)	Octobre (O)	Novembre (N)	Décembre/Janvier (D/J)	Janvier/Février (J/F)	Février/Mars (F/M)	Mars/Avril (M/A)	Avril/Mai (A/M)	Juin (J)
Date de dépôt	05/09/2016	06/10/2016	08/11/2016	09/12/2016	13/01/2017	15/02/2017	14/03/2017	14/04/2017	02/06/2017
Date retiré	06/10/2016	08/11/2016	09/12/2016	13/01/2017	15/02/2017	14/03/2017	14/04/2017	02/06/2017	14/07/2017
Durée d'exposition (jours)	32	34	32	36	34	28	32	50	43
Bitertanol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Bromuconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cyproconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	5,17	< LQ
Difénoconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Epoxiconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	9,05	< LQ
Fenbuconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Flusilazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Flutriafol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Imazalil	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Ipconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Metconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	2,87	< LQ
Myclobutanil	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Penconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Prochloraze	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Propiconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	3,06	< LQ
Tébuconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	2,1	17,08	4,88
Tétraconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,99
Triadiméfon	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Triadiménol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Triticonazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

## ii. Néonicotinoïdes

	Concentration site n°4 forestier (ng/PUF)								
	Septembre (S)	Octobre (O)	Novembre (N)	Décembre/Janvier (D/J)	Janvier/Février (J/F)	Février/Mars (F/M)	Mars/Avril (M/A)	Avril/Mai (A/M)	Juin (J)
Date de dépôt	05/09/2016	06/10/2016	08/11/2016	09/12/2016	13/01/2017	15/02/2017	14/03/2017	14/04/2017	02/06/2017
Date retiré	06/10/2016	08/11/2016	09/12/2016	13/01/2017	15/02/2017	14/03/2017	14/04/2017	02/06/2017	14/07/2017
Durée d'exposition (jours)	32	34	32	36	34	28	32	50	43
Acétamipride	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,03	< LQ	< LQ	0,08
Clothianidine	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cycloxapride	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Dinotéfurane	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Flupyradifurone	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Imidaclopride	< LQ	2,76	0,61	< LQ	< LQ	< LQ	2,61	< LQ	< LQ
Nitenpyrame	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Sulfoxaflor	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Thiaclopride	< LQ	0,05	0,19	< LQ	< LQ	< LQ	0,28	< LQ	< LQ
Thiaméthoxame	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ



b) Site n°6 viticole  
i. Azoles

	Concentration site n°6 viticole (ng/PUF)								
	Septembre (S)	Octobre (O)	Novembre (N)	Décembre/Janvier (D/J)	Janvier/Février (J/F)	Février/Mars (F/M)	Mars/Avril (M/A)	Avril/Mai (A/M)	Juin (J)
Date de dépôt	05/09/2016	06/10/2016	08/11/2016	09/12/2016	12/01/2017	15/02/2017	14/03/2017	13/04/2017	02/06/2017
Date retiré	06/10/2016	08/11/2016	09/12/2016	12/01/2017	15/02/2017	14/03/2017	13/04/2017	02/06/2017	07/07/2017
Durée d'exposition (jours)	32	34	32	35	35	28	31	51	36
Bitertanol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Bromuconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cyproconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	3,65	4,35	< LQ
Difénoconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	38,47 *
Epoxiconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	13,35	< LQ
Fenbuconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	6,22	140,22
Flusilazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Flutriafol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Imazalil	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Ipconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Metconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	3,93	< LQ
Myclobutanil	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,11	7,91
Penconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	58,66
Prochloraze	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Propiconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	3,06	< LQ
Tébuconazole	0,39	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	75,07	107,52
Tétraconazole	1,52	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	66,47	100,68
Triadiméfon	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Triadiménol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Triticonazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

## ii. Néonicotinoïdes

	Concentration site n°6 viticole (ng/PUF)								
	Septembre (S)	Octobre (O)	Novembre (N)	Décembre/Janvier (D/J)	Janvier/Février (J/F)	Février/Mars (F/M)	Mars/Avril (M/A)	Avril/Mai (A/M)	Juin (J)
Date de dépôt	05/09/2016	06/10/2016	08/11/2016	09/12/2016	12/01/2017	15/02/2017	14/03/2017	13/04/2017	02/06/2017
Date retiré	06/10/2016	08/11/2016	09/12/2016	12/01/2017	15/02/2017	14/03/2017	13/04/2017	02/06/2017	07/07/2017
Durée d'exposition (jours)	32	34	32	35	35	28	31	51	36
Acétamipride	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,11	0,33	0,16
Clothianidine	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cycloxapride	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Dinotéfurane	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Flupyradifurone	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Imidaclopride	< LQ	1,43	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Nitenpyrame	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Sulfoxaflor	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Thiaclopride	< LQ	< LQ	0,09	< LQ	< LQ	< LQ	0,37	0,4	0,12
Thiaméthoxame	< LQ	0,25	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	7,75

c) Site n°7 viticole  
i. Azoles

	Concentration site n°7 viticole (ng/PUF)								
	Septembre (S)	Octobre (O)	Novembre (N)	Décembre/Janvier (D/J)	Janvier/Février (J/F)	Février/Mars (F/M)	Mars/Avril (M/A)	Avril/Mai (A/M)	Juin (J)
Date de dépôt	05/09/2016	06/10/2016	08/11/2016	09/12/2016	12/01/2017	15/02/2017	14/03/2017	13/04/2017	02/06/2017
Date retiré	06/10/2016	08/11/2016	09/12/2016	12/01/2017	15/02/2017	14/03/2017	13/04/2017	02/06/2017	07/07/2017
Durée d'exposition (jours)	32	34	32	35	35	28	31	51	36
Bitertanol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Bromuconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cyproconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Difénoconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Epoxiconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Fenbuconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	25,27	141,47
Flusilazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Flutriafol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Imazalil	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Ipconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Metconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,36	1,39	< LQ
Myclobutanil	0,37	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,67	6,07
Penconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Prochloraze	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Propiconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Tébuconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,30	43,29	12,99
Tétraconazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	80,92	24,44
Triadiméfon	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Triadiménol	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Triticonazole	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

## ii. Néonicotinoïdes

	Concentration site n°7 viticole (ng/PUF)								
	Septembre (S)	Octobre (O)	Novembre (N)	Décembre/Janvier (D/J)	Janvier/Février (J/F)	Février/Mars (F/M)	Mars/Avril (M/A)	Avril/Mai (A/M)	Juin (J)
Date de dépôt	05/09/2016	06/10/2016	08/11/2016	09/12/2016	12/01/2017	15/02/2017	14/03/2017	13/04/2017	02/06/2017
Date retiré	06/10/2016	08/11/2016	09/12/2016	12/01/2017	15/02/2017	14/03/2017	13/04/2017	02/06/2017	07/07/2017
Durée d'exposition (jours)	32	34	32	35	35	28	31	51	36
Acétamipride	0,03	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,10	0,17	< LQ
Clothianidine	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cycloxapride	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Dinotéfurane	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Flupyradifurone	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Imidaclopride	< LQ	1,60	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Nitenpyrame	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Sulfoxaflor	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Thiaclopride	0,02	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,72	0,92	< LQ
Thiaméthoxame	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	14,54

Annexes

Annexe 5 : Données brutes des concentrations dans le plasma de merles noirs en 2016 (a) et 2019 (b) pour les azoles (i), néonicotinoïdes et leurs métabolites (ii)

**Légende**

? Information de l'échantillon non communiquée
N.A. : non analysé
Tous les critères qualités vérifiés
Concentrations entre LD et LQ et critères qualités validés
Concentrations entre LD échantillon et LQ échantillon et tous les critères qualités validés

a) Merles noirs 2016  
i. Azoles

N°	Type site	N° site	Date	Sexe Age	Concentrations azoles (pg/g plasma)																		
					Cyproconazole	Difenoconazole	Epoxiconazole	Fenbuconazole	Flusilazole	Flutriafol	Imazalil	Metconazole	Penconazole	Prochloraz	Propiconazole	Prothioconazole	Tébuconazole	Tétraconazole	Triadimefon	Triadimenol			
30	F	4	31/03/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
15	F	4	04/04/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
9	F	4	19/04/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
6	F	4	27/04/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
28	F	4	27/04/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
43	F	4	27/04/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
13	F	4	29/04/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
14	F	4	29/04/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
19	F	4	29/04/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
47	F	4	29/04/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
49	F	4	29/04/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
50	F	4	29/04/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
17	F	4	04/05/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
25	F	4	04/05/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
32	F	4	04/05/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	281,3	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
34	F	4	04/05/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
1	F	4	25/06/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	35,3	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	62,7	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
4	F	4	25/06/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	48,6	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	63,0	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
24	F	4	29/06/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
65	F	4	08/07/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
66	F	4	08/07/2016	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	276,8	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
67	F	4	08/07/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
68	F	4	08/07/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
69	F	4	08/07/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	84,2	<LQ	<LQ	<LQ
70	F	4	08/07/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	180,2	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ



Annexes

91	V'	6	06/07/2016	J	<LQ	13,1	<LQ	43,5	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	560,8	<LQ	<LQ	
86	V'	6	20/07/2016	J	<LQ	120,0	<LQ	200,2	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	79,5	59976,5	<LQ	<LQ
87	V'	6	20/07/2016	J	<LQ	10,0	<LQ	945,0	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	294,5	<LQ	<LQ
88	V'	6	20/07/2016	J	<LQ	24,4	<LQ	528,1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	75,8	149,9	<LQ	<LQ
90	V'	6	26/07/2016	J	<LQ	18,0	<LQ	338,8	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	235,1	<LQ	<LQ	

ii. Néonicotinoïdes et leurs métabolites

N°	Type site	N° site	Date	Sexe Age	Concentrations néonicotinoïdes (pg/g plasma)										Concentrations néonicotinoïdes métabolites (pg/g plasma)			
					Acétamipride	Clothianidine	Cycloxypride	Dinotéfurane	Flupyradifurone	Imidaclopride	Nitenpyrame	Sulfoxaflor	Thiaclopride	Thiaméthoxame	Acétamipride de n desmethyl	Clothianidine urée	Imidaclopride urée	Thiaclopride amide
24	F	4	29/06/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
69	F	4	08/07/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
63	U	5	05/07/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
94	U	5	29/07/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
27	V	6	12/04/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
20	V	6	04/05/2016	F	<LQ	334,7	<LQ	<LQ	<LQ	74,2	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
2	V	6	13/05/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
16	V	6	17/05/2016	M	<LQ	123,9	<LQ	<LQ	<LQ	19,6	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
5	V	6	20/06/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
18	V	6	20/06/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	179,3	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	18,0	<LQ
21	V	6	20/06/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	26,0	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
3	V	6	30/06/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
22	V	6	30/06/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
23	V	6	30/06/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	13,7
54	V	6	30/06/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	202,2	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
58	V	6	30/06/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
91	V'	6	06/07/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
86	V'	6	20/07/2016	J	<LQ	87,7	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	21,2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
87	V'	6	20/07/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	7,9	<LQ	<LQ	<LQ
88	V'	6	20/07/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	15,3	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
90	V'	6	26/07/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	20,4	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ





Annexes

136	V	6	19/07/2019	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	299,5	<LQ	<LQ	
139	V	6	24/07/2019	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	152,0	<LQ	<LQ	
140	V	6	24/07/2019	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	8341,4	<LQ	<LQ	
141	V	6	25/07/2019	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	63,0	<LQ	<LQ	
142	V	6	25/07/2019	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3113,9	<LQ	<LQ	
143	V	6	25/07/2019	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	27,1	2071,0	<LQ	<LQ

ii. Néonicotinoïdes et leurs métabolites

N°	Type site	N° site	Date	Sexe Age	Concentrations néonicotinoïdes (pg/g plasma)											Concentrations néonicotinoïdes métabolites (pg/g plasma)			
					Acétamipride	Clothianidine	Cycloxaipride	Dinotéfurane	Flupyradiurone	Imidaclopride	Nitenpyrame	Sulfoxaflor	Thiaclopride	Thiaméthoxame	Acétamipride n desmethyl	Clothianidine urée	Imidaclopride urée	Thiaclopride amide	
11	V	6	24/04/2019	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	56,3	<LQ	<LQ	<LQ
12	V	6	24/04/2019	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
37	V	6	10/05/2019	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
47	V	6	15/05/2019	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
57	V	6	24/05/2019	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
69	V	6	03/06/2019	M	<LQ	562,9	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
86	V	6	17/06/2019	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,3	<LQ	<LQ	<LQ
95	V	6	20/06/2019	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	62,6	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
118	V	6	08/07/2019	J	<LQ	171,2	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	354,6	<LQ	<LQ
127	V	6	16/07/2019	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
134	V	6	19/07/2019	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
135	V	6	19/07/2019	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
136	V	6	19/07/2019	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
141	V	6	25/07/2019	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
143	V	6	25/07/2019	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	

## Annexe 6 : Données brutes des concentrations dans le plasma de mésanges charbonnières en azoles de l'année 2019

## Légende

Tous les critères qualités vérifiés
* Critère TC/TQ non validé : valeur non comprise dans les 60 % de la valeur de référence
** Critère TC/TQ non validé : TC absente
Concentrations entre LD et LQ (pg/g plasma)

N°	Type Site	N° site	Date	Age Sexe	Concentrations azoles (pg/g plasma)															
					Cyproc onazole	Difénoco nazole	Epoxicon azole	Fenbuco nazole	Flusilaz ole	Flutri afol	Imaz alil	Metcon azole	Pencon azole	Prochlo raze	Propicon azole	Tébucon azole	Tétracon azole	Triadi méfon	Triadim émol	
105	F	4	25/06/2019	J	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	17,1 *	<LD	<LD
107	F	4	25/06/2019	J	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	22,5 *	<LD	<LD
184	F	4	15/07/2019	J	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	130,9	<LD	<LD	<LD	<LD
187	F	4	15/07/2019	J	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
201	F	4	17/07/2019	J	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	11,1 *	<LD	<LD
203	F	4	17/07/2019	J	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	109,8	<LD	<LD	<LD
234	F	4	23/07/2019	J	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	9,2 *	<LD	<LD
236	F	4	23/07/2019	J	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
109	V	6	26/06/2019	J	<LD	10,4	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	13,9 *	64,3 *	<LD	<LD
110	V	6	26/06/2019	J	<LD	22,6	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	48,5	<LD	<LD
134	V	6	03/07/2019	J	<LD	12,3	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	240,7	<LD	<LD
135	V	6	03/07/2019	J	<LD	7,9	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	411,6	<LD	<LD
136	V	6	03/07/2019	J	<LD	32,4	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	26,9 *	199,2	<LD	<LD
138	V	6	03/07/2019	J	<LD	66,1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	31,5 *	174,3	<LD	<LD
146	V	6	08/07/2019	J	<LD	4,7	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	71,6 *	24,2 *	22,7	<LD	<LD
147	V	6	08/07/2019	J	<LD	33,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	174,0	219,4	207,8	<LD	<LD
155	V	6	12/07/2019	J	<LD	<LD	<LD	35,0	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	66,5	<LD	<LD
157	V	6	12/07/2019	J	<LD	<LD	<LD	30,8	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	41,8 *	<LD	<LD
193	V	6	16/07/2019	J	<LD	7,8 **	<LD	<LD	10,8	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	12,7 *	139,4	<LD	<LD
194	V	6	16/07/2019	J	<LD	9,1 **	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	8,4	<LD	<LD	34,2	<LD	<LD	<LD	<LD
210	V	6	19/07/2019	J	<LD	<LD	<LD	67,6	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	13,1 **	1019,4	<LD	<LD
208	V	6	19/07/2019	J	<LD	5,0 **	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
242	V	6	24/07/2019	J	<LD	8,6	<LD	11,4 **	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	14,8 *	85,1	<LD	<LD
244	V	6	24/07/2019	J	<LD	3,7 **	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	20,6 *	320,8	<LD	<LD
257	V	6	25/07/2019	J	<LD	7,9 **	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	58,5	<LD	<LD	<LD	<LD
258	V	6	25/07/2019	J	<LD	3,4 **	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	21,5 *	40,7	<LD	<LD

Annexe 7 : Données brutes des concentrations dans le plasma de cigognes blanches en azoles (i), néonicotinoïdes et leurs métabolites (ii) de l'année 2019

## Légende

? Information de l'échantillon non communiquée
N.A. : non analysé
Tous les critères qualités vérifiés
Concentrations entre LD et LQ et critères qualités validés
Concentrations entre LD échantillon et LQ échantillon et tous les critères qualités validés

## i. Azoles

N°	Zone	N° site	Localité du nid	Date	Age Sexe	Concentrations azoles (pg/g plasma)													
						Cypr oconazole	Difenc onazole	Epoxico nazole	Fenbuc onazole	Flusilazole	Flutri afol	Imaz alil	Metco nazole	Penco nazole	Proch loraze	Propico nazole	Tébuco nazole	Tétrac onazole	Triadi menol
1	B	8	Gripperie-Saint-Symphorien	23/05/2019	J / F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
2	B	8	Saint-Just-Luzac	23/05/2019	J / M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
3	B	8	Hiers-Brouage	23/05/2019	J / M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
4	B	8	Hiers-Brouage	23/05/2019	J / M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
5	B	8	Hiers-Brouage	23/05/2019	J / F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
6	B	8	Beaugeay	30/05/2019	J / M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
7	B	8	Hiers-Brouage	30/05/2019	J / F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
8	B	8	Hiers-Brouage	30/05/2019	J / M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
9	B	8	Coulonges	04/06/2019	J / M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
10	B	8	Saint-Jean-D'Angle	04/06/2019	J / M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
11	B	8	Hiers-Brouage	04/06/2019	J / M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
12	EG	9	Meshers-Sur-Gironde	16/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
13	EG	9	Saint-Romain-Sur-Gironde	21/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
14	EG	9	Saint-Dizant-Du-Gua	21/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
15	EG	9	Saint-Dizant-Du-Gua	21/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
16	EG	9	Meshers-Sur-Gironde	21/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
17	EG	9	Saint-Dizant-Du-Gua	29/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
18	EG	9	Saint-Dizant-Du-Gua	29/05/2019	?	<LQ	5,5	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
19	EG	9	Saint-Sorlin-De-Conac	29/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	8,0	<LQ
20	EG	9	Talmont	29/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
21	EG	9	Chenac-Saint-Serin-D'Uzet	30/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	398,6	<LQ
22	EG	9	Royan	31/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
23	EG	9	Saint-Sorlin-De-Conac	01/06/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
24	EG	9	Mortagne-Sur-Gironde	03/06/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
25	EG	9	Mortagne-Sur-Gironde	03/06/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
26	EG	9	Royan	08/06/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
27	EG	9	Arces-Sur-Gironde	08/06/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	29,0	<LQ	<LQ

