

ELISE

Action 3 : Etude des amphibiens



DISTRIBUTION SPATIALE DES AMPHIBIENS SUR LA PLAINE

La distribution spatiale des amphibiens sur la plaine s'appuie sur des relevés de terrain engagés sur 3 sites durant l'année 2012 puis augmentés à 7 sites en 2013 (Illustration 1). Cette approche a pour objectif d'une part, de caractériser la diversité des espèces et d'autre part, d'appréhender en partie l'état des populations étudiées.

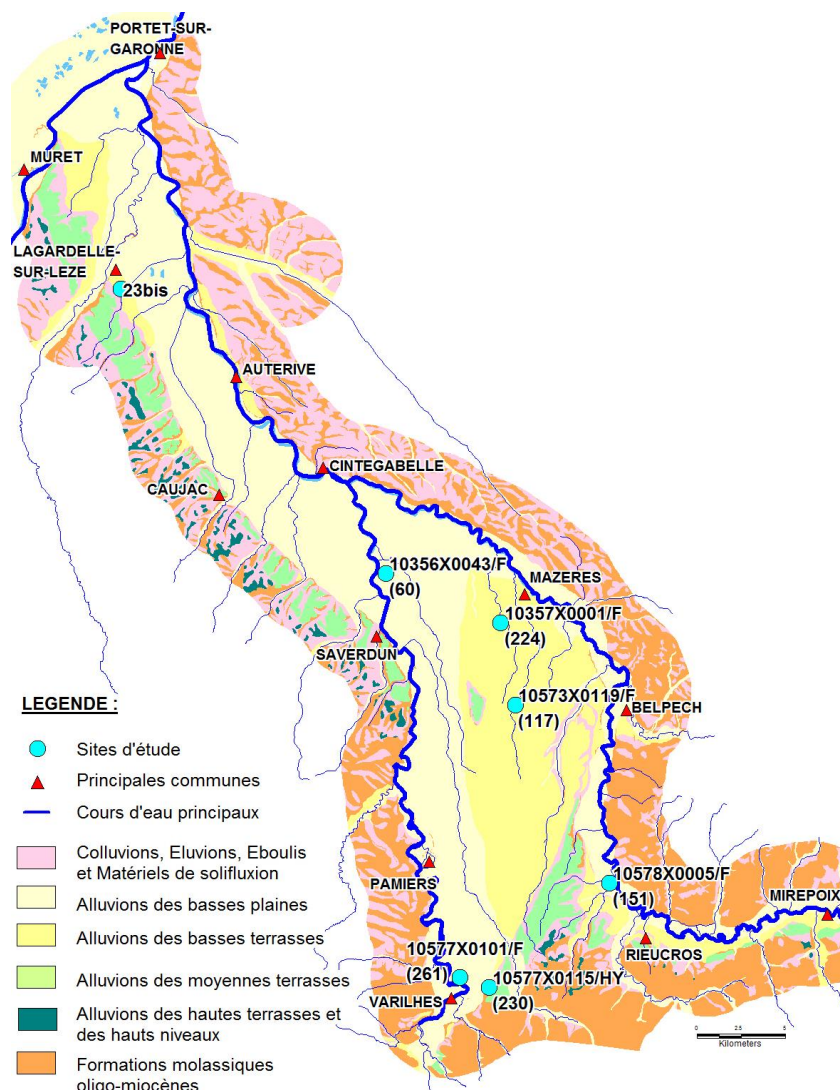


Illustration 1 – Carte de localisation des 7 sites retenus pour le suivi des amphibiens

Un fait important est à noter pour l'année 2012. La période de reproduction a été suivie de gelées assez fortes entraînant un développement très hétérogène des pontes et une croissance plus longue des animaux.

Sur l'ensemble des sites, un total de 8 espèces a été observé. La richesse spécifique a été estimée en prenant compte l'ensemble des stades présents (Illustration 2). La présence du triton marbré en plaine agricole mérite d'être soulignée.

Espèces observés	Site n°23	Site n°60	Site n°117	Site n°151	Site n°224	Site n°230
Grenouille verte	J A	J A	J A	A	J A	J A
Grenouille agile		P L J				P L J A
Crapaud commun	P L A			L		
Alyte	L					
Pélodyte ponctué	P L					
Salamandre tachetée		L			L	L A
Triton marbré		A				A
Triton palmé		P A		P A		P L A

Illustration 2 - Richesse spécifique établie à partir des données cumulées printemps 2012 et printemps 2013. P : ponte, L : Larves, J : juvéniles, A : adultes.