Annexes

28	E G	9	Arces-Sur-Gironde	08/06/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
29	E G	9	Saint-Dizant-Du-Gua	08/06/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	26,5	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	19,6	74,6	<LQ
30	E G	9	Saint-Dizant-Du-Gua	08/06/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	55,9	53,8	<LQ
31	E G	9	Saint-Dizant-Du-Gua	08/06/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	24,8	35,4	<LQ

ii. Néonicotinoïdes et leurs métabolites

N°	Zone	N° site	Localité du nid	Date	Age Sexe	Concentrations néonicotinoïdes (pg/g plasma)										Concentrations métabolites néonicotinoïdes (pg/g plasma)				
						Acéta miprid e	Clothi ani dine	Cycloxa p ride	Dinoté furane	Flupyrad ifurone	Imidaclo pride	Nitenpyr am	Sulfox afflor	Thiacl opride	Thiam éthoxa me	Acétamipri de n desmethyl	Clothi amidin e urée	Imidaclo opride urée	Thiacl opride amide	
1	B	8	Gripperie-Saint-Symphorien	23/05/2019	J / F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
2	B	8	Saint-Just-Luzac	23/05/2019	J / M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
3	B	8	Hiers-Brouage	23/05/2019	J / M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
4	B	8	Hiers-Brouage	23/05/2019	J / M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
5	B	8	Hiers-Brouage	23/05/2019	J / F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
6	B	8	Beaugeay	30/05/2019	J / M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
7	B	8	Hiers-Brouage	30/05/2019	J / F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
8	B	8	Hiers-Brouage	30/05/2019	J / M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
9	B	8	Coulonges	04/06/2019	J / M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
10	B	8	Saint-Jean-D'Angle	04/06/2019	J / M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
11	B	8	Hiers-Brouage	04/06/2019	J / M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
12	E G	9	Meshers-Sur-Gironde	16/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
13	E G	9	Saint-Romain-Sur-Gironde	21/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
14	E G	9	Saint-Dizant-Du-Gua	21/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
15	E G	9	Saint-Dizant-Du-Gua	21/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
16	E G	9	Meshers-Sur-Gironde	21/05/2019	?	<LQ	22,1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
17	E G	9	Saint-Dizant-Du-Gua	29/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
18	E G	9	Saint-Dizant-Du-Gua	29/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
19	E G	9	Saint-Sorlin-De-Conac	29/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
20	E G	9	Talmont	29/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
21	E G	9	Chenac-Saint-Serin-D'Uzet	30/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
22	E G	9	Saint-Thomas-De-Cognac	31/05/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3,2	<LQ	<LQ	<LQ
23	E G	9	Saint-Sorlin-De-Conac	01/06/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
24	E G	9	Mortagne-Sur-Gironde	03/06/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
25	E G	9	Mortagne-Sur-Gironde	03/06/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
26	E G	9	Royan	08/06/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
27	E G	9	Arces-Sur-Gironde	08/06/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
28	E G	9	Arces-Sur-Gironde	08/06/2019	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
29	E G	9	Saint-Dizant-Du-Gua	08/06/2019	?	<LQ	580,4	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
30	E G	9	Saint-Dizant-Du-Gua	08/06/2019	?	<LQ	719,2	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
31	E G	9	Saint-Dizant-Du-Gua	08/06/2019	?	<LQ	604,7	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

Annexe 8 : Données brutes des concentrations dans le plasma de goélands (argentés, bruns et marins) en azoles (i), néonicotinoïdes et leurs métabolites (ii) des années 2016 à 2020

## Légende

? Information de l'échantillon non communiquée
N.A. : non analysé
Tous les critères qualités vérifiés
Concentrations entre LD et LQ et critères qualités validés
Concentrations entre LD échantillon et LQ échantillon et tous les critères qualités validés

## i. Azoles

N°	Espèce	Année	Date	Age	Sexe	GPS	Concentrations azoles (pg/g plasma)																	
							Cypr ocona zole	Difén ocona zole	Epoxi conaz ole	Fenb ucona zole	Flusil azole	Flutri afol	Imaza lil	Metco nazol e	Penco nazol e	Proch loraze	Propico nazole	Proth iocon azole	Tébu conaz ole	Tétra conaz ole	Triadi mefon	Triadi dime nol		
GBA-17-01	Goélands Bruns (GB)	2017	17/05/17	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
GBA-17-06			22/05/17	M	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-17-07			07/06/17	M	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-17-08			07/06/17	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-17-09			07/06/17	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-17-10			07/06/17	M	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-17-11			07/06/17	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-17-13			07/06/17	M	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-17-14			07/06/17	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-17-15			07/06/17	M	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-18-01			2018	16/05/18	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-18-04				16/05/18	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-18-06				23/05/18	M	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-18-07				23/05/18	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-18-08				23/05/18	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-18-10	23/05/18	M		Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
GBA-18-12	23/05/18	M		Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
GBA-18-13	23/05/18	M		Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
GBA-18-14	28/05/18	M		Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
GBA-18-15	28/05/18	M		Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		

Annexes

GMA-18-01	Goélands Marins (GM)	2018	11/05/18	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
GMA-18-02			11/05/18	M	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GMA-18-03			11/05/18	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GMA-18-04			11/05/18	M	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GMA-18-05			11/05/18	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GMA-18-06			11/05/18	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GMA-18-07			16/05/18	M	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GMA-18-08			16/05/18	M	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

ii. Néonicotinoïdes et leurs métabolites

N°	Espèce	Année	Date	Age Sexe	GPS	Concentrations néonicotinoïdes (pg/g plasma)										Concentrations métabolites néonicotinoïdes (pg/g plasma)						
						Acéta mipri de	Clothia nidine	Cyclo xapri de	Dinot éfura ne	Flupyra difuron e	Imida clopri de	Niten pyra me	Sulfo xaflor	Thiac loprid e	Thiamé thoxam e	Acétamipri de N desmethyl	Clothia nidine urée	Imidacl opride urée	Thiaclo pride urée			
GAA-16-01	Goélands Argentés (GA)	2016	11/05/16	F	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
GAA-16-03			11/05/16	F	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GAA-16-04			01/06/16	F	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GAA-16-05			02/06/16	M	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GAA-16-07			02/06/16	M	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	7,0	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GAA-16-10			02/06/16	M	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3,6	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GAA-17-01		2017	17/05/17	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	5,2	
GAA-17-02			17/05/17	M	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	61,0	<LQ	16,0	<LQ	<LQ	18,0		
GAA-17-03			17/05/17	M	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
GAA-17-09			22/05/17	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
GAA-17-12			22/05/17	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
GAA-17-14			22/05/17	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
GAA-18-01		2018	16/05/18	M	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
GAA-18-03			16/05/18	F	Oui	<LQ	37,1	<LQ	<LQ	<LQ	88,9	<LQ	<LQ	3,5	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
GAA-18-04			23/05/18	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
GAA-18-06			23/05/18	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
GAA-18-07			28/05/18	M	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
GAA-18-09			28/05/18	M	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
GAA-19-01		2019	13/05/19	M	Non	<LQ	667,0	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	6,0	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
GAA-19-02			13/05/19	M	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
GAA-19-03	13/05/19		M	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
GAA-19-04	13/05/19		F	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
GAA-19-08	22/05/19		F	Non	<LQ	246,0	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
GAA-19-10	22/05/19		F	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
GAA-01-20	2020	26/05/20	?	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
GAA-02-20		26/05/20	?	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		



Annexes

GBA-01-20		2020	26/05/20	?	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
GBA-02-20			26/05/20	?	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
GBA-05-20			02/06/20	?	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-06-20			02/06/20	?	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-07-20			02/06/20	?	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-08-20			02/06/20	?	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
GBA-09-20			02/06/20	?	Non	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GMA-18-01			Goélands Marins (GM)	2018	11/05/18	F	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
GMA-18-02					11/05/18	M	Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.
GMA-18-03	11/05/18	F			Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
GMA-18-04	11/05/18	M			Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
GMA-18-05	11/05/18	F			Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
GMA-18-06	11/05/18	F			Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
GMA-18-07	16/05/18	M			Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
GMA-18-08	16/05/18	M			Oui	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	



Annexes

Annexe 9 : Données brutes des concentrations dans le plasma de crapauds épineux en azoles (i), néonicotinoïdes (ii) des années 2018 et 2019

i. Azoles

N°	Type site	N° site	Date	Age Sexe	Concentrations en azoles (pg/g plasma)																
					Cyproc onazole	Difénoconazole	Epoxiconazole	Fenbuconazole	Flusilazole	Flutriafol	Imazalil	Metconazole	Penconazole	Prochloraz	Propiconazole	Prothioconazole	Tébuconazole	Tétraconazole	Triadiméfon	Triadiméfol	
1	F	3	06/03/2018	Printemps 2018	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
2	F	3	06/03/2018		?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
3	F	3	06/03/2018		?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
4	F	3	06/03/2018		?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
5	GC	2	07/03/2018		?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
6	GC	2	07/03/2018		?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
7	GC	2	07/03/2018		?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
8	GC	2	07/03/2018		?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
9	GC	1	15/10/2019	Automne 2019	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
10	GC	1	15/10/2019		M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
11	GC	1	15/10/2019		M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
12	GC	1	15/10/2019		M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
13	GC	1	18/10/2019		M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
14	GC	1	06/11/2019		F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
15	GC	1	20/12/2019		F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
16	GC	1	06/11/2019		F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

## ii. Néonicotinoïdes

N°	Type site	N° site	Date	Age Sexe	Concentrations néonicotinoïdes (pg/g plasma)										
					Acétamipride	Clothianidine	Cycloxapride	Dinotéfurane	Imidaclopride	Nitenpyrame	Sulfoxaflor	Thiaclopride	Thiaméthoxame		
1	F	3	06/03/2018	Printemps 2018	?	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	
2	F	3	06/03/2018		?	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
3	F	3	06/03/2018		?	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
4	F	3	06/03/2018		?	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
5	GC	2	07/03/2018		?	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
6	GC	2	07/03/2018		?	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
7	GC	2	07/03/2018		?	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
8	GC	2	07/03/2018		?	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
9	GC	1	15/10/2019	Automne 2019	M	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	
10	GC	1	15/10/2019		M	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
11	GC	1	15/10/2019		M	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
12	GC	1	15/10/2019		M	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
13	GC	1	18/10/2019		M	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
14	GC	1	06/11/2019		F	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
15	GC	1	20/12/2019		F	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
16	GC	1	06/11/2019		F	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ



Annexes

56	V	6	30/06/2016	?	<LD	<LQ	<LQ	13,51	<LQ	21,05	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	10,06	2,31	<LQ	<LQ	511,26	59,66	<LQ	<LD	<LQ
57	V	6	30/06/2016	?	<LD	<LQ	0,52	7,12	11,49	30,20	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	69,89	54,59	0,29	<LQ	<LQ	491,59	45,01	<LQ	<LD	<LQ
58	V	6	30/06/2016	J	<LD	<LQ	<LQ	9,71	<LQ	111,33	1,13	<LQ	<LQ	<LQ	0,43	6,90	1,80	<LQ	<LQ	970,93	22,21	<LQ	<LD	<LQ
59	V	6	30/06/2016	J	<LD	<LQ	<LQ	8,03	3,06	10,17	1,80	<LQ	<LQ	<LQ	0,49	7,15	0,39	<LQ	<LQ	622,98	15,30	<LQ	<LD	<LQ
60	V	6	30/06/2016	?	<LD	<LQ	<LQ	172,17	2,82	124,42	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,72	15,83	0,49	<LQ	<LQ	396,65	70,91	<LQ	<LD	<LQ
61	V	6	30/06/2016	?	<LD	<LQ	<LQ	61,68	7,90	4,90	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,58	6,98	1,26	<LQ	<LQ	502,81	69,97	<LQ	<LD	<LQ
62	V	6	30/06/2016	J	<LD	<LQ	<LQ	19,21	<LQ	24,37	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,81	3,88	<LQ	<LQ	68,44	5,52	<LQ	<LD	<LQ
91	V	6	06/07/2016	J	<LD	<LQ	<LQ	300,44	<LQ	43,68	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	19,25	<LQ	<LQ	<LQ	33,80	52,00	<LQ	<LD	<LQ
86	V	6	20/07/2016	J	<LD	<LQ	<LQ	235,51	<LQ	280,83	<LQ	<LQ	0,44	<LQ	<LQ	480,57	<LQ	<LQ	<LQ	57,19	315,22	<LQ	<LD	<LQ
87	V	6	20/07/2016	J	<LD	<LQ	<LQ	5,37	<LQ	950,81	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	22,21	<LQ	<LQ	<LQ	485,34	56,42	<LQ	<LD	<LQ
88	V	6	20/07/2016	J	<LD	<LQ	<LQ	55,64	<LQ	332,66	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	57,82	0,62	<LQ	<LQ	1062,54	58,02	<LQ	<LD	<LQ
90	V	6	26/07/2016	J	<LD	<LQ	<LQ	101,64	<LQ	148,15	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	50,42	<LQ	<LQ	<LQ	109,14	128,38	<LQ	<LD	<LQ

ii. Néonicotinoïdes et leurs métabolites

N°	Type site	N° site	Date	Sexe Age	Concentration néonicotinoïdes (ng/g plumes)										Concentration néonicotinoïdes métabolites (ng/g plumes)								
					Acétami pride	Clothian idine	Cycloxa pride	Dinotéf urane	Flupyra difuron e	Imidaclopride	Nitenp yrame	Sulfox afflor	Thiaclo pride	Thiamét hoxame	6-Chloro nicotinique acide	Acétamipr ide N desmethyl	Clothia nidine urée	Imidaclopr ide guanidine	Imidaclo pride oléfine	Imidaclo pride urée	Thiaclo pride amide		
9	F	4	19/04/2016	M	0,04	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,08	<LQ	<LQ	0,22	0,09	<LQ	<LQ	<LQ	1,29	<LQ	<LQ	<LQ	
11	F	4	27/04/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,13	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,58	<LQ	<LQ	<LQ	
13	F	4	29/04/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,16	<LQ	<LQ	<LQ	0,18	<LQ	<LQ	<LQ	0,26	<LQ	<LQ	<LQ	
14	F	4	29/04/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,39	<LQ	<LQ	0,24	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,38	<LQ	<LQ	<LQ	
15	F	4	04/05/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	12,77	<LQ	<LQ	0,38	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3,85	<LQ	<LQ	<LQ	
1	F	4	25/06/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,64	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,46	<LQ	<LQ	<LQ	
4	F	4	25/06/2016	F	<LQ	2,68	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,55	<LQ	<LQ	0,23	15,54	<LQ	<LQ	<LQ	0,55	<LQ	<LQ	<LQ	
37	U	5	13/04/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,74	<LQ	<LQ	0,16	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,21	<LQ	<LQ	<LQ	
38	U	5	13/04/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,59	<LQ	<LQ	0,65	0,34	<LQ	<LQ	<LQ	0,51	<LQ	<LQ	<LQ	
39	U	5	13/04/2016	M	0,08	0,82	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,81	<LQ	<LQ	0,7	1,69	<LQ	<LQ	<LQ	0,9	<LQ	<LQ	<LQ	
41	U	5	13/04/2016	F	0,34	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,14	<LQ	<LQ	1,35	0,21	<LQ	<LQ	<LQ	0,53	<LQ	<LQ	<LQ	
64	U	5	05/07/2016	J	0,08	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,32	3,82	<LQ	0,75	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,03	<LQ	<LQ	<LQ	
73	U	5	11/07/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,99	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,13	<LQ	<LQ	<LQ	
75	U	5	11/07/2016	J	0,05	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	4,89	<LQ	<LQ	0,10	<LQ	<LQ	<LQ	0,26	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
76	U	5	11/07/2016	F	0,07	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,08	<LQ	<LQ	0,21	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,71	<LQ	<LQ	<LQ	
27	V	6	12/04/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,33	<LQ	<LQ	<LQ	
20	V	6	04/05/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,45	<LQ	<LQ	0,30	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,29	<LQ	<LQ	<LQ	
2	V	6	13/05/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3,21	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,08	<LQ	<LQ	<LQ	
16	V	6	17/05/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,53	<LQ	<LQ	0,12	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,45	<LQ	<LQ	<LQ	
8	V	6	07/06/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3,53	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,43	<LQ	<LQ	<LQ	
5	V	6	20/06/2016	M	<LQ	0,59	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,18	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,20	<LQ	<LQ	<LQ	
10	V	6	20/06/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3,53	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,88	<LQ	<LQ	<LQ	
21	V	6	20/06/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,29	<LQ	<LQ	0,33	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,38	<LQ	<LQ	<LQ	
12	V	6	29/06/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,44	<LQ	<LQ	0,22	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,25	<LQ	<LQ	<LQ	
3	V	6	30/06/2016	J	0,16	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	18,17	<LQ	<LQ	0,41	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	5,45	<LQ	<LQ	<LQ	
7	V	6	30/06/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	6,56	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3,02	<LQ	<LQ	<LQ	
22	V	6	30/06/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,50	<LQ	<LQ	0,48	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,21	<LQ	<LQ	<LQ	
23	V	6	30/06/2016	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3,20	<LQ	<LQ	0,27	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,45	<LQ	<LQ	<LQ	
26	V	6	30/06/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,47	<LQ	<LQ	0,16	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,12	<LQ	<LQ	<LQ	
53	V	6	30/06/2016	?	113,47	1,51	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	28,73	<LQ	<LQ	17,23	0,66	<LQ	24,38	<LQ	4,29	<LQ	<LQ	<LQ	1,14
54	V	6	30/06/2016	J	<LQ	21,67	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,55	<LQ	<LQ	0,12	0,44	<LQ	<LQ	<LQ	0,2	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

Annexes

55	V	6	30/06/2016	?	0,42	0,87	<LQ	<LQ	<LQ	77,55	<LQ	<LQ	0,9	0,27	<LQ	<LQ	<LQ	9,76	<LQ	<LQ	<LQ
56	V	6	30/06/2016	?	0,05	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,70	<LQ	<LQ	0,40	2,98	<LQ	<LQ	<LQ	0,21	<LQ	<LQ	<LQ
57	V	6	30/06/2016	?	<LQ	0,31	<LQ	<LQ	<LQ	12,04	<LQ	<LQ	5,00	0,18	<LQ	<LQ	<LQ	1,45	<LQ	<LQ	0,99
58	V	6	30/06/2016	J	0,06	12,44	<LQ	<LQ	<LQ	5,82	<LQ	<LQ	1,97	0,68	<LQ	<LQ	<LQ	0,32	<LQ	<LQ	<LQ
59	V	6	30/06/2016	J	0,54	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,49	<LQ	<LQ	4,12	0,67	<LQ	<LQ	<LQ	0,15	<LQ	<LQ	<LQ
60	V	6	30/06/2016	?	0,25	2,10	<LQ	<LQ	<LQ	4,10	<LQ	<LQ	0,6	24,37	<LQ	<LQ	<LQ	0,68	<LQ	<LQ	<LQ
61	V	6	30/06/2016	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,67	<LQ	<LQ	0,59	0,33	<LQ	<LQ	<LQ	0,42	<LQ	<LQ	<LQ
62	V	6	30/06/2016	J	<LQ	0,92	<LQ	<LQ	2,72	29,62	<LQ	<LQ	0,21	1,58	<LQ	<LQ	<LQ	2,04	25,58	<LQ	<LQ
91	V	6	06/07/2016	J	0,07	8,34	<LQ	<LQ	<LQ	1,85	<LQ	<LQ	0,19	40,05	<LQ	<LQ	<LQ	1,06	<LQ	<LQ	<LQ
86	V	6	20/07/2016	J	2,15	3,67	<LQ	<LQ	<LQ	2,83	<LQ	<LQ	<LQ	45,30	<LQ	<LQ	<LQ	1,77	<LQ	<LQ	<LQ
87	V	6	20/07/2016	J	0,20	10,05	<LQ	<LQ	<LQ	1,70	<LQ	<LQ	0,17	5,32	<LQ	<LQ	<LQ	0,81	<LQ	<LQ	<LQ
88	V	6	20/07/2016	J	0,78	1,96	<LQ	<LQ	<LQ	2,54	<LQ	<LQ	0,71	5,56	<LQ	<LQ	<LQ	1,10	<LQ	<LQ	<LQ
90	V	6	26/07/2016	J	4,83	6,00	<LQ	<LQ	<LQ	1,26	<LQ	<LQ	0,5	75,79	<LQ	<LQ	<LQ	1,68	<LQ	<LQ	<LQ

## b) 2017

## i. Azoles

N°	Type site	N° site	Date	Sexe Age	Concentration azoles (ng/g plumes)																			
					Biter tanol	Bromuconazole	Cyproconazole	Difénocazole	Epoxiconazole	Fenbuconazole	Flusilazole	Flutriafol	Imazalil	Ipconazole	Metconazole	Mylobutanil	Penconazole	Prochloraz	Propiconazole	Tébuconazole	Tétracazole	Triadimfon	Triadimol	Triticonazole
1	V	6	16/05/2017	M	N.A.	N.A.	2,98	187,89	6,50	43,07	2,44	<LQ	<LQ	N.A.	94,45	N.A.	6,33	<LQ	<LQ	538,49	46,63	<LQ	<LD	N.A.
4	V	6	07/07/2017	J	N.A.	N.A.	<LQ	65,56	<LQ	82,05	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	N.A.	4,26	<LQ	<LQ	699,07	172,11	<LQ	<LD	N.A.
7	V	6	12/07/2017	M	N.A.	N.A.	1,73	28,23	3,85	15,88	1,48	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	N.A.	5,43	<LQ	<LQ	252,45	15,56	<LQ	<LD	N.A.
8	V	6	19/07/2017	J	N.A.	N.A.	<LQ	7,94	<LQ	6,77	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	N.A.	8,43	<LQ	<LQ	153,98	12,00	<LQ	<LD	N.A.
13	V	6	19/07/2017	M	N.A.	N.A.	3,91	201,63	7,74	111,00	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	N.A.	41,41	<LQ	<LQ	329,25	145,11	<LQ	<LD	N.A.
2	V	6	07/07/2017	J	N.A.	N.A.	<LQ	78,02	<LQ	30,56	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	N.A.	17,51	<LQ	<LQ	772,63	114,12	<LQ	<LD	N.A.
3	V	6	07/07/2017	J	N.A.	N.A.	<LQ	45,47	<LQ	67,19	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	N.A.	8,44	<LQ	<LQ	552,54	38,13	<LQ	<LD	N.A.
9	V	6	19/07/2017	J	N.A.	N.A.	<LQ	5,52	<LQ	2,88	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	N.A.	4,88	<LQ	<LQ	34,09	9,28	<LQ	<LD	N.A.
10	V	6	19/07/2017	J	N.A.	N.A.	<LQ	95,81	3,34	28,06	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	0,99	N.A.	12,40	<LQ	<LQ	173,14	17,89	<LQ	<LD	N.A.
11	V	6	19/07/2017	J	N.A.	N.A.	<LQ	3,26	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	N.A.	3,41	<LQ	<LQ	112,88	15,79	<LQ	<LD	N.A.
12	V	6	19/07/2017	J	N.A.	N.A.	<LQ	34,97	<LQ	138,13	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	<LQ	N.A.	10,61	<LQ	<LQ	301,81	21,54	<LQ	<LD	N.A.
14	V	6	19/07/2017	M	N.A.	N.A.	<LQ	34,00	2,78	136,01	<LQ	<LQ	<LQ	N.A.	0,61	N.A.	23,59	<LQ	<LQ	183,19	25,78	<LQ	<LD	N.A.

## ii. Néonicotinoïdes et leurs métabolites

N°	Type site	N° site	Date	Sexe Age	Concentration néonicotinoïdes (ng/g plumes)										Concentration néonicotinoïdes métabolites (ng/g plumes)							
					Acétamipride	Clothianidine	Cycloxapride	Dinotéfurane	Flupyradifurone	Imidaclopride	Nitenpyrame	Sulfoxaflo	Thiaclopride	Thiaméthoxame	6-Chloronicotinique acide	Acétamipride N desmethyl	Clothianidine urée	Imidaclopride guanidine	Imidaclopride oléfine	Imidaclopride urée	Thiaclopride amide	
1	V	6	16/05/2017	M	0,08	1,13	<LQ	<LQ	<LQ	7,73	<LQ	<LQ	2,61	3,35	<LQ	<LQ	<LQ	8,47	<LQ	<LQ	<LQ	0,50
4	V	6	07/07/2017	J	<LQ	1,40	<LQ	<LQ	<LQ	6,15	<LQ	<LQ	<LQ	19,96	<LQ	<LQ	<LQ	2,69	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
7	V	6	12/07/2017	M	0,05	1,86	<LQ	<LQ	<LQ	0,66	<LQ	<LQ	0,53	25,41	<LQ	<LQ	<LQ	1,01	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
8	V	6	19/07/2017	J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,09	4,59	<LQ	<LQ	<LQ	0,48	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
13	V	6	19/07/2017	M	<LQ	1,92	<LQ	<LQ	<LQ	1,58	<LQ	<LQ	1,17	30,18	<LQ	<LQ	<LQ	2,66	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
2	V	6	07/07/2017	J	<LQ	8,61	<LQ	<LQ	<LQ	0,97	<LQ	<LQ	0,18	7,62	<LQ	<LQ	<LQ	0,47	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
3	V	6	07/07/2017	J	<LQ	1,13	<LQ	<LQ	<LQ	6,06	<LQ	<LQ	<LQ	49,31	<LQ	<LQ	<LQ	1,78	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
9	V	6	19/07/2017	J	<LQ	1,83	<LQ	<LQ	<LQ	0,33	<LQ	<LQ	<LQ	9,56	<LQ	<LQ	<LQ	0,31	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
10	V	6	19/07/2017	J	<LQ	3,19	<LQ	<LQ	<LQ	3,07	<LQ	<LQ	<LQ	24,59	<LQ	<LQ	<LQ	2,05	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
11	V	6	19/07/2017	J	<LQ	1,04	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,50	<LQ	<LQ	<LQ	0,34	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
12	V	6	19/07/2017	J	<LQ	0,73	<LQ	<LQ	<LQ	0,36	<LQ	<LQ	0,17	14,32	<LQ	<LQ	<LQ	0,51	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
14	V	6	19/07/2017	M	<LQ	0,92	<LQ	<LQ	<LQ	0,93	<LQ	<LQ	0,48	8,72	<LQ	<LQ	<LQ	1,04	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

c) 2019

i. Azoles

N°	Type site	N° site	Sexe	Date	Concentration azoles (ng/g plumes)																				
					Biter tanol	Bromu conazole	Cyproc onazole	Difénoc onazole	Epoxic onazole	Fenbuc onazole	Flusilaz ole	Flutriafol	Imaz alil	Ipconazole	Metconazole	Myclob utanil	Penconazole	Proc hloraze	Propico nazole	Tébuconazole	Tétraco nazole	Triad iméfo n	Triad imén ol	Tritic onazole	
48	F	4	M	16/05/2019	<LD	<LQ	1,43	0,79	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,39	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,86	<LQ	<LQ	<LD	<LQ
107	F	4	J	25/06/2019	<LD	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LD	<LQ
138	F	4	J	23/07/2019	<LD	<LQ	<LQ	0,85	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	4,14	<LQ	<LQ	<LD	<LQ
9	V	6	M	24/04/2019	<LD	<LQ	<LQ	79,13	<LQ	21,19	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	180,78	27,92	<LQ	<LD	<LQ
10	V	6	F	24/04/2019	<LD	<LQ	<LQ	4,51	3,26	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	32,27	4,58	<LQ	<LD	<LQ
11	V	6	M	24/04/2019	<LD	<LQ	0,45	8,60	2,54	6,00	0,44	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,75	<LQ	<LQ	<LQ	83,19	11,85	<LQ	<LD	<LQ
12	V	6	M	24/04/2019	<LD	<LQ	0,36	<LQ	<LQ	0,59	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	66,48	<LQ	<LQ	<LD	<LQ	
13	V	6	M	24/04/2019	<LD	<LQ	0,64	0,50	<LQ	1,12	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	8,83	<LQ	<LQ	9,67	12,23	<LQ	<LD	<LQ	
37	V	6	M	10/05/2019	<LD	<LQ	<LQ	0,72	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,96	<LQ	<LQ	<LQ	5,59	<LQ	<LQ	<LD	<LQ	
38	V	6	F	10/05/2019	<LD	<LQ	0,63	2,43	<LQ	4,02	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	7,25	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	17,37	9,17	<LQ	<LD	<LQ	
47	V	6	M	15/05/2019	<LD	<LQ	0,34	1,49	<LQ	0,78	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,53	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	9,18	<LQ	<LQ	<LD	<LQ	
56	V	6	M	24/05/2019	<LD	<LQ	<LQ	10,11	2,53	2,92	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,18	<LQ	23,81	<LQ	<LQ	9,89	13,29	<LQ	<LD	<LQ	
57	V	6	F	10/05/2019	<LD	<LQ	0,31	31,33	<LQ	3,64	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,84	<LQ	13,42	<LQ	<LQ	9,93	17,46	<LQ	<LD	<LQ	
58	V	6	J	24/05/2019	<LD	<LQ	0,22	5,66	<LQ	0,58	2,25	<LQ	<LQ	<LQ	0,66	<LQ	0,68	<LQ	<LQ	14,91	18,48	<LQ	<LD	<LQ	
59	V	6	M	24/05/2019	<LD	<LQ	0,31	12,86	<LQ	2,21	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,87	<LQ	8,09	<LQ	<LQ	13,98	87,00	<LQ	<LD	<LQ	
60	V	6	M	24/05/2019	<LD	<LQ	<LQ	18,45	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	4,24	<LQ	6,28	<LQ	<LQ	7,85	18,87	<LQ	<LD	<LQ		
69	V	6	M	03/06/2019	<LD	<LQ	0,33	36,38	<LQ	4,76	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,28	0,67	51,01	<LQ	<LQ	12,96	155,43	<LQ	<LD	<LQ	
82	V	6	J	13/06/2019	<LD	<LQ	<LQ	56,86	<LQ	189,09	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,47	<LQ	11,70	<LQ	<LQ	138,94	143,61	<LQ	<LD	<LQ	
85	V	6	J	17/06/2019	<LD	<LQ	<LQ	13,04	<LQ	6,70	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	8,42	<LQ	2,21	<LQ	<LQ	142,05	28,77	<LQ	<LD	<LQ	
86	V	6	M	17/06/2019	<LD	<LQ	<LQ	31,67	<LQ	11,75	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	5,62	<LQ	2,65	<LQ	<LQ	108,78	25,62	<LQ	<LD	<LQ	
93	V	6	M	20/06/2019	<LD	<LQ	0,53	6,44	<LQ	23,38	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,48	3,27	2,19	<LQ	<LQ	24,24	53,28	<LQ	<LD	<LQ	
94	V	6	F	20/06/2019	<LD	<LQ	0,25	3,65	<LQ	9,01	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,46	2,60	1,67	<LQ	<LQ	17,38	26,48	<LQ	<LD	<LQ	
95	V	6	F	20/06/2019	<LD	<LQ	<LQ	6,12	<LQ	9,92	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,57	1,10	4,03	<LQ	<LQ	26,27	22,03	<LQ	<LD	<LQ	
118	V	6	J	08/07/2019	<LD	<LQ	<LQ	56,51	<LQ	6,07	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,02	4,38	<LQ	<LQ	22,34	12,20	<LQ	<LD	<LQ	
128	V	6	J	16/07/2019	<LD	<LQ	2,36	252,01	<LQ	53,53	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,47	0,78	17,61	<LQ	<LQ	875,14	32,89	<LQ	<LD	<LQ	
129	V	6	F	16/07/2019	<LD	<LQ	0,37	142,00	<LQ	67,43	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,60	<LQ	50,05	<LQ	<LQ	161,76	117,39	<LQ	<LD	<LQ	
133	V	6	J	19/07/2019	<LD	<LQ	<LQ	6,73	<LQ	11,16	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	38,54	3,61	<LQ	<LD	<LQ		
134	V	6	J	19/07/2019	<LD	<LQ	<LQ	12,55	<LQ	19,17	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	56,54	4,84	<LQ	<LD	<LQ		
135	V	6	J	19/07/2019	<LD	<LQ	0,22	6,99	<LQ	12,20	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,57	0,21	<LQ	<LQ	33,23	10,85	<LQ	<LD	<LQ	
136	V	6	J	19/07/2019	<LD	<LQ	<LQ	26,13	<LQ	11,91	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,86	0,26	<LQ	<LQ	39,04	9,47	<LQ	<LD	<LQ	
139	V	6	J	24/07/2019	<LD	<LQ	0,31	7,97	<LQ	15,37	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,89	3,88	31,55	<LQ	<LQ	108,27	57,06	<LQ	<LD	<LQ	
140	V	6	J	24/07/2019	<LD	<LQ	<LQ	12,54	<LQ	70,77	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,60	15,00	<LQ	<LQ	105,68	24,68	<LQ	<LD	<LQ	
141	V	6	J	25/07/2019	<LD	<LQ	<LQ	236,47	<LQ	30,53	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,03	0,77	3,43	<LQ	<LQ	27,33	25,49	<LQ	<LD	<LQ	
142	V	6	J	25/07/2019	<LD	<LQ	<LQ	72,55	<LQ	154,02	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,87	<LQ	14,37	<LQ	<LQ	583,14	107,5	<LQ	<LD	<LQ	
143	V	6	J	25/07/2019	<LD	<LQ	0,41	31,15	<LQ	5,89	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	13,67	<LQ	<LQ	386,04	16,54	<LQ	<LD	<LQ	

## ii. Néonicotinoïdes et leurs métabolites

N°	Typ e site	Sexe	Date	Concentration néonicotinoïdes (ng/g plumes)										Concentration néonicotinoïdes métabolites (ng/g plumes)								
				Acéta miprid e	Clothi anidin e	Cycloxa pride	Dinoté furane	Flupyra difurone	Imida clopri de	Nitenpyr ame	Sulfoxafl or	Thiaclo pride	Thiamétho xame	6-Chloro nicotinique acide	Acétamipri de N desmethyl	Clothian idine urée	Imidaclo pride guanidin e	Imidaclo pride oléfine	Imida clopri de urée	Thiaclo pride amide		
48	F	M	16/05/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
107	F	J	25/06/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
138	F	J	23/07/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
9	V	M	24/04/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,85	<LQ	<LQ	0,41	1,23	<LQ	<LQ	<LQ	0,79	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
10	V	F	24/04/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,54	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
11	V	M	24/04/2019	0,04	1,40	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,85	<LQ	<LQ	0,23	0,74	<LQ	<LQ	<LQ	1,00	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
12	V	M	24/04/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,55	<LQ	<LQ	0,10	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,39	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
13	V	M	24/04/2019	<LQ	0,74	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,17	<LQ	<LQ	<LQ	0,41	<LQ	<LQ	<LQ	0,25	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
37	V	M	10/05/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	10,50	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,08	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
38	V	F	10/05/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,22	<LQ	<LQ	0,62	0,32	<LQ	<LQ	<LQ	0,20	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
47	V	M	15/05/2019	0,04	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,12	<LQ	<LQ	0,08	0,22	<LQ	<LQ	<LQ	0,94	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
56	V	M	24/05/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,46	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,27	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
57	V	F	24/05/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,21	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
58	V	J	24/05/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3,18	<LQ	<LQ	0,42	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,59	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
59	V	M	24/05/2019	<LQ	0,41	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,25	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
60	V	M	24/05/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,26	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
69	V	M	03/06/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,32	<LQ	<LQ	0,07	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,39	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
82	V	J	13/06/2019	0,11	5,78	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	5,61	<LQ	<LQ	0,13	0,20	<LQ	0,79	<LQ	1,50	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
85	V	J	17/06/2019	0,56	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,22	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,74	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
86	V	M	17/06/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,38	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,13	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
93	V	M	20/06/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,07	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,24	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
94	V	F	20/06/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,05	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
95	V	F	20/06/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,15	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
118	V	J	08/07/2019	0,07	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	15,79	<LQ	<LQ	0,14	0,49	<LQ	0,66	<LQ	4,15	13,43	<LQ	<LQ	<LQ
128	V	J	16/07/2019	0,06	0,73	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,13	<LQ	<LQ	0,20	6,85	<LQ	<LQ	<LQ	1,18	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
129	V	F	16/07/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,27	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,35	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
133	V	J	19/07/2019	<LQ	14,61	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,68	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
134	V	J	19/07/2019	<LQ	6,82	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,36	<LQ	<LQ	<LQ	0,08	<LQ	<LQ	<LQ	0,29	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
135	V	J	19/07/2019	0,05	1,59	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,87	<LQ	<LQ	0,10	6,15	<LQ	<LQ	2,98	0,75	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
136	V	J	19/07/2019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,93	<LQ	<LQ	0,21	0,22	<LQ	<LQ	<LQ	1,15	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
139	V	J	24/07/2019	0,07	6,55	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,45	<LQ	<LQ	0,19	0,60	<LQ	<LQ	<LQ	0,38	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
140	V	J	24/07/2019	<LQ	5,91	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,27	<LQ	<LQ	0,08	3,42	<LQ	<LQ	<LQ	0,18	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
141	V	J	25/07/2019	0,18	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	100,75	<LQ	<LQ	0,44	0,98	<LQ	1,46	<LQ	13,11	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
142	V	J	25/07/2019	4,62	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,93	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
143	V	J	25/07/2019	<LQ	2,71	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,86	<LQ	<LQ	0,18	1,41	<LQ	<LQ	<LQ	0,20	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ





## ii. Néonicotinoïdes et leurs métabolites

N°	Zone	N° site	Localité du nid	Date	Age Sexe	Concentration néonicotinoïdes (ng/g plumes)										Concentration néonicotinoïdes métabolites (ng/g plumes)							
						Acétamipride	Clothia nidine	Cycloxa pride	Dinotéf urane	Flupyradif urone	Imidaclopride	Nitenpyrame	Sulfoxa flor	Thiaclopride	Thiaméthoxame	6-Chloro nicotinique acide	Acétamipride N desmethyl	Clothia nidine urée	Imidaclopride guanidine	Imidaclopride oléfine	Imidaclopride urée	Thiaclopride amide	
1	B	8	Gripperie-Saint-Symphorien	23/05/2019	J / F	< LQ	1,18	< LQ	8,65	39,17	0,39	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
2	B	8	Saint-Just-Luzac	23/05/2019	J / M	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
4	B	8	Hiers-Brouage	23/05/2019	J / M	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
5	B	8	Hiers-Brouage	23/05/2019	J / F	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
6	B	8	Beaugeay	30/05/2019	J / M	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
7	B	8	Hiers-Brouage	30/05/2019	J / F	< LQ	< LQ	< LQ	5,55	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
8	B	8	Hiers-Brouage	30/05/2019	J / M	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
9	B	8	Coulonges	04/06/2019	J / M	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,03	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
10	B	8	Saint-Jean-D'Angle	04/06/2019	J / M	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
11	B	8	Hiers-Brouage	04/06/2019	J / M	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
12	E G	9	Meshers-Sur-Gironde	16/05/2019	?	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
13	E G	9	Saint-Romain-Sur-Gironde	21/05/2019	?	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
15	E G	9	Saint-Dizant-Du-Gua	21/05/2019	?	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
16	E G	9	Meshers-Sur-Gironde	21/05/2019	?	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
17	E G	9	Saint-Dizant-Du-Gua	29/05/2019	?	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
19	E G	9	Saint-Sorlin-De-Conac	29/05/2019	?	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
20	E G	9	Talmont	29/05/2019	?	< LQ	2,01	< LQ	< LQ	48,63	0,58	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
24	E G	9	Mortagne-Sur-Gironde	03/06/2019	?	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
26	E G	9	Royan	08/06/2019	?	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
29	E G	9	Saint-Dizant-Du-Gua	08/06/2019	?	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

Annexes

Annexe 12 : Données brutes des concentrations dans les plumes en azoles (i), néonicotinoïdes et leurs métabolites (ii) chez les goélands

Légende

< LQ : < LQ définie ou < LD échantillon
< LD : < LD définie
C° > LQ
C° > LQ mais comprise entre LD et LQ échantillon
N.A. : non analysé

i. Azoles

N°	Espèce	Date	Age Sexe	Concentration azoles (ng/g plumes)																				
				Bitertanol	Bromconazole	Cyproconazole	Diféconazole	Epoxiconazole	Fenbuconazole	Flusilazole	Flutriafol	Imazalil	Ipconazole	Metconazole	Myclobutanil	Penconazole	Prochloraz	Propiconazole	Tébuconazole	Tétraconazole	Triadiméfon	Triadiménon	Triticonazole	
GAA-16-04	GA	01/06/2016	F	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	2,49	< LQ	< LQ	5,17	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GAA-16-05	GA	02/06/2016	M	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,18	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GAA-16-07	GA	02/06/2016	M	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,19	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GAA-16-09	GA	02/06/2016	M	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	7,90	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GAA-16-10	GA	02/06/2016	M	< LD	< LQ	0,48	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	2,24	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GBA-16-02	GB	01/06/2016	M	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,95	< LQ	< LQ	< LQ	3,11	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GBA-16-04	GB	01/06/2016	M	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	16,48	13,19	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GBA-16-06	GB	01/06/2016	M	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,94	0,27	< LQ	< LQ	0,56	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GBA-16-07	GB	01/06/2016	M	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LD	< LQ	
GBA-16-10	GB	01/06/2016	F	< LD	< LQ	0,46	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LD	< LQ	
GAA-19-01	GA	13/05/2019	M	< LD	< LQ	< LQ	0,57	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LD	< LQ	
GAA-19-03	GA	13/05/2019	M	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,59	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GAA-19-04	GA	13/05/2019	F	< LD	< LQ	< LQ	1,81	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LD	< LQ	
GAA-19-08	GA	22/05/2019	F	< LD	< LQ	< LQ	0,51	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LD	< LQ	
GAA-19-10	GA	22/05/2019	F	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,69	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GBA-19-01	GB	13/05/2019	M	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LD	< LQ	
GBA-19-02	GB	13/05/2019	F	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LD	< LQ	
GBA-19-03	GB	13/05/2019	F	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LD	< LQ	
GBA-19-07	GB	13/05/2019	F	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,12	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GBA-19-11	GB	22/05/2019	M	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,89	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GAA-01-20	GA	26/05/2020	?	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	24,28	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,92	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GAA-02-20	GA	26/05/2020	?	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,75	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GAA-05-20	GA	26/05/2020	?	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,97	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GBA-01-20	GB	02/06/2020	?	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,48	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GBA-02-20	GB	26/05/2020	?	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LD	< LQ	
GBA-05-20	GB	02/06/2020	?	< LD	< LQ	0,20	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,08	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GBA-06-20	GB	02/06/2020	?	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,59	< LQ	< LQ	< LQ	1,54	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GBA-07-20	GB	02/06/2020	?	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,37	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1,05	< LQ	< LQ	< LD	< LQ
GBA-08-20	GB	02/06/2020	?	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LD	< LQ	
GBA-09-20	GB	02/06/2020	?	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LD	< LQ	

GA : Goélands Argentés, GB : Goélands Bruns

## ii. Néonicotinoïdes et leurs métabolites

N°	Espèce	Date	Age Sexe	Concentration néonicotinoïdes (ng/g plumes)										Concentration néonicotinoïdes métabolites (ng/g plumes)						
				Acéta miprid e	Cloti anidin e	Cyclo xapride	Dinoté furane	Flupyra difurone	Imidacl opride	Niten pyram e	Sulfoxa flor	Thiac lopride	Thiam éthoxa me	6-Chloro nicotiniq ue acide	Acétami pride N desmeth yl	Clothian dine urée	Imidacl opride guanidine	Imidacl opride oléfine	Imidacl opride urée	Thiaclo pride amide
GAA-16-04	GA	01/06/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3,14	<LQ	<LQ	0,66	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,50	<LQ	<LQ	<LQ
GAA-16-05	GA	02/06/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GAA-16-07	GA	02/06/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,15	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GAA-16-09	GA	02/06/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	8,36	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,23	<LQ	<LQ	<LQ
GAA-16-10	GA	02/06/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,24	<LQ	<LQ	0,13	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-16-02	GB	01/06/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-16-04	GB	01/06/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,10	<LQ	<LQ	0,06	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-16-06	GB	01/06/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,02	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-16-07	GB	01/06/2016	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-16-10	GB	01/06/2016	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,42	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GAA-19-01	GA	13/05/2019	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GAA-19-03	GA	13/05/2019	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,08	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GAA-19-04	GA	13/05/2019	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,17	<LQ	<LQ	0,55	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GAA-19-08	GA	22/05/2019	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GAA-19-10	GA	22/05/2019	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,20	<LQ	<LQ	0,07	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-19-01	GB	13/05/2019	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-19-02	GB	13/05/2019	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-19-03	GB	13/05/2019	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,68	<LQ	<LQ	1,75	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,14	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-19-07	GB	13/05/2019	F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3,55	<LQ	<LQ	0,53	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,68	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-19-11	GB	22/05/2019	M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GAA-01-20	GA	26/05/2020	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,91	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GAA-02-20	GA	26/05/2020	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,32	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GAA-05-20	GA	26/05/2020	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,13	<LQ	<LQ	0,04	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-01-20	GB	02/06/2020	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,50	<LQ	<LQ	0,55	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,14	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-02-20	GB	26/05/2020	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-05-20	GB	02/06/2020	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,78	<LQ	<LQ	0,17	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,15	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-06-20	GB	02/06/2020	?	1,11	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,13	<LQ	<LQ	0,14	<LQ	<LQ	0,14	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-07-20	GB	02/06/2020	?	<LQ	0,76	<LQ	<LQ	<LQ	3,50	<LQ	<LQ	0,13	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,63	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-08-20	GB	02/06/2020	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
GBA-09-20	GB	02/06/2020	?	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

GA : Goélands Argentés, GB : Goélands Bruns

Annexe 13 : Valeurs des p-value pour les tests statistiques sur les plumes de merles noirs en azoles avec (a) la comparaison entre les habitats, (b) la comparaison entre les années

 Test significatif < 5 %

a) Comparaison entre les habitats  
i. 2016

	2016 toutes les dates Kruskal-Wallis		2016 après le 21/06/2016 Kruskal-Wallis	
	Forêt/Urbain/Viticole		Forêt/Urbain/Viticole	
	p-value	Chi <sup>2</sup>	p-value	Chi <sup>2</sup>
Bitertanol	Fréquence < 20 %		Fréquence < 20 %	
Bromuconazole	Fréquence < 20 %		Fréquence < 20 %	
Cyproconazole	0,071	5,27	0,671	0,80
Difénoconazole	0,286	2,51	0,270	2,62
Epoxiconazole	0,745	0,59	0,311	2,33
Fenbuconazole	0,166	3,59	0,127	4,13
Flusilazole	0,311	2,34	0,630	0,93
Imazalil	Fréquence < 20 %		Fréquence < 20 %	
Ipconazole	Fréquence < 20 %		Fréquence < 20 %	
Metconazole	0,451	1,59	0,130	4,08
Myclobutanil	0,390	1,88	0,078	5,09
Penconazole	0,384	1,91	0,226	2,97
Prochloraze	Fréquence < 20 %		Fréquence < 20 %	
Propiconazole	Fréquence < 20 %		Fréquence < 20 %	
Tébuconazole	0,580	1,09	0,198	3,24
Tétraconazole	0,186	3,36	0,079	5,08
Triadiméfon	Fréquence < 20 %		Fréquence < 20 %	
Triadiménol	Fréquence < 20 %		Fréquence < 20 %	
Triticonazole	Fréquence < 20 %		Fréquence < 20 %	

ii. 2019

2019 toutes les dates		
Mann Whitney		
Forêt/Viticole		
	p-value	Z
Bitertanol	Fréquence < 20 %	
Bromuconazole	Fréquence < 20 %	
Cyproconazole	0,975	- 0,03
Difénoconazole	0,016	- 2,42
Epoxiconazole	Fréquence < 20 %	
Fenbuconazole	0,011	- 2,54
Flusilazole	Fréquence < 20 %	
Imazalil	Fréquence < 20 %	
Ipconazole	Fréquence < 20 %	
Metconazole	0,484	- 0,70
Myclobutanil	0,197	- 1,29
Penconazole	0,049	- 1,97
Prochloraze	Fréquence < 20 %	
Propiconazole	Fréquence < 20 %	
Tébuconazole	0,005	- 2,80
Tétraconazole	0,011	- 2,54
Triadiméfon	Fréquence < 20 %	
Triadiménol	Fréquence < 20 %	
Triticonazole	Fréquence < 20 %	

b) Comparaison entre les années

	Uniquement sur les juvéniles viticoles juin/juillet Kruskal-Wallis		Uniquement sur les juvéniles viticoles juin/juillet Post Hoc		
	Entre 2016/2017/2019		Entre 2016 et 2017	Entre 2017 et 2019	Entre 2016 et 2019
	p-value	Chi <sup>2</sup>	p-value	p-value	p-value
Difénoconazole	0,418	0,74		Non réalisé	
Fenbuconazole	0,971	-0,06		Non réalisé	
Myclobutanil	Non réalisé			Non réalisé	
Penconazole	0,005	15,3	0,004	0,901	0,006
Tébuconazole	0,056	5,76		Non réalisé	
Tétraconazole	0,414	1,77		Non réalisé	

	Uniquement sur les juvéniles viticoles juin/juillet Mann Whitney	
	Entre 2016 et 2019	
	p-value	Z
Myclobutanil	0,077	3,12

Annexe 14 : Valeurs des p-value pour les corrélations entre concentrations dans les plumes de goélands et les valeurs isotopiques pour les azoles (a) et les néonicotinoïdes (b)



Test significatif < 5 %

c) Azoles

		Variance	
		Somme (log concentration azoles) = a x taux isotopiques	
		R <sup>2</sup>	P-value
GA (Goéland Argenté)	δ 13 C	0,141	0,283
	Log δ 15 N	0,027	0,649
	Log δ 14 S	0,029	0,639
GB (Goéland Brun)	δ 13 C	0,261	0,131
	Log δ 15 N	0,255	0,136
	Log δ 14 S	0,375	0,059

d) Néonicotinoïdes

		Variance	
		Somme (log concentration néonicotinoïdes) = a x taux isotopiques	
		R <sup>2</sup>	P-value
GA (Goéland Argenté)	δ 13 C	0,156	0,258
	Log δ 15 N	0,009	0,933
	Log δ 14 S	0,006	0,948
GB (Goéland Brun)	δ 13 C	0,228	0,163
	Log δ 15 N	0,434	0,038
	Log δ 14 S	0,213	0,179



Annexe 15 : Valeurs des p-value pour les tests statistiques sur les plumes de merles noirs en néonicotinoïdes avec (a) la comparaison entre les habitats pour l'année 2016 et (b) la comparaison entre les années

 Test significatif < 5 %

a) Comparaison entre les habitats pour l'année 2016

	Kruskal-Wallis	
	Forêt/Urbain/Viticole	
	p-value	Chi <sup>2</sup>
Acétamipride	0,179	3,44
Clothianidine	0,102	- 4,55
Imidaclopride	0,945	0,11
Thiaclopride	0,351	2,09
Thiaméthoxame	0,452	1,59

b) Comparaison entre les années

	Uniquement sur les viticoles Juin/Juillet Mann-Whitney	
	2016 et 2019	
	p-value	Z
Acétamipride	0,886	0,14
Clothianidine	0,910	0,11
Imidaclopride	0,135	1,50
Thiaclopride	0,052	1,95
Thiaméthoxame	0,891	0,14



## Références bibliographiques

- Agreste Nouvelle-Aquitaine, 2019. Les pratiques phytosanitaires en viticulture en Nouvelle-Aquitaine en 2016 (Analyses & Résultats).
- Agriculture Française, chiffres clé, 2015.
- Agricultures & Territoires, n.d. Calendrier de traitement des vignes.
- Alleva, E., Francia, N., Pandolfi, M., De Marinis, A.M., Chiarotti, F., Santucci, D., 2006. Organochlorine and Heavy-Metal Contaminants in Wild Mammals and Birds of Urbino-Pesaro Province, Italy: An Analytic Overview for Potential Bioindicators. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 123–134. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0218-1>
- Alma, A., Palermo, S., Boccardo, G., Conti, M., 2001. Transmission of chrysanthemum yellows, a subgroup 16Srl-B phytoplasma, to grapevine by four leathopper species. *Journal of Plant Pathology* 7.
- Alvarez, D.A., Petty, J.D., Huckins, J.N., Jones-Lepp, T.L., Getting, D.T., Goddard, J.P., Manahan, S.E., 2004. Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1640. <https://doi.org/10.1897/03-603>
- Andreu-Sánchez, O., Paraíba, L.C., Jonsson, C.M., Carrasco, J.M., 2012. Acute toxicity and bioconcentration of fungicide tebuconazole in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 27, 109–116. <https://doi.org/10.1002/tox.20618>
- Appenzeller, B.M.R., Hardy, E.M., Grova, N., Chata, C., Faÿs, F., Briand, O., Schroeder, H., Duca, R.-C., 2017. Hair analysis for the biomonitoring of pesticide exposure: comparison with blood and urine in a rat model. *Arch Toxicol* 91, 2813–2825. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1910-9>
- Arfat, Y., Mahmood, N., Tahir, M.U., Rashid, M., Anjum, S., Zhao, F., Li, D.-J., Sun, Y.-L., Hu, L., Zhihao, C., Yin, C., Shang, P., Qian, A.-R., 2014. Effect of imidacloprid on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male albino mice. *Toxicology Reports* 1, 554–561. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.08.004>
- Aseperi, A.K., Busquets, R., Hooda, P.S., Cheung, P.C.W., Barker, J., 2020. Behaviour of neonicotinoids in contrasting soils. *Journal of Environmental Management* 276, 111329. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111329>
- Atkinson, R., Guicherit, R., Hites, R.A., Palm, W.-U., Seiber, J.N., de Voogt, P., 1999. Transformations of pesticides in the atmosphere: a state of art. *Water, Air, and Soil Pollution* 115, 219–243. <https://doi.org/10.1023/A:1005286313693>
- Atmo Occitanie, 2020. Evaluation des phytosanitaires dans l'air en Occitanie 2018-2019.
- Barbounis, E.G., Tzatzarakis, M.N., Alegakis, A.K., Kokkinaki, A., Karamanos, N., Tsakalof, A., Tsatsakis, A.M., 2012. Assessment of PCBs exposure in human hair using double focusing high resolution mass spectrometry and single quadrupole mass spectrometry. *Toxicology Letters* 210, 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.07.031>
- Barbraud, C., Barbraud, J.-C., 1997. Le régime alimentaire des poussins de cigogne blanche *Ciconia ciconia*, en Charente-Maritime : importance des insectes. *Alauda* 65, 259–262.
- Barbraud, J.-C., Barbraud, C., Delord, K., 2002. Changements récents dans le régime alimentaire des poussins de cigogne blanche *Ciconia ciconia* en Charente-Maritime. *Alauda* 70, 437–444.
- Baschet, J.-F., Pingault, N., 2009. La réduction des usages de pesticides : le plan Ecophyto 2018.
- Bauerová, P., Krajzingrová, T., Těšický, M., Velová, H., Hraníček, J., Musil, S., Svobodová, J., Albrecht, T., Vinkler, M., 2020. Longitudinally monitored lifetime changes in blood