En complément à cette estimation de la batracofaune, une étude de la matrice paysagère a été entreprise. Celle-ci a clairement mise en évidence l'importance de la proximité du couvert forestier pour le maintien de nombreuses espèces d'amphibiens. Il apparaît que la diversité spécifique est davantage liée à la présence d'arbres qu'au niveau de contamination des eaux de surface observée.

La reproduction est effective sur la plupart des sites et des espèces, hormis pour 3 d'entre-eux (site n°117, 151 et 224) où aucune ponte n'a été observée.

La proportion d'animaux présentant des malformations est extrêmement faible. Aucune observation de ce type n'a été faite chez les adultes capturés. Chez les larves, la fréquence des malformations est extrêmement faible.

TESTS DE LABORATOIRE DE TOXICITE

*Toxicité évaluée chez le modèle *Xenopus laevis**

Des tests d'exposition destinés à évaluer la toxicité aiguë (mortalité), chronique (inhibition de croissance) et génétique (induction de micronoyau) du S-métolachlore (S-Met) et de ses métabolites MESA (ESA-métolachlore) et MOXA (OXA-métolachlore) ont été menés en conditions de laboratoire sur le modèle amphibien Xénope. Des essais ont également été réalisés en conditions de mélange.

Les résultats de l'évaluation de la toxicité des substances pures et isolées de S-Met, MOXA et MESA réalisée au cours des 3 années du projet chez le Xénope en conditions de laboratoire (ISO, 2006) sont résumés dans le tableau de l'illustration 3.

Ces résultats mettent en évidence une absence de mortalité et de génotoxicité significative chez les larves exposés au S-métolachlore de 0,01 µg/L à 10 mg/L. En revanche, une inhibition de croissance est mise en évidence chez les larves exposées aux faibles (0,01 et 0,1 µg/L) et aux fortes concentrations (0,1-1 et 10 mg/L). Aux concentrations intermédiaires, les larves pourraient mettre en œuvre des systèmes de défense au stress (allocation énergétique par exemple) que les faibles concentrations n'induisent pas et que les fortes valeurs ne permettent plus en raison de la saturation de ces systèmes.

Les résultats des expositions à l'OXA métolachlore (MOXA) montrent une absence de mortalité significative des larves, et une absence d'inhibition de croissance de 0,01 µg/L à 1 mg/L. En revanche, une génotoxicité significative est observée chez les larves exposées à 0,1 et 1 mg/L de MOXA. La génotoxicité obtenue à 0,1 mg/L n'a cependant pas été reproduite statistiquement lors d'une deuxième série d'expérimentations. En ce qui concerne les expositions à l'ESA-métolachlore, les résultats montrent une absence de mortalité, d'inhibition de croissance et de génotoxicité significatives chez les larves exposées à 0,01-0,1 et 1 mg/L.

	S-Met (µg/L)							MOXA (µg/L)						MESA (µg/L)					
	0,01	0,1	1	10	100	1000	10 000	0,01	0,1	1	10	100	1000	0,01	0,1	1	10	100	1000
Mortalité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-
Croissance	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-
Génotoxicité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+	ND	ND	ND	-	-	-

Illustration 3 - Synthèse des résultats de toxicité du S-Met, MOXA et MESA à différentes concentrations chez le Xénope en conditions de laboratoire. - : absence de toxicité significative par rapport au T-, + : toxicité significative par rapport au T-, ND : résultat non disponible

Certaines conditions de mélange des 3 substances montrent une absence de génotoxicité significative chez les larves exposées alors que d'autres en témoignent (Illustration 4). L'ensemble des résultats sur les mélanges illustre bien la complexité des mécanismes de toxicité synergiques et/ou antagonistes qui revient aux molécules seules et en mélanges et souligne l'incapacité à partir des résultats obtenus pour des expositions aux molécules seules, de prédire une toxicité des mélanges.