- heavy metal concentrations and their health effects in urban birds. *Science of The Total Environment* 723, 138002. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138002>
- Bean, T.G., Gross, M.S., Karouna-Renier, N.K., Henry, P.F.P., Schultz, S.L., Hladik, M.L., Kuivila, K.M., Rattner, B.A., 2019. Toxicokinetics of Imidacloprid-Coated Wheat Seeds in Japanese Quail (*Coturnix japonica*) and an Evaluation of Hazard. *Environmental Science & Technology* 53, 3888–3897. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b07062>
- Bednarska, A.J., Edwards, P., Sibly, R., Thorbek, P., 2013. A toxicokinetic model for thiamethoxam in rats: implications for higher-tier risk assessment. *Ecotoxicology* 22, 548–557. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1047-z>
- Bedos, C., Cellier, P., Calvet, R., Barriuso, E., Gabrielle, B., 2002. Mass transfer of pesticides into the atmosphere by volatilization from soils and plants: overview. *Agronomie* 22, 21–33. <https://doi.org/10.1051/agro:2001003>
- Béranger, R., Hardy, E.M., Binter, A.-C., Charles, M.-A., Zaros, C., Appenzeller, B.M.R., Chevrier, C., 2020. Multiple pesticides in mothers' hair samples and children's measurements at birth: Results from the French national birth cohort (ELFE). *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 223, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.10.010>
- Berset, J.D., Mermer, S., Robel, A.E., Walton, V.M., Chien, M.L., Field, J.A., 2017. Direct residue analysis of systemic insecticides and some of their relevant metabolites in wines by liquid chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1506, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.05.019>
- Beste, K.Y., Burkhardt, O., Kaefer, V., 2012. Rapid HPLC–MS/MS method for simultaneous quantitation of four routinely administered triazole antifungals in human plasma. *Clinica Chimica Acta* 413, 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.09.042>
- Bhagat, J., Singh, N., Nishimura, N., Shimada, Y., 2021. A comprehensive review on environmental toxicity of azole compounds to fish. *Chemosphere* 262, 128335. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128335>
- Binkowski, L.J., Fort, J., Brault-Favrou, M., Gallien, F., Le Guillou, G., Chastel, O., Bustamante, P., 2021. Foraging ecology drives mercury contamination in chick gulls from the English Channel. *Chemosphere* 267, 128622. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128622>
- Blondel, A., Krings, B., Ducat, N., Pigeon, O., 2018. Validation of an analytical method for 1,2,4-triazole in soil using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry and monitoring of propiconazole degradation in a batch study. *Journal of Chromatography A* 1562, 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.05.056>
- Bodereau, B., 2011. Récepteurs nicotiniques neuronaux d'insectes et insecticides : caractérisation de facteurs cellulaires impliqués dans la modulation de l'efficacité des néonicotinoides. Université d'Angers.
- Bonmatin, J.-M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E.A.D., Noome, D.A., Simon-Delso, N., Tapparo, A., 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ Sci Pollut Res* 22, 35–67. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>
- Bonmatin, J.-M., Mitchell, E.A.D., Glauser, G., Lumawig-Heitzman, E., Claveria, F., Bijleveld van Lexmond, M., Taira, K., Sánchez-Bayo, F., 2021. Residues of neonicotinoids in soil, water and people's hair: A case study from three agricultural regions of the Philippines. *Science of The Total Environment* 757, 143822. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143822>

- Buckley, N.J., 1990. Diet and feeding ecology of great black-backed gulls (*Larus marinus*) at a southern Irish breeding colony. *Journal of Zoology* 222, 363–373. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1990.tb04038.x>
- Burger, J., Gochfeld, M., 2004. Marine Birds as Sentinels of Environmental Pollution. *EcoHealth* 1. <https://doi.org/10.1007/s10393-004-0096-4>
- Burkina, V., Zamaratskaia, G., Oliveira, R., Fedorova, G., Grabicova, K., Schmidt-Posthaus, H., Steinbach, C., Domingues, I., Golovko, O., Sakalli, S., Grabic, R., Randak, T., Zlabek, V., 2016. Sub-lethal effects and bioconcentration of the human pharmaceutical clotrimazole in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Chemosphere* 159, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.042>
- Byholm, P., Mäkeläinen, S., Santangeli, A., Goulson, D., 2018. First evidence of neonicotinoid residues in a long-distance migratory raptor, the European honey buzzard (*Pernis apivorus*). *Science of The Total Environment* 639, 929–933. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.185>
- Carvalho, P.N., Rodrigues, P.N.R., Alves, F., Evangelista, R., Basto, M.C.P., Vasconcelos, M.T.S.D., 2008. An expeditious method for the determination of organochlorine pesticides residues in estuarine sediments using microwave assisted pre-extraction and automated headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta* 76, 1124–1129. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.035>
- Cazorla-Reyes, R., Fernandez-Moreno, J.L., Romero-Gonzalez, R., Garrido Frenich, A., Martinez Vidal, J.L., 2011. Single solid phase extraction method for the simultaneous analysis of polar and non-polar pesticides in urine samples by gas chromatography and ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta* 85, 183–196. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.03.048>
- Ccancapa, A., Masiá, A., Navarro-Ortega, A., Picó, Y., Barceló, D., 2016. Pesticides in the Ebro River basin: Occurrence and risk assessment. *Environmental Pollution* 211, 414–424. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.059>
- Ceballos, G., Ehrlich, P.R., Barnosky, A.D., García, A., Pringle, R.M., Palmer, T.M., 2015. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Sci. Adv.* 1, e1400253. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1400253>
- CEM, 2019a. Extraction of Pesticides from Cannabis. Application Note.
- CEM, 2019b. The Rapid Extraction of Pesticides from Cucumber, Tomato, and Green Pepper. Application Note.
- CEM, 2019c. Extraction of Pesticides from Spices Utilizing a Rapid and Automated Alternative to QuEChERS. Application Note.
- Chaemfa, C., Barber, J.L., Gocht, T., Harner, T., Holoubek, I., Klanova, J., Jones, K.C., 2008. Field calibration of polyurethane foam (PUF) disk passive air samplers for PCBs and OC pesticides. *Environmental Pollution* 156, 1290–1297. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.03.016>
- Chambers, J.E., Greim, H., Kendall, R.J., Segner, H., Sharpe, R.M., Van Der Kraak, G., 2014. Human and ecological risk assessment of a crop protection chemical: a case study with the azole fungicide epoxiconazole. *Critical Reviews in Toxicology* 44, 176–210. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.855163>
- Chata, C., M. Hardy, E., Grova, N., Appenzeller, B.M.R., 2016. Influence of pesticide physicochemical properties on the association between plasma and hair concentration. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408, 3601–3612. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9442-y>
- Chataing, A., 2016. Mesure des pesticides dans l’air campagne 2016.
- Chevrier, 2018. Les pesticides dans l’air - Bilan annuel 2018 - Atmo Nouvelle-Aquitaine 53.

- Codling, G., Al Naggar, Y., Giesy, J.P., Robertson, A.J., 2016. Concentrations of neonicotinoid insecticides in honey, pollen and honey bees (*Apis mellifera* L.) in central Saskatchewan, Canada. *Chemosphere* 144, 2321–2328. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.135>
- Cohen, M.L., Steinmetz, W.D., 1986. Foliar washoff of pesticides by rainfall. *Environmental Science & Technology* 20, 521–523. <https://doi.org/10.1021/es00147a014>
- Coscollà, C., Colin, P., Yahyaoui, A., Petrique, O., Yusà, V., Mellouki, A., Pastor, A., 2010. Occurrence of currently used pesticides in ambient air of Centre Region (France). *Atmospheric Environment* 44, 3915–3925. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2010.07.014>
- Coscollà, C., Hart, E., Pastor, A., Yusà, V., 2013. LC-MS characterization of contemporary pesticides in PM10 of Valencia Region, Spain. *Atmospheric Environment* 77, 394–403. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.05.022>
- Cotton, J., Leroux, F., Broudin, S., Poirel, M., Corman, B., Junot, C., Ducruix, C., 2016. Development and validation of a multiresidue method for the analysis of more than 500 pesticides and drugs in water based on on-line and liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Water Research* 104, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.075>
- Crowell, S.R., Henderson, W.M., Kenneke, J.F., Fisher, J.W., 2011. Development and application of a physiologically based pharmacokinetic model for triadimefon and its metabolite triadimenol in rats and humans. *Toxicology Letters* 205, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.05.1036>
- Cruz, J.M., 2015. Etude de la contamination par les pesticides des milieux eau, air et sols : développement de nouveaux outils et application à l'estuaire de la Gironde. Université de Bordeaux.
- Daan, S., Masman, D., Groenewold, A., 1990. Avian basal metabolic rates: their association with body composition and energy expenditure in nature. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 259, R333–R340. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1990.259.2.R333>
- Daniele, G., Lafay, F., Pelosi, C., Fritsch, C., Vulliet, E., 2018. Development of a method for the simultaneous determination of multi-class pesticides in earthworms by liquid chromatography coupled to tandem electrospray mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410, 5009–5018. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1151-2>
- Dauwe, T., Jaspers, V., Covaci, A., Schepens, P., Eens, M., 2005. Feathers as a nondestructive biomonitor for persistent organic pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 442. <https://doi.org/10.1897/03-596.1>
- David, A., Botías, C., Abdul-Sada, A., Goulson, D., Hill, E.M., 2015. Sensitive determination of mixtures of neonicotinoid and fungicide residues in pollen and single bumblebees using a scaled down QuEChERS method for exposure assessment. *Anal Bioanal Chem* 407, 8151–8162. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8986-6>
- De Gerónimo, E., Aparicio, V.C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S., Costa, J.L., 2014. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere* 107, 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.039>
- Debeljak, N., Horvat, S., Vouk, K., Lee, M., Rozman, D., 2000. Characterization of the Mouse Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51), a New Member of the Evolutionarily Most Conserved Cytochrome P450 Family. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 379, 37–45. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1859>
- Deniro, M.J., Epstein, S., 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 45, 341–351. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(81\)90244-1](https://doi.org/10.1016/0016-7037(81)90244-1)

- Direction Régionale de l'Agriculture et de la Forêt Nouvelle-Aquitaine, 2017. Agreste Nouvelle-Aquitaine - Analyse & Résultats - Juin 2017 - Numéro 43.
- DRAAF Nouvelle Aquitaine, 2016. La place de l'agriculture dans la grande région ALPC - Atlas : Aquitaine, Limousin et Poitou-Charentes.
- Duca, R.-C., Hardy, E., Salquèbre, G., Appenzeller, B.M.R., 2014a. Hair decontamination procedure prior to multi-class pesticide analysis. *Drug Testing* 12.
- Duca, R.-C., Salquebre, G., Hardy, E., Appenzeller, B.M.R., 2014b. Comparison of solid phase- and liquid/liquid-extraction for the purification of hair extract prior to multi-class pesticides analysis. *Journal of Chromatography B* 955–956, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.02.035>
- Dujakovic, N., Grujic, S., Radis̃ic, M., Vasiljevic, T., Laus̃evic, M., 2010. Determination of pesticides in surface and ground waters by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 10.
- El Azhari, N., Dermou, E., Barnard, R.L., Storck, V., Tourna, M., Beguet, J., Karas, P.A., Lucini, L., Rouard, N., Botteri, L., Ferrari, F., Trevisan, M., Karpouzias, D.G., Martin-Laurent, F., 2018. The dissipation and microbial ecotoxicity of tebuconazole and its transformation products in soil under standard laboratory and simulated winter conditions. *Science of The Total Environment* 637–638, 892–906. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.088>
- Eng, M.L., Hao, C., Watts, C., Sun, F., Morrissey, C.A., 2021. Characterizing imidacloprid and metabolites in songbird blood with applications for diagnosing field exposures. *Science of The Total Environment* 760, 143409. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143409>
- Eng, M.L., Stutchbury, B.J.M., Morrissey, C.A., 2019. A neonicotinoid insecticide reduces fueling and delays migration in songbirds. *Science* 365, 1177–1180. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9419>
- Eng, M.L., Stutchbury, B.J.M., Morrissey, C.A., 2017. Imidacloprid and chlorpyrifos insecticides impair migratory ability in a seed-eating songbird. *Sci Rep* 7, 15176. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15446-x>
- Espín, S., García-Fernández, A.J., Herzke, D., Shore, R.F., van Hattum, B., Martínez-López, E., Coeurdassier, M., Eulaers, I., Fritsch, C., Gómez-Ramírez, P., Jaspers, V.L.B., Krone, O., Duke, G., Helander, B., Mateo, R., Movalli, P., Sonne, C., van den Brink, N.W., 2016. Tracking pan-continental trends in environmental contamination using sentinel raptors—what types of samples should we use? *Ecotoxicology* 25, 777–801. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1636-8>
- Eulaers, I., Covaci, A., Herzke, D., Eens, M., Sonne, C., Moum, T., Schnug, L., Hanssen, S.A., Johnsen, T.V., Bustnes, J.O., Jaspers, V.L.B., 2011. A first evaluation of the usefulness of feathers of nestling predatory birds for non-destructive biomonitoring of persistent organic pollutants. *Environment International* 37, 622–630. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.12.007>
- European Food Safety Authority, 2013a. Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for flusilazole according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005: Review of the existing MRLs for flusilazole. *EFSA Journal* 11, 3186. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3186>
- European Food Safety Authority, 2013b. Reasoned opinion on the modification of the existing MRLs for tetraconazole in commodities of plant and animal origin: Modification of the existing MRLs for tetraconazole in various commodities. *EFSA Journal* 11, 3223. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3223>
- Expertise scientifique collective, I.– C., 2011. Pesticides, agriculture et environnement. Editions Quæ. <https://doi.org/10.3917/quæ.exper.2011.01>

- Fair, J.M., Paul, E., Jones, J., Clark, A.B., Davie, C., Kaiser, G., 2010. Guidelines to the use of wild birds in research 215.
- Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Peng, P., Zeng, E.Y., 2005. Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.10.005>
- Filigenzi, M.S., Graves, E.E., Tell, L.A., Jelks, K.A., Poppenga, R.H., 2019. Quantitation of neonicotinoid insecticides, plus qualitative screening for other xenobiotics, in small-mass avian tissue samples using UHPLC high-resolution mass spectrometry. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 31, 399–407. <https://doi.org/10.1177/1040638719834329>
- Ford, K.A., Casida, J.E., 2006. Unique and Common Metabolites of Thiamethoxam, Clothianidin, and Dinotefuran in Mice. *Chemical Research in Toxicology* 19, 1549–1556. <https://doi.org/10.1021/tx0601859>
- Francis, E.A., 2017. Paramount Roles of Wild Birds as Bioindicators of Contamination. *International International Journal of Avian & Wildlife Biology* 2. <https://doi.org/10.15406/ijawb.2017.02.00041>
- Fritsch, C., Coeurdassier, M., Faivre, B., Baurand, P.-E., Giraudoux, P., van den Brink, N.W., Scheifler, R., 2012. Influence of landscape composition and diversity on contaminant flux in terrestrial food webs: A case study of trace metal transfer to European blackbirds *Turdus merula*. *Science of The Total Environment* 432, 275–287. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.004>
- Fustinoni, S., Mercadante, R., Polledri, E., Rubino, F.M., Mandic-Rajcevic, S., Vianello, G., Colosio, C., Moretto, A., 2014. Biological monitoring of exposure to tebuconazole in winegrowers. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 24, 643–649. <https://doi.org/10.1038/jes.2014.14>
- Ganzler, K., Salgo, A., Valko, K., 1986. Microwave extraction : a novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography A* 371, 299–306.
- García-Fernández, A.J., Espín, S., Martínez-López, E., 2013. Feathers as a Biomonitoring Tool of Polyhalogenated Compounds: A Review. *Environmental Science & Technology* 47, 3028–3043. <https://doi.org/10.1021/es302758x>
- Gaweł, M., Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Semeniuk, S., Goliszek, M., Burek, O., Posyniak, A., 2019. Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 282, 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.003>
- Gbylik-Sikorska, M., Sniegocki, T., Posyniak, A., 2015. Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honey bee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 990, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.03.016>
- Gély, C.A., Huesca, A., Picard-Hagen, N., Toutain, P.L., Berrebi, A., Gauderat, G., Gayrard, V., Lacroix, M.Z., 2021. A new LC/MS method for specific determination of human systemic exposure to bisphenol A, F and S through their metabolites: Application to cord blood samples. *Environment International* 151, 106429. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106429>
- Gibbons, D., Morrissey, C., Mineau, P., 2015. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 103–118. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>
- Goetz, A.K., Ren, H., Schmid, J.E., Blystone, C.R., Thillainadarajah, I., Best, D.S., Nichols, H.P., Strader, L.F., Wolf, D.C., Narotsky, M.G., Rockett, J.C., Dix, D.J., 2007. Disruption of Testosterone Homeostasis as a Mode of Action for the Reproductive



- Toxicity of Triazole Fungicides in the Male Rat. *Toxicological Sciences* 95, 227–239. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl124>
- González-Gómez, X., Simal-Gándara, J., Fidalgo Alvarez, L.E., López-Beceiro, A.M., Pérez-López, M., Martínez-Carballo, E., 2020. Non-invasive biomonitoring of organic pollutants using feather samples in feral pigeons (*Columba livia domestica*). *Environmental Pollution* 267, 115672. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115672>
- Götz, C.W., Scheringer, M., MacLeod, M., Wegmann, F., Schenker, U., Hungerbühler, K., 2008. Dependence of Persistence and Long-Range Transport Potential on Gas-Particle Partitioning in Multimedia Models. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3690–3696. <https://doi.org/10.1021/es702619p>
- Goulson, D., 2013. Review: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J Appl Ecol* 50, 977–987. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>
- Graves, E.E., Jelks, K.A., Foley, J.E., Filigenzi, M.S., Poppenga, R.H., Ernest, H.B., Melnicoe, R., Tell, L.A., 2019. Analysis of insecticide exposure in California hummingbirds using liquid chromatography-mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research* 26, 15458–15466. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04903-x>
- Groffen, T., Lasters, R., Bervoets, L., Prinsen, E., Eens, M., 2020. Are Feathers of a Songbird Model Species (The Great Tit, *Parus major* ) Suitable for Monitoring Perfluoroalkyl Acids (PFAAs) in Blood Plasma? *Environ. Sci. Technol.* 54, 9334–9344. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c00652>
- Gross, M.S., Bean, T.G., Hladik, M.L., Rattner, B.A., Kuivila, K.M., 2020. Uptake, Metabolism, and Elimination of Fungicides from Coated Wheat Seeds in Japanese Quail (*Coturnix japonica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68, 1514–1524. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05668>
- Guarda, P.M., Gualberto, L. da S., Mendes, D.B., Guarda, E.A., da Silva, J.E.C., 2020. Analysis of triazines, triazoles, and benzimidazoles used as pesticides in different environmental compartments of the Formoso River and their influence on biodiversity in Tocantins. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 55, 783–793. <https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1784667>
- Gupta, S., Gajbhiye, V.T., Gupta, R.K., 2008. Soil Dissipation and Leaching Behavior of a Neonicotinoid Insecticide Thiamethoxam. *Bull Environ Contam Toxicol* 80, 431–437. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9420-y>
- Hai, X., Guo, M., Gao, C., Zhou, J., 2017. Quantification of hydroxyurea in human plasma by HPLC–MS/MS and its application to pharmacokinetics in patients with chronic myeloid leukaemia. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 137, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.01.008>
- Hallmann, C.A., Foppen, R.P.B., van Turnhout, C.A.M., de Kroon, H., Jongejans, E., 2014. Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature* 511, 341–343. <https://doi.org/10.1038/nature13531>
- Han, W., Tian, Y., Shen, X., 2018. Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. *Chemosphere* 192, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.149>
- Hao, C., Eng, M.L., Sun, F., Morrissey, C.A., 2018. Part-per-trillion LC-MS/MS determination of neonicotinoids in small volumes of songbird plasma. *Science of The Total Environment* 644, 1080–1087. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.317>
- Hao, C., Noestheden, M.R., Zhao, X., Morse, D., 2016. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of neonicotinoid pesticides and 6-chloronicotinic acid in environmental water with direct aqueous injection. *Analytica Chimica Acta* 925, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.04.024>

- Hao, W., Zhang, Y., Xu, P., Xie, Y., Li, W., Wang, H., 2021. Enantioselective accumulation, elimination and metabolism of fenbuconazole in lizards (*Eremias argus*). *Chemosphere* 271, 129482. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129482>
- Harada, K.H., Tanaka, K., Sakamoto, H., Imanaka, M., Niisoe, T., Hitomi, T., Kobayashi, H., Okuda, H., Inoue, S., Kusakawa, K., Oshima, M., Watanabe, K., Yasojima, M., Takasuga, T., Koizumi, A., 2016. Biological Monitoring of Human Exposure to Neonicotinoids Using Urine Samples, and Neonicotinoid Excretion Kinetics. *PLOS ONE* 11, e0146335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146335>
- Harris, M.P., 1971. Ecological Adaptations of Moults in Some British Gulls. *Bird Study* 18, 113–118. <https://doi.org/10.1080/00063657109476302>
- Hart, E., Coscollà, C., Pastor, A., Yusà, V., 2012. GC–MS characterization of contemporary pesticides in PM10 of Valencia Region, Spain. *Atmospheric Environment* 62, 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.08.006>
- Hermesen, S.A.B., Pronk, T.E., van den Brandhof, E.-J., van der Ven, L.T.M., Piersma, A.H., 2012. Triazole-induced gene expression changes in the zebrafish embryo. *Reproductive Toxicology* 34, 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.05.093>
- Herrero-Hernández, E., Andrades, M.S., Álvarez-Martín, A., Pose-Juan, E., Rodríguez-Cruz, M.S., Sánchez-Martín, M.J., 2013. Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region. *Journal of Hydrology* 486, 234–245. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2013.01.025>
- Heykants, J., Van Peer, A., Van de Velde, V., Van Rooy, P., Meuldermans, W., Lavrijsen, K., Woestenborghs, R., Van Cutsem, J., Cauwenbergh, G., 1989. The Clinical Pharmacokinetics of Itraconazole: An Overview. *Mycoses* 32, 67–87. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1989.tb02296.x>
- Hidalgo, C.M., Mora, M.A., Sericano, J.L., Mutch, B.D., Juergens, P.W., 2021. Persistent organic pollutants in eggs from south Texas Aplomado falcons. *Environmental Pollution* 268, 115685. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115685>
- Hirano, T., Yanai, S., Omotehara, T., Hashimoto, R., Umemura, Y., Kubota, N., Minami, K., Nagahara, D., Matsuo, E., Aihara, Y., Shinohara, R., Furuyashiki, T., Mantani, Y., Yokoyama, T., Kitagawa, H., Hoshi, N., 2015. The combined effect of clothianidin and environmental stress on the behavioral and reproductive function in male mice. *The Journal of Veterinary Medical Science* 77, 1207–1215. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0188>
- Hladik, M.L., Bradbury, S., Schulte, L.A., Helmers, M., Witte, C., Kolpin, D.W., Garrett, J.D., Harris, M., 2017. Neonicotinoid insecticide removal by prairie strips in row-cropped watersheds with historical seed coating use. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 241, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.03.015>
- Hobson, K.A., 1999. Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120, 314–326. <https://doi.org/10.1007/s004420050865>
- Hobson, K.A., Alisauskas, R.T., Clark, R.G., 1993. Stable-Nitrogen Isotope Enrichment in Avian Tissues Due to Fasting and Nutritional Stress: Implications for Isotopic Analyses of Diet. *The Condor* 95, 388. <https://doi.org/10.2307/1369361>
- Hou, J., Xie, W., Hong, D., Zhang, W., Li, F., Qian, Y., Han, C., 2019. Simultaneous determination of ten neonicotinoid insecticides and two metabolites in honey and Royal-jelly by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 270, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.068>
- Hulin, M., Leroux, C., Mathieu, A., Gouzy, A., Berthet, A., Boivin, A., Bonicelli, B., Chubilleau, C., Hulin, A., Leoz Garziandia, E., Mamy, L., Millet, M., Pernot, P., Quivet, E., Scelo, A.-L., Merlo, M., Ruelle, B., Bedos, C., 2021. Monitoring of pesticides in

- ambient air: Prioritization of substances. *Science of The Total Environment* 753, 141722. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141722>
- Humann-Guillemot, S., Clément, S., Desprat, J., Binkowski, Ł.J., Glauser, G., Helfenstein, F., 2019. A large-scale survey of house sparrows feathers reveals ubiquitous presence of neonicotinoids in farmlands. *Science of The Total Environment* 660, 1091–1097. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.068>
- Humann-Guillemot, S., Laurent, S., Bize, P., Roulin, A., Glauser, G., Helfenstein, F., 2021. Contamination by neonicotinoid insecticides in barn owls (*Tyto alba*) and Alpine swifts (*Tachymarptis melba*). *Science of The Total Environment* 785, 147403. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147403>
- Jaspers, V.L.B., Covaci, A., Deleu, P., Neels, H., Eens, M., 2008. Preen oil as the main source of external contamination with organic pollutants onto feathers of the common magpie (*Pica pica*). *Environment International* 34, 741–748. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.12.002>
- Jaspers, V.L.B., Covaci, A., Herzke, D., Eulaers, I., Eens, M., 2019. Bird feathers as a biomonitor for environmental pollutants: Prospects and pitfalls. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 118, 223–226. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.019>
- Jaspers, V.L.B., Voorspoels, S., Covaci, A., Lepoint, G., Eens, M., 2007. Evaluation of the usefulness of bird feathers as a non-destructive biomonitoring tool for organic pollutants: A comparative and meta-analytical approach. *Environment International* 33, 328–337. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.11.011>
- Jones, A., Turnbull, G., 2016. Neonicotinoid concentrations in UK honey from 2013: Neonicotinoid concentrations in UK honey. *Pest Management Science* 72, 1897–1900. <https://doi.org/10.1002/ps.4227>
- Jury, W.A., Spencer, W.F., Farmer, W.J., 1984. Behavior Assessment Model for Trace Organics in Soil: IV. Review of Experimental Evidence. *Journal of Environmental Quality* 13, 580–586. <https://doi.org/10.2134/jeq1984.00472425001300040014x>
- Kammoun, S., Mulhauser, B., Aebi, A., Mitchell, E.A.D., Glauser, G., 2019. Ultra-trace level determination of neonicotinoids in honey as a tool for assessing environmental contamination. *Environmental Pollution* 247, 964–972. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.004>
- Kapoor, U., Srivastava, M.K., Trivedi, P., Garg, V., Srivastava, L.P., 2014. Disposition and acute toxicity of imidacloprid in female rats after single exposure. *Food and Chemical Toxicology* 68, 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.019>
- Karacık, B., Okay, O.S., Henkelmann, B., Pfister, G., Schramm, K.-W., 2013. Water concentrations of PAH, PCB and OCP by using semipermeable membrane devices and sediments. *Marine Pollution Bulletin* 70, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.02.031>
- Kavvalakis, M.P., Tzatzarakis, M.N., Theodoropoulou, E.P., Barbounis, E.G., Tsakalof, A.K., Tsatsakis, A.M., 2013. Development and application of LC–APCI–MS method for biomonitoring of animal and human exposure to imidacloprid. *Chemosphere* 93, 2612–2620. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.087>
- Kelly, J.F., 2000. Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology 78, 27.
- Kintz, P. (Ed.), 2007. Analytical and practical aspects of drug testing in hair, Forensic science series. CRC/Taylor & Francis, Boca Raton, FL.
- Klaassen, C., Casarett, L.J., Doull, J., 2013. Casarett & Doull's Toxicology. McGraw-Hill Publishing, Blacklick.

- Kleier, D., Holden, I., Casida, J.E., Ruzo, L.O., 1985. Novel photoreactions of an insecticidal nitromethylene heterocycle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33, 998–1000. <https://doi.org/10.1021/jf00065a054>
- Kolberg, D.I.S., Zechmann, S., Wildgrube, C., Sigalov, I., Scherbaum, E., Anastassiades, M., 2016. Determination of Triazole Derivative Metabolites (TDMs) in Fruit and Vegetables using the QuPPE Method and Differential Mobility Spectrometry (DMS) and Survey of the Residue Situation in Organic and Conventional Produce 31.
- Kucharska, K., Binkowski, Ł.J., Dudzik, K., 2021. Spatial and temporal trends in mercury levels in the down of black stork chicks in central Europe. *Environmental Pollution* 274, 116571. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116571>
- Kwok, E.S.C., Atkinson, R., 1995. Estimation of hydroxyl radical reaction rate constants for gas-phase organic compounds using a structure-reactivity relationship: an update. *Atmospheric Environment* 29, 1685–1695.
- Lanz, B., Dietz, S., Swanson, T., 2018. The Expansion of Modern Agriculture and Global Biodiversity Decline: An Integrated Assessment. *Ecological Economics* 144, 260–277. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2017.07.018>
- Lasters, R., Groffen, T., Bervoets, L., Eens, M., 2021. Perfluoroalkyl acid (PFAA) profile and concentrations in two co-occurring tit species: distinct differences indicate non-generalizable results across passerines. *Science of The Total Environment* 761, 143301. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143301>
- Lasters, R., Groffen, T., Lopez-Antia, A., Bervoets, L., Eens, M., 2019. Variation in PFAA concentrations and egg parameters throughout the egg-laying sequence in a free-living songbird (the great tit, *Parus major*): Implications for biomonitoring studies. *Environmental Pollution* 246, 237–248. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.014>
- LeBlanc, G.A., 1995. Trophic-Level Differences in the Bioconcentration of Chemicals: Implications in Assessing Environmental Biomagnification. *Environmental Science & Technology* 29, 154–160. <https://doi.org/10.1021/es00001a020>
- Lehmann, E., Oltramare, C., de Alencastro, L.F., 2018a. Development of a modified QuEChERS method for multi-class pesticide analysis in human hair by GC-MS and UPLC-MS/MS. *Analytica Chimica Acta* 999, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.009>
- Lehmann, E., Oltramare, C., Nfon Dibié, J.-J., Konaté, Y., de Alencastro, L.F., 2018b. Assessment of human exposure to pesticides by hair analysis: The case of vegetable-producing areas in Burkina Faso. *Environment International* 111, 317–331. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.025>
- Lehotay, S.J., 2011. QuEChERS Sample Preparation Approach for Mass Spectrometric Analysis of Pesticide Residues in Foods, in: Zweigenbaum, J. (Ed.), *Mass Spectrometry in Food Safety, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 65–91. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-136-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-136-9_4)
- Lennon, R.J., Peach, W.J., Dunn, J.C., Shore, R.F., Pereira, M.G., Sleep, D., Dodd, S., Wheatley, C.J., Arnold, K.E., Brown, C.D., 2020a. From seeds to plasma: Confirmed exposure of multiple farmland bird species to clothianidin during sowing of winter cereals. *Science of The Total Environment* 723, 138056. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138056>
- Lennon, R.J., Shore, R.F., Pereira, M.G., Peach, W.J., Dunn, J.C., Arnold, K.E., Brown, C.D., 2020b. High prevalence of the neonicotinoid clothianidin in liver and plasma samples collected from gamebirds during autumn sowing. *Science of The Total Environment* 742, 140493. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140493>
- Lévy, M., Ba, H., Pallares, C., Pham-Huu, C., Millet, M., 2020. Comparison and calibration of diverse passive samplers used for the air sampling of pesticides during a regional

- sampling monitoring campaign. *Atmospheric Pollution Research* 11, 1217–1225. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2020.03.014>
- Li, Jitong, Wang, Y., Li, W., Xu, P., Guo, B., Li, Jianzhong, Wang, H., 2017. Tissue distribution and metabolism of triadimefon and triadimenol enantiomers in Chinese lizards (*Eremias argus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142, 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.035>
- Li, S., Pike, E., 2013. Simple and Fast Quantitation of Nicotinic Acid and Nicotinamide in Human Plasma by Applying Impact™ Protein Precipitation Plate Technology with Gemini® 3 µm C18 HPLC Columns - Phenomenex Application 4.
- Liao, P.-H., Chu, S.-H., Tu, T.-Y., Wang, X.-H., Lin, A.Y.-C., Chen, P.-J., 2014. Persistent endocrine disruption effects in medaka fish with early life-stage exposure to a triazole-containing aromatase inhibitor (letrozole). *Journal of Hazardous Materials* 277, 141–149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.02.013>
- Lonare, M., Kumar, M., Raut, S., Badgajar, P., Doltade, S., Telang, A., 2014. Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: A protective effect of curcumin. *Neurochemistry International* 78, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.09.004>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., Camarero, P.R., Mateo, R., 2021. Birds feeding on tebuconazole treated seeds have reduced breeding output. *Environmental Pollution* 271, 116292. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116292>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., Camarero, P.R., Mateo, R., 2018. Brood size is reduced by half in birds feeding on flutriafol-treated seeds below the recommended application rate. *Environmental Pollution* 243, 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.078>
- López-Gálvez, N., Wagoner, R., Canales, R.A., de Zapien, J., Calafat, A.M., Ospina, M., Rosales, C., Beamer, P., 2020. Evaluating imidacloprid exposure among grape field male workers using biological and environmental assessment tools: An exploratory study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 230, 113625. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113625>
- Løseth, M.E., Briels, N., Flo, J., Malarvannan, G., Poma, G., Covaci, A., Herzke, D., Nygård, T., Bustnes, J.O., Jenssen, B.M., Jaspers, V.L.B., 2019. White-tailed eagle (*Haliaeetus albicilla*) feathers from Norway are suitable for monitoring of legacy, but not emerging contaminants. *Science of The Total Environment* 647, 525–533. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.333>
- Love, R.A., Webon, C., Glue, D.E., Harris, S., Harris, S., 2000. Changes in the food of British Barn Owls (*Tyto alba*) between 1974 and 1997. *Mammal Review* 30, 107–129. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2907.2000.00060.x>
- LPO, 2012. Liste des oiseaux d'Aquitaine.
- Luzardo, O.P., Almeida-Gonzalez, M., Ruiz-Suarez, N., Zumbado, M., Henriquez-Hernandez, L.A., Meilan, M.J., Camacho, M., Boada, L.D., 2015. Validated analytical methodology for the simultaneous determination of a wide range of pesticides in human blood using GC–MS/MS and LC–ESI/MS/MS and its application in two poisoning cases. *Science & Justice* 55, 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2015.04.007>
- Magill, S.S., Puthanakit, T., Swoboda, S.M., Carson, K.A., Salvatori, R., Lipsett, P.A., Hendrix, C.W., 2004. Impact of Fluconazole Prophylaxis on Cortisol Levels in Critically Ill Surgical Patients. *AAC* 48, 2471–2476. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2471-2476.2004>
- Maienfisch, P., Angst, M., Brandl, F., Fischer, W., Hofer, D., Kayser, H., Kobel, W., Rindlisbacher, A., Senn, R., Steinemann, A., Widmer, H., 2001. Chemistry and biology