	Mélange 1			Mélange 2			Mélange 3			Mélange 4		
	MOXA µg/L	MESA µg/L	S-Met µg/L	MOXA µg/L	MESA µg/L	S-Met µg/L	MOXA µg/L	MESA µg/L	S-Met µg/L	MOXA µg/L	MESA µg/L	S-Met µg/L
	0,0088	0,044	0	0,044	0,22	0	0,088	0,44	0	0,044	0,22	0,1
Mortalité	-			-			-			-		
Croissance	-			-			-			+		
Génotoxicité	+			-			-			+		

Illustration 4 - Synthèse des résultats de toxicité de S-Met, MOXA et MESA à différentes concentrations en mélange chez le Xénope en conditions de laboratoire. - : absence de toxicité significative par rapport au T-, + : toxicité significative par rapport au T-

Exposition en laboratoire du modèle amphibien *Xenopus laevis* aux eaux de surface des sites étudiées

L'analyse consiste en une comparaison de l'état biologique des eaux de surface associées à des sites choisis parmi ou à proximité des points d'eau suivis depuis 2009. Le choix a surtout été guidé par les concentrations mesurées historiquement. En 2012, les larves de Xénope ont été exposées à des eaux naturelles prélevées sur 3 sites présentant un degré de contamination variable. Lors de la seconde année, ces informations ont été complétées avec une exposition de larves à 7 échantillons d'eau prélevés sur la plaine en mars 2013 (sites 23, 60, 117, 151, 224, 230,261).

Chaque essai comprenait :

- un lot témoin négatif (T^-) : larves exposées à l'eau reconstituée ER (ISO, 2006) seule (absence de contamination)
- un lot témoin positif (T^+) : larves exposées à 20 mg/L de cyclophosphamide monohydrate en eau reconstituée (CP, témoin de génotoxicité ISO, 2006),
- des lots avec les eaux brutes des 7 sites d'étude sélectionnés

Les résultats obtenus témoignent d'une absence de toxicité aiguë significative chez les larves exposées aux eaux prélevées sur le terrain.

En termes de résultats de croissance de larves, deux types de comparaison statistique ont été effectués. La première comparaison a été réalisée par rapport aux larves exposées à l'eau reconstituée seule (T^-) et la seconde par rapport aux larves exposées au site de référence (« non contaminé », site 230). Les résultats obtenus (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) montrent que les comparaisons, T^- vs sites, et site de référence (site 230) vs autres sites, conduisent à la même conclusion statistique. Les larves exposées aux eaux de deux sites (site 23 et site 117) présentent une différence significative de croissance (inhibition de croissance) par rapport aux larves T^- et par rapport à celles exposées à l'eau du site de référence 230.

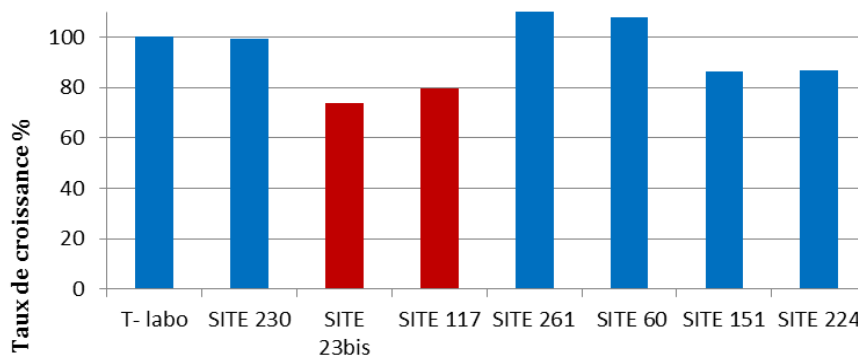


Illustration 5 - Taux de croissance chez les larves de xénope exposées aux eaux des 7 sites, en comparaison avec les larves du témoin négatif (T^-) et celles exposées à l'eau du site 230 (référence). rouge : inhibition de croissance significative par rapport au T^- .

Par ailleurs, une différence significative de génotoxicité est observée chez les larves exposées à l'eau du site 23 par rapport aux larves T^- (Illustration 6). De même, la comparaison de la génotoxicité chez les larves exposées aux différentes eaux par rapport à celle des larves exposées à l'eau de référence (site 230) met en évidence une réponse génotoxique significative chez les larves exposées à l'eau du site 23.