- of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. *Pest Management Science* 57, 906–913. <https://doi.org/10.1002/ps.365>
- Markowski, M., Kaliński, A., Skwarska, J., Wawrzyniak, J., Bańbura, M., Markowski, J., Zieliński, P., Bańbura, J., 2013. Avian Feathers as Bioindicators of the Exposure to Heavy Metal Contamination of Food. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91, 302–305. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1065-9>
- Masiá, A., Vásquez, K., Campo, J., Picó, Y., 2015. Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges. Application to the Túria River Basin. *Journal of Chromatography A* 1378, 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.079>
- Mayer, P., Tolls, J., Hermens, J.L.M., Mackay, D., 2003. Equilibrium sampling devices. *Environmental Science & Technology* 8.
- McGuill, M.W., Rowan, A.N., 1989. Biological Effects of Blood Loss: Implications for Sampling Volumes and Techniques \* Commentary: H. Richard Adams. *ILAR Journal* 31, 5–20. <https://doi.org/10.1093/ilar.31.4.5>
- Mercadante, R., Polledri, E., Giavini, E., Menegola, E., Bertazzi, P.A., Fustinoni, S., 2012. Terbutylazine in hair as a biomarker of exposure. *Toxicology Letters* 210, 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.018>
- Mercadante, R., Polledri, E., Moretto, A., Fustinoni, S., 2018. Long-term occupational and environmental exposure to penconazole and tebuconazole by hair biomonitoring. *Toxicology Letters* 298, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.06.002>
- Mercadante, R., Polledri, E., Rubino, F.M., Mandic-Rajcevic, S., Vaiani, A., Colosio, C., Moretto, A., Fustinoni, S., 2019. Assessment of penconazole exposure in winegrowers using urinary biomarkers. *Environmental Research* 168, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.09.013>
- Millot, F., Decors, A., Mastain, O., Quintaine, T., Berny, P., Vey, D., Lasseur, R., Bro, E., 2017. Field evidence of bird poisonings by imidacloprid-treated seeds: a review of incidents reported by the French SAGIR network from 1995 to 2014. *Environ Sci Pollut Res* 24, 5469–5485. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8272-y>
- Minagawa, M., Wada, E., 1984. Stepwise enrichment of  $^{15}\text{N}$  along food chains: Further evidence and the relation between  $\delta^{15}\text{N}$  and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48, 1135–1140. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(84\)90204-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(84)90204-7)
- Mineau, P., Whiteside, M., 2013. Pesticide Acute Toxicity Is a Better Correlate of U.S. Grassland Bird Declines than Agricultural Intensification. *PLoS ONE* 8, e57457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057457>
- Mitchell, E.A.D., Mulhauser, B., Mulo, M., Mutabazi, A., Glauser, G., Aebi, A., 2017. A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science* 358, 109–111. <https://doi.org/10.1126/science.aan3684>
- Mohring, B., Brischoux, F., Angelier, F., 2021. Vineyards, but not cities, are associated with lower presence of a generalist bird, the Common Blackbird (*Turdus merula*), in Western France. *Avian Res* 12, 3. <https://doi.org/10.1186/s40657-020-00239-0>
- Montiel-León, J.M., Duy, S.V., Munoz, G., Amyot, M., Sauvé, S., 2018. Evaluation of on-line concentration coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the quantification of neonicotinoids and fipronil in surface water and tap water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410, 2765–2779. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0957-2>
- Munoz, G., Labadie, P., Geneste, E., Pardon, P., Tartu, S., Chastel, O., Budzinski, H., 2017. Biomonitoring of fluoroalkylated substances in Antarctica seabird plasma: Development and validation of a fast and rugged method using on-line concentration

- liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1513, 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.024>
- Musatadi, M., González-Gaya, B., Irazola, M., Prieto, A., Etxebarria, N., Olivares, M., Zuloaga, O., 2020. Focused ultrasound-based extraction for target analysis and suspect screening of organic xenobiotics in fish muscle. *Science of The Total Environment* 740, 139894. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139894>
- Nasiri, M., Ahmadzadeh, H., Amiri, A., 2020. Sample preparation and extraction methods for pesticides in aquatic environments: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 123, 115772. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115772>
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Salgado, V.L., Kaussmann, M., 2003. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 76, 55–69. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(03\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(03)00065-8)
- Navarro, S., Barba, A., Navarro, G., Vela, N., Oliva, J., 2000. Multiresidue method for the rapid determination – in grape, must and wine – of fungicides frequently used on vineyards. *Journal of Chromatography A* 882, 221–229. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00337-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00337-X)
- Neitsch, S.L., Arnold, J.G., Kiniry, J.R., Williams, J.R., 2005. Soil and water assessment tool theoretical documentation 494.
- Nomura, H., Ueyama, J., Kondo, T., Saito, I., Murata, K., Iwata, T., Wakusawa, S., Kamijima, M., 2013. Quantitation of neonicotinoid metabolites in human urine using GC-MS. *Journal of Chromatography B* 941, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.10.012>
- Nozal, M.J., Bernal, J.L., Toribio, L., Jimenez, J.J., Martin, M.T., 2001. High-performance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honeyq. *J. Chromatogr. A* 9.
- Özdemir, H.H., Kara, M., Yumrutas, O., Uckardes, F., Eraslan, E., Demir, C.F., Bal, R., 2014. Determination of the effects on learning and memory performance and related gene expressions of clothianidin in rat models. *Cogn Neurodyn* 8, 411–416. <https://doi.org/10.1007/s11571-014-9293-1>
- Paap, R., 2010. Les propriétés environnementales des substances.
- Pelosi, C., Bertrand, C., Daniele, G., Coeurdassier, M., Benoit, P., Nélieu, S., Lafay, F., Bretagnolle, V., Gaba, S., Vulliet, E., Fritsch, C., 2021. Residues of currently used pesticides in soils and earthworms: A silent threat? *Agriculture, Ecosystems & Environment* 305, 107167. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107167>
- Peng, F.-J., Hardy, E.M., Mezzache, S., Bourokba, N., Palazzi, P., Stojiljkovic, N., Bastien, P., Li, J., Soeur, J., Appenzeller, B.M.R., 2020. Exposure to multiclass pesticides among female adult population in two Chinese cities revealed by hair analysis. *Environment International* 138, 105633. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105633>
- Peng, Y., Fang, W., Krauss, M., Brack, W., Wang, Z., Li, F., Zhang, X., 2018. Screening hundreds of emerging organic pollutants (EOPs) in surface water from the Yangtze River Delta (YRD): Occurrence, distribution, ecological risk. *Environmental Pollution* 241, 484–493. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.061>
- Pérez-Carrera, E., León, V.M.L., Parra, A.G., González-Mazo, E., 2007. Simultaneous determination of pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in seawater and interstitial marine water samples, using stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1170, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.09.013>
- Pesticide properties database (PPDB), 2021. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>

- Pflieger, M., 2009. Etude de la dégradation photochimique des pesticides adsorbés à la surface de particules atmosphériques.
- Pierdet, M., 2020. Evolution spatiale et temporelle de la mobilité des contaminants organiques et inorganiques dans des sols viticoles contrastés.
- Pinto, M.I., Vale, C., Sontag, G., Noronha, J.P., 2013. Effects of ultrasonic irradiation and direct heating on extraction of priority pesticides from marine sediments. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 93, 1638–1659. <https://doi.org/10.1080/03067319.2013.831409>
- Polledri, E., Mercadante, R., Fustinoni, S., 2020. A liquid chromatography tandem mass spectrometry method to assess 41 pesticides in human hair. *Journal of Chromatography B* 1159, 122389. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122389>
- Polledri, E., Mercadante, R., Fustinoni, S., 2018. Determination of tebuconazole and penconazole fungicides in rat and human hair by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 32, 1243–1249. <https://doi.org/10.1002/rcm.8153>
- Polledri, E., Mercadante, R., Nijssen, R., Consonni, D., Mol, H., Fustinoni, S., 2019. Hair as a matrix to evaluate cumulative and aggregate exposure to pesticides in winegrowers. *Science of The Total Environment* 687, 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.061>
- Potter, T.L., Strickland, T.C., Joo, H., Culbreath, A.K., 2005. Accelerated Soil Dissipation of Tebuconazole following Multiple Applications to Peanut. *J. Environ. Qual.* 34, 1205–1213. <https://doi.org/10.2134/jeq2004.0473>
- Pozo, K., Harner, T., Wania, F., Muir, D.C.G., Jones, K.C., Barrie, L.A., 2006. Toward a Global Network for Persistent Organic Pollutants in Air: Results from the GAPS Study. *Environmental Science & Technology* 40, 4867–4873. <https://doi.org/10.1021/es060447t>
- Pragst, F., Balikova, M.A., 2006. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta* 370, 17–49. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.02.019>
- Prosser, P., Hart, A.D.M., 2005. Assessing Potential Exposure of Birds to Pesticide-Treated Seeds. *Ecotoxicology* 14, 679–691. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0018-4>
- Raherison, C., Baldi, I., Pouquet, M., Berteaud, E., Moesch, C., Bouvier, G., Canal-Raffin, M., 2019. Pesticides Exposure by Air in Vineyard Rural Area and Respiratory Health in Children: A pilot study. *Environmental Research* 169, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.002>
- Redpath, S.M., Clarke, R., Madders, M., Thirgood, S.J., 2001. Assessing raptor diet: comparing pellets, prey remains, and observational data at Hen Harrier nests. *The Condor* 103, 184. [https://doi.org/10.1650/0010-5422\(2001\)103\[0184:ARDCPP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1650/0010-5422(2001)103[0184:ARDCPP]2.0.CO;2)
- Reif, J., Hanzelka, J., 2020. Continent-wide gradients in open-habitat insectivorous bird declines track spatial patterns in agricultural intensity across Europe. *Global Ecol. Biogeogr.* 29, 1988–2013. <https://doi.org/10.1111/geb.13170>
- Rexrode, M., Barrett, M., Ellis, J., Patrick, G., Vaughan, A., Felkel, J., Melendez, J., 2003. EFED risk assessment for the seed treatment of clothianidin 600FS on corn and canola.
- Richardson, S.D., 2010. Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* 82, 4742–4774. <https://doi.org/10.1021/ac101102d>
- Richter, B.E., Raynie, D., 2012. Accelerated Solvent Extraction (ASE) and High-Temperature Water Extraction, in: *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. Elsevier, pp. 105–115. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00047-8>



- Robinson, J.F., Tonk, E.C.M., Verhoef, A., Piersma, A.H., 2012. Triazole induced concentration-related gene signatures in rat whole embryo culture. *Reproductive Toxicology* 34, 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.05.088>
- Rodrigues, K.J.A., Santana, M.B., Do Nascimento, J.L.M., Picanço-Diniz, D.L.W., Maués, L.A.L., Santos, S.N., Ferreira, V.M.M., Alfonso, M., Durán, R., Faro, L.R.F., 2010. Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.04.021>
- Roelofs, M.J.E., Temming, A.R., Piersma, A.H., van den Berg, M., van Duursen, M.B.M., 2014. Conazole fungicides inhibit Leydig cell testosterone secretion and androgen receptor activation in vitro. *Toxicology Reports* 1, 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.05.006>
- Rolke, D., Persigehl, M., Peters, B., Sterk, G., Blenau, W., 2016. Large-scale monitoring of effects of clothianidin-dressed oilseed rape seeds on pollinating insects in northern Germany: residues of clothianidin in pollen, nectar and honey. *Ecotoxicology* 25, 1691–1701. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1723-x>
- Roy, C.L., Jankowski, M., Ponder, J., Chen, D., 2020. Sub-lethal and Lethal Methods to Detect Recent Imidacloprid Exposure in Birds with Application to Field Studies: Detecting Recent Imidacloprid Exposure in Birds. *Environmental Toxicology and Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/etc.4721>
- Rubenstein, D.R., Hobson, K.A., 2004. From birds to butterflies: animal movement patterns and stable isotopes. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.03.017>
- Rutkowska, M., Płotka-Wasyłka, J., Lubinska-Szczygeł, M., Róžańska, A., Możejko-Ciesielska, J., Namieśnik, J., 2018. Birds' feathers – Suitable samples for determination of environmental pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 109, 97–115. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.022>
- Sacchetto, É., Ali, D., Dumontet, E., Carrer, D.L., Orsonneau, J.-L., Delaroche, O., Bigot-Corbel, E., 2014. Influence of anticoagulant on the plasma level of fifteen biochemical parameters. *Annales de Biologie Clinique* 72, 337–350. <https://doi.org/10.1684/abc.2014.0959>
- Sanford, L.L., Webb, R.E., 1977. Loss of yield in potato selections infested with potato leafhoppers. *American Potato Journal* 54, 581–586. <https://doi.org/10.1007/BF02855285>
- Schaafsma, A., Limay-Rios, V., Baute, T., Smith, J., Xue, Y., 2015. Neonicotinoid Insecticide Residues in Surface Water and Soil Associated with Commercial Maize (Corn) Fields in Southwestern Ontario. *PLoS ONE* 10, e0118139. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118139>
- Scheifler, R., Cœurassier, M., Morilhat, C., Bernard, N., Faivre, B., Flicoteaux, P., Giraudoux, P., Noël, M., Piotte, P., Rieffel, D., de Vaufléury, A., Badot, P.-M., 2006. Lead concentrations in feathers and blood of common blackbirds (*Turdus merula*) and in earthworms inhabiting unpolluted and moderately polluted urban areas. *Science of The Total Environment* 371, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.09.011>
- Schermerhorn, P.G., Golden, P.E., Krynitsky, A.J., Leimkuehler, W.M., 2005. Determination of 22 Triazole Compounds Including Parent Fungicides and Metabolites in Apples, Peaches, Flour, and Water by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International* 88, 1491–1502.
- Scheurer, M., Brauch, H.-J., Schmidt, C.K., Sacher, F., 2016. Occurrence and fate of nitrification and urease inhibitors in the aquatic environment. *Environmental Science: Processes & Impacts* 18, 999–1010. <https://doi.org/10.1039/C6EM00014B>

- Schummer, C., Mothiron, E., Appenzeller, B.M.R., Rizet, A.-L., Wennig, R., Millet, M., 2010. Temporal variations of concentrations of currently used pesticides in the atmosphere of Strasbourg, France. *Environmental Pollution* 158, 576–584. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.08.019>
- Schummer, C., Salquère, G., Briand, O., Millet, M., Appenzeller, B.M.R., 2012. Determination of farm workers' exposure to pesticides by hair analysis. *Toxicology Letters* 210, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.019>
- Sebastiano, M., Jouanneau, W., Blévin, P., Angelier, F., Parenteau, C., Gernigon, J., Lemesle, J.C., Robin, F., Pardon, P., Budzinski, H., Labadie, P., Chastel, O., 2021. High levels of fluoroalkyl substances and potential disruption of thyroid hormones in three gull species from South Western France. *Science of The Total Environment* 765, 144611. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144611>
- Seethapathy, S., Górecki, T., Li, X., 2008. Passive sampling in environmental analysis. *Journal of Chromatography A* 1184, 234–253. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.07.070>
- Seifrtova, M., Halesova, T., Sulcova, K., Riddelova, K., Erban, T., 2017. Distributions of imidacloprid, imidacloprid-olefin and imidacloprid-urea in green plant tissues and roots of rapeseed (*Brassica napus*) from artificially contaminated potting soil: Key imidacloprid metabolites in rapeseed from soil contamination. *Pest. Manag. Sci.* 73, 1010–1016. <https://doi.org/10.1002/ps.4418>
- Shao, X., Liu, Z., Xu, X., Li, Z., Qian, X., 2013. Overall status of neonicotinoid insecticides in China: Production, application and innovation. *Journal of Pesticide Science* 38, 1–9. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D12-037>
- Shao, X., Ye, Z., Bao, H., Liu, Z., Xu, X., Li, Z., Qian, X., 2011. Advanced Research on cis-Neonicotinoids. *CHIMIA International Journal for Chemistry* 65, 957–960. <https://doi.org/10.2533/chimia.2011.957>
- Shlosberg, A., Rumbelha, W.K., Lublin, A., Kannan, K., 2011. A database of avian blood spot examinations for exposure of wild birds to environmental toxicants: the DABSE biomonitoring project. *Journal of Environmental Monitoring* 13, 1547. <https://doi.org/10.1039/c0em00754d>
- Shoeib, M., Harner, T., 2002. Characterization and Comparison of Three Passive Air Samplers for Persistent Organic Pollutants. *Environmental Science & Technology* 36, 4142–4151.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J.P., Whitehorn, P.R., Wiemers, M., 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 5–34. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>
- Simonovici, M., 2016. Enquête Pratiques phytosanitaires en viticulture en 2016 50.
- Soloway, S.B., Henry, A.C., Kollmeyer, W.D., Padgett, W.M., Powell, J.E., Roman, S.A., Tieman, C.H., Corey, R.A., Horne, C.A., 1978. Nitromethylene Heterocycles as Insecticides, in: Shankland, D.L., Hollingworth, R.M., Smyth, T. (Eds.), *Pesticide and Venom Neurotoxicity*. Springer US, Boston, MA, pp. 153–158. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8834-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8834-4_12)
- Sparks, T.C., Nauen, R., 2015. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 121, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014>

- Stivaktakis, P.D., Kavvalakis, M.P., Tzatzarakis, M.N., Alegakis, A.K., Panagiotakis, M.N., Fragkiadaki, P., Vakonaki, E., Ozcagli, E., Hayes, W.A., Rakitskii, V.N., Tsatsakis, A.M., 2016. Long-term exposure of rabbits to imidacloprid as quantified in blood induces genotoxic effect. *Chemosphere* 149, 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.040>
- Storck, V., Lucini, L., Mamy, L., Ferrari, F., Papadopoulou, E.S., Nikolaki, S., Karas, P.A., Servien, R., Karpouzas, D.G., Trevisan, M., Benoit, P., Martin-Laurent, F., 2016. Identification and characterization of tebuconazole transformation products in soil by combining suspect screening and molecular typology. *Environmental Pollution* 208, 537–545. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.10.027>
- Stromstedt, M., Rozman, D., Waterman, M.R., 1996. The Ubiquitously Expressed Human CYP51 Encodes Lanosterol 14a-Demethylase, a Cytochrome P450 Whose Expression Is Regulated by Oxysterols 9.
- Suchail, Séverine, De Sousa, G., Rahmani, R., Belzunces, L.P., 2004. In vivo distribution and metabolisation of <sup>14</sup>C-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest. Manag. Sci.* 60, 1056–1062. <https://doi.org/10.1002/ps.895>
- Suchail, Severine, Debrauwer, L., Belzunces, L.P., 2004. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest. Manag. Sci.* 60, 291–296. <https://doi.org/10.1002/ps.772>
- Sun, L., Lee, H.K., 2003. Optimization of microwave-assisted extraction and supercritical fluid extraction of carbamate pesticides in soil by experimental design methodology. *Journal of Chromatography A* 1014, 165–177. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00574-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00574-0)
- Szafarz, M., Lomnicka, M., Sternak, M., Chlopicki, S., Szymura-Oleksiak, J., 2010. Simultaneous determination of nicotinic acid and its four metabolites in rat plasma using high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection (LC/MS/MS). *Journal of Chromatography B* 878, 895–902. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.02.009>
- Taira, K., Fujioka, K., Aoyama, Y., 2013. Qualitative Profiling and Quantification of Neonicotinoid Metabolites in Human Urine by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *PLoS ONE* 8, e80332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080332>
- Taliansky-Chamudis, A., Gómez-Ramírez, P., León-Ortega, M., García-Fernández, A.J., 2017. Validation of a QuEChERS method for analysis of neonicotinoids in small volumes of blood and assessment of exposure in Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*) nestlings. *Science of The Total Environment* 595, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.246>
- Thode, H.G., Grinenko, V.A., 1991. Sulphur Isotopes in Nature and the Environment: An Overview.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671–677. <https://doi.org/10.1038/nature01014>
- Toda, M., Beer, K.D., Kuivila, K.M., Chiller, T.M., Jackson, B.R., 2021. Trends in Agricultural Triazole Fungicide Use in the United States, 1992–2016 and Possible Implications for Antifungal-Resistant Fungi in Human Disease. *Environ Health Perspect* 129, EHP7484, 055001. <https://doi.org/10.1289/EHP7484>
- Toennes, S.W., Kauert, G.F., Steinmeyer, S., Moeller, M.R., 2005. Driving under the influence of drugs — evaluation of analytical data of drugs in oral fluid, serum and urine, and correlation with impairment symptoms. *Forensic Science International* 152, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.08.002>
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45, 247–268. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>

- Trösken, E.R., Bittner, N., Völkel, W., 2005. Quantitation of 13 azole fungicides in wine samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1083, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.020>
- Tuduri, L., Harner, T., Hung, H., 2006. Polyurethane foam (PUF) disks passive air samplers: Wind effect on sampling rates. *Environmental Pollution* 144, 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.047>
- Turaga, U., Peper, S.T., Dunham, N.R., Kumar, N., Kistler, W., Almas, S., Presley, S.M., Kendall, R.J., 2016. A survey of neonicotinoid use and potential exposure to northern bobwhite (*Colinus virginianus*) and scaled quail (*Callipepla squamata*) in the Rolling Plains of Texas and Oklahoma: Neonicotinoid use and potential exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35, 1511–1515. <https://doi.org/10.1002/etc.3305>
- Tutudaki, M., Tsatsakis, A.M., 2005. Pesticide Hair Analysis: Development of a GC-NCI-MS Method to Assess Chronic Exposure to Diazinon in Rats. *Journal of Analytical Toxicology* 29, 805–809. <https://doi.org/10.1093/jat/29.8.805>
- Uroz, F.J., Arrebola, F.J., Egea-González, F.J., Martínez-Vidal, J.L., 2001. Monitoring of 6-chloronicotinic acid in human urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry as indicator of exposure to the pesticide imidacloprid. *The Analyst* 126, 1355–1358. <https://doi.org/10.1039/b101167g>
- van der Pas, R., Hofland, L.J., Hofland, J., Taylor, A.E., Arlt, W., Steenbergen, J., van Koetsveld, P.M., de Herder, W.W., de Jong, F.H., Feelders, R.A., 2012. Fluconazole inhibits human adrenocortical steroidogenesis in vitro. *Journal of Endocrinology* 215, 403–412. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0310>
- Van Lexmond, M.B., Bonmatin, J.-M., Goulson, D., Noome, D.A., 2015. Worldwide integrated assessment on systemic pesticides: Global collapse of the entomofauna: exploring the role of systemic insecticides. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 1–4. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3220-1>
- Vanden Bossche, H., Marichal, P., Gorrens, J., Bellens, D., Verhoeven, H., Coene, M.-C., Lauwers, W., Janssen, P.A.J., 1987. Interaction of azole derivatives with cytochrome P-450 isozymes in yeast, fungi, plants and mammalian cells. *Pestic. Sci.* 21, 289–306. <https://doi.org/10.1002/ps.2780210406>
- Vander Zanden, M.J., Casselman, J.M., Rasmussen, J.B., 1999. Stable isotope evidence for the food web consequences of species invasions in lakes. *Nature* 401, 464–467. <https://doi.org/10.1038/46762>
- Vandevenne, M., Vandenbussche, H., Verstraete, A., 2000. Detection Time of Drugs of Abuse in Urine. *Acta Clinica Belgica* 55, 323–333. <https://doi.org/10.1080/17843286.2000.11754319>
- Venugopal, D., Subramanian, M., Rajamani, J., Palaniyappan, J., Samidurai, J., Arumugam, A., 2020. Levels and distribution pattern of organochlorine pesticide residues in eggs of 22 terrestrial birds from Tamil Nadu, India. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 39253–39264. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09978-5>
- Verstraete, A.G., 2002. Fenêtres de détection des xénobiotiques dans le sang, les urines, la salive et les cheveux. *Annales de Toxicologie Analytique* 14, 390–394. <https://doi.org/10.1051/ata/2002006>
- Verweij, F., Booij, K., Satumalay, K., van der Molen, N., van der Oost, R., 2004. Assessment of bioavailable PAH, PCB and OCP concentrations in water, using semipermeable membrane devices (SPMDs), sediments and caged carp. *Chemosphere* 54, 1675–1689. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.10.002>

- Vohra, P., Khera, K.S., Sangha, G.K., 2014. Physiological, biochemical and histological alterations induced by administration of imidacloprid in female albino rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 110, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.02.007>
- Vrana, B., Allan, I.J., Greenwood, R., Mills, G.A., Dominiak, E., Svensson, K., Knutsson, J., Morrison, G., 2005. Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24, 845–868. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2005.06.006>
- Wakita, T., Yasui, N., Yamada, E., Kishi, D., 2005. Development of a Novel Insecticide, Dinotefuran. *J. Pestic. Sci.* 30, 122–123.
- Wang, S., Steiniche, T., Rothman, J.M., Wrangham, R.W., Chapman, C.A., Mutegeki, R., Quirós, R., Wasserman, M.D., Venier, M., 2020. Feces are Effective Biological Samples for Measuring Pesticides and Flame Retardants in Primates. *Environmental Science & Technology* 54, 12013–12023. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02500>
- Whitehorn, P.R., O'Connor, S., Wackers, F.L., Goulson, D., 2012. Neonicotinoid Pesticide Reduces Bumble Bee Colony Growth and Queen Production. *Science* 336, 351–352. <https://doi.org/10.1126/science.1215025>
- Wienkers, L.C., Heath, T.G., 2005. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 825–833. <https://doi.org/10.1038/nrd1851>
- Wolff, K., Farrell, M., Marsden, J., Monteiro, M.G., Ali, R., Welch, S., Strang, J., 1999. A review of biological indicators of illicit drug use, practical considerations and clinical usefulness. *Addiction* 94, 1279–1298. <https://doi.org/10.1046/j.1360-0443.1999.94912792.x>
- Wood, S.C., Kozii, I.V., Koziy, R.V., Epp, T., Simko, E., 2018. Comparative chronic toxicity of three neonicotinoids on New Zealand packaged honey bees. *PLOS ONE* 13, e0190517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190517>
- Woodrow, J.E., Seiber, J.N., Baker, L.W., 1997. Correlation Techniques for Estimating Pesticide Volatilization Flux and Downwind Concentrations. *Environmental Science & Technology* 31, 523–529. <https://doi.org/10.1021/es960357w>
- Xu, X., Zhou, Q., Korfmacher, W.A., 2005. Development of a low volume plasma sample precipitation procedure for liquid chromatography/tandem mass spectrometry assays used for drug discovery applications. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19, 2131–2136. <https://doi.org/10.1002/rcm.2040>
- Yao, M., Chen, L., Srinivas, N.R., 2001. Quantitation of itraconazole in rat heparinized plasma by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 752, 9–16. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00505-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00505-3)
- Yu, L., Chen, M., Liu, Y., Gui, W., Zhu, G., 2013. Thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae following exposure to hexaconazole and tebuconazole. *Aquatic Toxicology* 138–139, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.04.001>
- Zambonin, C.G., Cilenti, A., Palmisano, F., 2002. Solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for the rapid screening of triazole residues in wine and strawberries. *Journal of Chromatography A* 967, 255–260. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00780-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00780-X)
- Zgirski, T., Legagneux, P., Chastel, O., Regimbald, L., Prouteau, L., Le Pogam, A., Budzinski, H., Love, O.P., Vézina, F., 2021. Early life neonicotinoid exposure results in proximal benefits and ultimate carryover effects. *Sci Rep* 11, 15252. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93894-2>
- Zhang, M., Moore, G.A., Barclay, M.L., Begg, E.J., 2013. A Simple High-Performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Three Triazole

- Antifungals in Human Plasma. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57, 484–489. <https://doi.org/10.1128/AAC.00768-12>
- Zhang, S., Xu, Z., Gao, C., Ren, Q.-C., Chang, L., Lv, Z.-S., Feng, L.-S., 2017. Triazole derivatives and their anti-tubercular activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 138, 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.051>
- Zhang, W., Lv, J., Shi, R., Liao, C., 2012. A Rapid Screening Method for the Determination of Seventy Pesticide Residues in Soil Using Microwave-Assisted Extraction Coupled to Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 21, 407–418. <https://doi.org/10.1080/15320383.2012.672489>

## Références bibliographiques

## Liste des communications scientifiques

### 1. Articles sur le sujet de thèse

Publication n°1 de la thèse :

Prouteau L., Angelier F., Chastel O., Pardon P., Brischoux F., Lormée H., Devier M., Budzinski H., Development of a method to analyse selected azoles fungicides in the plasma of free-living birds using LC-MS/MS combined with on-line SPE

Article pour soumission au Journal of Chromatography A

Publication n°2 de la thèse :

Angelier F., Prouteau L., Brischoux F., Chastel O., Devier M., Le Menach K., Martin S., Mohring B., Pardon P., Budzinski H., High contamination of a sentinel vertebrate species by azoles in vineyards: a study of Common blackbirds in multiple habitats in Western France

Article pour soumission à Environmental Pollution

Publication n°3 de la thèse :

Louise Prouteau, Frédéric Angelier, Christophe Barbraud, Marie-Hélène Devier, Julien Gernigon, William Jouanneau, Jean-Christophe Lemesle, Raphaël Musseau, Patrick Pardon, Frederic Robin, Manrico Sebastiano, Olivier Chastel, Hélène Budzinski

Plasmatic levels of neonicotinoids as indicators of global exposure of contrasted wild birds species

Article pour soumission à Science of the Total Environment

### 2. Autres articles en co-auteur pendant la période de thèse pas sur le sujet de thèse

Zgirski T., Legagneux P., Chastel O., Regimbald L., Prouteau L., Le Pogam A., Budzinski H., Love O., Vézina F.

Early-life neonicotinoid exposure results in short-term benefits and longer-term carry over effects

Article accepté le 05/06/2021 (Scientific Report) (Zgirski et al., 2021)

### 3. Posters présentés

Prouteau L., Angelier F., Chastel O., Pardon P., Brischoux F., Barbraud C., Lormée H., Devier M., Budzinski H. Projet MULTISTRESS, Exposition en pesticides des vertébrés du Poitou Charentes, analyse dans le plasma. Journée d'Echanges Scientifiques EPOC 2018, 5-6 avril 2018, Bordeaux, France

Prouteau L., Angelier F., Chastel O., Pardon P., Brischoux F., Barbraud C., Lormée H., Devier M., Budzinski H.

Développement d'une méthode analytique de dosage des triazoles par SPE en ligne LC-MS/MS dans le plasma d'une espèce commune de la Région Nouvelle-Aquitaine ; le Merle Noir Groupe Français des Pesticides 2018, Limoges, France, 30 mai-1 juin 2018



Prouteau L., Angelier F., Chastel O., Pardon P., Brischoux F., Barbraud C., Lormee H., Devier M., Budzinski H.

Le Merle Noir en Nouvelle-Aquitaine : voies d'exposition aux triazoles (fongicides) et analyse dans le plasma par SPE en ligne LC-MS/MS

4<sup>ème</sup> Symposium en Ecotoxicologie et Chimie de l'Environnement 2018, Talence, France, 29 novembre 2018

Prouteau L., Angelier F., Chastel O., Pardon P., Brischoux F., Barbraud C., Lormee H., Devier M., Budzinski H. Le merle noir en Nouvelle-Aquitaine : voies d'exposition aux triazoles (fongicides) et analyse dans le plasma par SPE en ligne LC-MS/MS. Journée d'Echanges Scientifiques EPOC 2019, 29-30 avril 2019, La Teste de Buch, France

Prouteau L., Angelier F., Chastel O., Pardon P., Brischoux F., Barbraud C., Lormee H., Devier M., Budzinski H.

Caractérisation de la contamination en pesticides néonicotinoïdes et triazoles chez les vertébrés localisés en Nouvelle-Aquitaine : développement de méthodes analytiques et applications

Colloque des doctorants 2<sup>ème</sup> année de l'école doctorale EUCLIDE de La Rochelle Université, La Rochelle, France, 06 juin 2019

#### 4. Communications orales

Prouteau L., Angelier F., Chastel O., Pardon P., Brischoux F., Barbraud C., Lormee H., Devier M., Budzinski H.

Dosage des triazoles par SPE en ligne LC-MS/MS dans le plasma d'une espèce commune de la région Nouvelle-Aquitaine ; le merle noir

Groupement De Recherche Ecotoxicologie Aquatique Animale 2018, Antony, France, 4-5 décembre 2018

Prouteau L., Angelier F., Chastel O., Pardon P., Brischoux F., Barbraud C., Lormee H., Devier M., Budzinski H.

Développement d'une méthode analytique de dosage des triazoles (fongicides) par SPE en ligne LC-MS/MS dans de faibles volumes de plasma de merle noir

13<sup>ème</sup> Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages de l'AFSEP (SEP19), Paris, France, 25-28 mars 2019

Prouteau L., Angelier F., Chastel O., Pardon P., Brischoux F., Barbraud C., Lormee H., Devier M., Budzinski H.

Caractérisation de la contamination en pesticides néonicotinoïdes et triazoles chez les vertébrés localisés en Nouvelle-Aquitaine : développement de méthodes analytiques et applications

Journée de Cohésion, Zoodyssé Villiers-en-Bois, France, 27 septembre 2019





## **Caractérisation de la contamination en pesticides azoles et néonicotinoïdes chez les espèces d'intérêt localisées en région Nouvelle-Aquitaine : développement de méthodes analytiques et applications**

### Résumé :

L'objectif principal est de caractériser la contamination en pesticides dont les azoles (fongicides) et les néonicotinoïdes (insecticides), de différentes espèces d'intérêt patrimonial en région Nouvelle-Aquitaine. Ces deux classes de polluants organiques sont largement employées en agriculture. Leur présence dans les différents compartiments environnementaux est démontrée ainsi que leurs transferts vers les organismes. Néanmoins, leur occurrence chez les espèces non-cibles et sauvages reste encore peu documentée. De façon à quantifier ces polluants organiques, et ce dans une démarche non-destructive pour l'animal, le plasma et les plumes ont été prélevés sur différents modèles d'oiseaux. Ces espèces « sentinelles » proviennent de zones plus ou moins sensibles comprenant des zones viticoles, des bocages, des forêts ou encore des zones urbaines. En complément, des échantillonneurs passifs atmosphériques placés dans les lieux d'étude ont permis de qualifier et de quantifier l'exposition des animaux aux pesticides (notion d'ambiance chimique). L'analyse a été réalisée à l'aide de la chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS). Le défi a été d'abaisser la prise d'essai (afin d'échantillonner des espèces de petites tailles) tout en ayant des limites de quantifications basses. Pour la matrice plasma, une méthode automatisée a été mise au point couplant une extraction sur phase solide en ligne avec l'analyse en LC-MS/MS. Une méthode d'extraction a également été développée pour la matrice plume avant d'être appliquée à un panel d'échantillons. Des différences entre espèces, habitats et année de prélèvement ont été mises en évidence pour certaines molécules. Finalement, la matrice plume s'est révélée être un meilleur proxy de contamination intégrant l'exposition lors de sa croissance sur plusieurs semaines, tandis que la matrice plasma permet de caractériser une exposition à très court terme.

Mots clés : plasma, plumes, azoles, néonicotinoïdes, métabolites, LC-MS/MS

## **Contamination characterization of azole and neonicotinoid pesticides in interest species located in Nouvelle-Aquitaine area: analytical methods development and applications**

### Abstract:

The main objective is to characterize the pesticides contamination, including azoles (fungicides) and neonicotinoids (insecticides), of various species of heritage interest in the Nouvelle-Aquitaine region located in France. These two classes of organic pollutants are widely used in agriculture. Their presence in various environmental compartments is demonstrated as well as their transfers to organisms. However, their occurrence in non-target and wild species remains poorly documented. In order to quantify these organic pollutants, in a non-destructive way for the animal, the plasma and feathers were taken from different bird models. These "sentinel" species come from more or less sensitive areas including wine-growing areas, groves, forests and even urban areas. In addition, passive atmospheric samplers deployed in the study sites allowed the qualification and the quantification of the animal exposure to pesticides (chemical environment notion). Analysis was performed using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The challenge has been to lower the test sample (for the small species) while having low limits of quantification. For the plasma matrix, an automated method was developed combining on line solid phase extraction with LC-MS/MS analysis. An extraction method was also developed for the feather matrix before being applied to a panel of samples. Differences between species, habitats and sampling year were demonstrated for few molecules. Finally, feather matrix proved to be a better contamination proxy integrating exposure during its growth over several weeks, while plasma matrix allows characterization of very short-term exposure.

Keywords: plasma, feathers, azoles, neonicotinoids, metabolites, LC-MS/MS