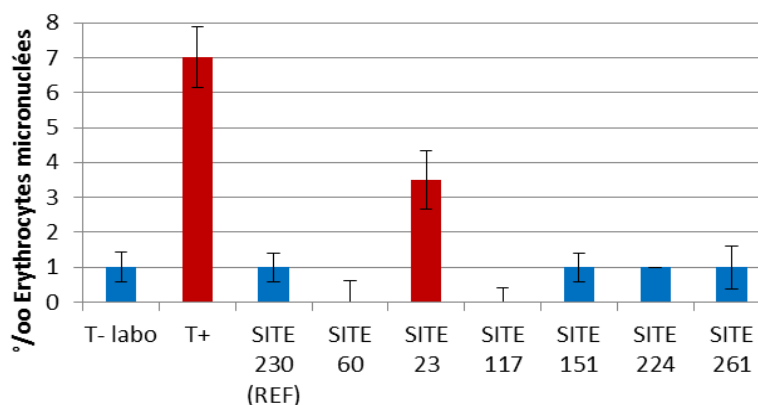


Illustration 6 - Résultats de génotoxicité des larves de xénope exposées aux eaux des sites, à 20 mg/l de cyclophosphamide (T^+), et en eau reconstituée (T_{labo}). rouge : génotoxicité significative par rapport au T^-

Toxicité, Ecotoxicologie comportementale et malformations évalué sur des espèces d'amphibiens de la plaine de l'Ariège

En complément des expérimentations menées en conditions contrôlées sur le modèle amphibien Xénope, d'autres expérimentations ont été réalisées en laboratoire sur des espèces d'amphibiens existantes sur la plaine. Il s'agit de voir dans quelle mesure, les observations réalisées sur l'espèce modèle sont également retrouvées pour deux espèces naturelles de la plaine et prélevées à différents sites. Outre les aspects de toxicité, l'étude d'effets potentiels sur le comportement a été réalisée ainsi que l'examen des malformations.

L'exposition des œufs des 3 espèces sentinelles (*Rana dalmatina* des sites 230 et 60 et *Bufo spinosus* du site 23 bis) au S-métolachlore, MOXA et MESA à 0,01 – 0,1 – 1 – 10 et 100 µg/L met en évidence une absence de mortalité significative des œufs/larves aux concentrations étudiées dans les conditions de l'essai.

Après l'établissement d'une typologie des malformations rencontrées sous la forme d'un guide, l'étude des malformations a été réalisée chez *Rana dalmatina* sur le terrain et en conditions expérimentales. Le taux de malformations estimé *in natura* est très faible avec moins de 3 % des larves (N = 797). Ce taux est probablement sous-estimé car les individus malformés meurent plus rapidement et ne sont plus visibles sur le terrain. De plus, Il conviendrait de modifier le protocole expérimental afin d'effectuer les observations chaque jour (limitation des effets de la prédation). In situ, les analyses ont été conduites sur les effectifs des différents sites. Un total de 207 larves présentant des malformations a été obtenu avec un taux de malformation très supérieur dans la population du site 60bis. Pour ce site, les métabolites semblent engendrer un taux de malformation supérieur à la molécule mère même si l'action des concentrations n'est pas significative. De plus, les essais sur le comportement mettent en évidence un effet plus marqué après une exposition au MOXA ou au MESA qu'au S-métolachlore.

Sur le terrain, les effets sont variables en fonction de la présence des contaminants dans les eaux (en fonction du site) et du cycle de vie de l'animal (œufs, larves, juvéniles). Les stades précoces, en contact avec les contaminants, sont les stades plus sensibles. Si les effets chez les œufs paraissent faiblement marqués, on observe toutefois une augmentation des malformations chez les larves survivantes suggérant un impact de la multi contamination dans le milieu naturel duquel ils sont prélevés. Les cibles biologiques étant différentes selon les modes d'action des contaminants, l'expression de la toxicité peut avoir lieu à différents niveaux, par exemple induire de la tératogénicité (malformations observées) sans pour autant induire de toxicité chronique (croissance) ou aiguë (mortalité).

L'étude des effets de mélanges de substances présente un intérêt écologique important. En effet, en milieu naturel, les organismes sont exposés non pas à des substances pures mais à des mélanges de substances. Les pesticides présents sur les différents sites peuvent interagir de manière synergique, antagoniste, additive. Les cocktails peuvent avoir des effets toxiques alors même que chacun de leurs composants est présent à une concentration inférieure au seuil de toxicité individuel. La toxicité réelle des mélanges reste très difficile à appréhender et nécessite de nombreux travaux complémentaires à ceux déjà réalisés dans le présent travail.