



Quels indicateurs microbiens pour évaluer l'impact écotoxicologique des pesticides sur des fonctions écosystémiques terrestres et aquatiques ?

Fabrice Martin-Laurent, Olivier Crouzet, Marion Devers, Jérémie Béguet,
Laure Mamy, Pierre Benoit, Christian Mougin, Stéphane Pesce

► To cite this version:

Fabrice Martin-Laurent, Olivier Crouzet, Marion Devers, Jérémie Béguet, Laure Mamy, et al..
Quels indicateurs microbiens pour évaluer l'impact écotoxicologique des pesticides sur des fonc-
tions écosystémiques terrestres et aquatiques?. Innovations Agronomiques, 2017, 59, pp.1-11.
10.15454/1.5137846191320505E12 . hal-01605498

HAL Id: hal-01605498

<https://hal.science/hal-01605498>

Submitted on 25 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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



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

Quels indicateurs microbiens pour évaluer l'impact écotoxicologique des pesticides sur des fonctions écosystémiques terrestres et aquatiques ?

Martin-Laurent F.¹, Crouzet O.², Devers-Lamrani M.¹, Beguet J.¹, Mamy L.³, Benoit P.³,
Cheviron N.², Mougin C.², Pesce S.⁴

¹ UMR Agroécologie, AgroSup Dijon, INRA, Univ. Bourgogne Franche Comté, F-21000 Dijon

² UMR EcoSys, AgroPrisTech, INRA, Univ. Paris-Saclay, F-78026, Versailles

³ UMR EcoSys, AgroPrisTech, INRA, Univ. Paris-Saclay, F-78850, Thiverval-Grignon

⁴ UR MALY, IRSTEA, Lyon-Villeurbanne, F-69616 Villeurbanne Cedex

Correspondance : fabrice.martin@inra.fr

Résumé

Etudes après études, les pesticides sont identifiés comme une menace pour la diversité et l'activité des microorganismes des sols. Bien que cette menace soit identifiée, nous restons démunis pour estimer l'impact écotoxicologique des pesticides sur des fonctions écosystémiques des sols. Ainsi, l'évaluation *a priori* des effets des pesticides sur les microorganismes des sols repose sur l'estimation de leur impact sur la minéralisation du carbone et de l'azote. Ces tests trop globaux ne rendent pas compte de l'effet des pesticides sur les microorganismes. Cette étude a testé un bouquet d'indicateurs pour évaluer l'impact écotoxicologique de pesticides sur les communautés microbiennes supportant des fonctions écosystémiques des sols et des sédiments. Elle a permis le développement de nouveaux outils et de normes ISO pouvant être utilisés pour évaluer l'impact *a priori* et *a posteriori* des pesticides sur la diversité et l'activité des microorganismes des sols et des sédiments.

Mots-clefs : Ecotoxicologie microbienne, Fonction écosystémiques, Microorganismes, Pesticides, Sol, Sédiment.

Abstract: What microbial indicators to assess the ecotoxicological impact of pesticides on terrestrial and aquatic ecosystem functions?

Studies after studies, pesticides are identified as a major threat for the diversity and activity of soil microorganisms. Although identified as a threat, there is a lack of methods to estimate the ecotoxicological impact of pesticides on soil ecosystemic functions. Indeed *a priori* evaluation of pesticide effects on soil microorganisms relies solely on the estimation of their impact on carbon and nitrogen mineralisation. These global tests did not allow to properly measure the effects of pesticides on soil microorganisms. This study tested a panel of indicators to evaluate the ecotoxicological impact of pesticides on microbial communities supporting soil and sediment ecosystemic functions. It leads to the development of new tools and ISO standards ready to be used to evaluate the *a priori* and *a posteriori* impact of pesticides on the diversity and activity of soil and sediment microorganisms.

Keywords: Microbial ecotoxicology, Ecosystemic functions, Microorganisms, Pesticides, Soil, Sediment.

1. Introduction

En France, l'usage des pesticides pour la protection des cultures reste une pratique courante de l'agriculture moderne. Leur application permet de protéger les cultures des plantes adventices, des pathogènes et des ravageurs et d'assurer des rendements élevés pour répondre à la demande alimentaire. Malgré les plans Écophyto I et II, qui visent à réduire l'utilisation des pesticides, les usages stagnent et ne diminuent plus depuis 10 ans (Potier, 2014 ; Hossard et al., 2017). Ainsi, environ 63 000 tonnes de pesticides sont vendues chaque année en France plaçant notre pays au rang du plus grand consommateur en Europe, mais dans la moyenne européenne pour ce qui concerne la quantité de pesticides appliquée par hectare (Commissariat Général au Développement Durable, 2017). En raison de leur utilisation quasi-généralisée, des résidus de pesticides sont présents dans la quasi-totalité des cours d'eau français (CGDD/SOeS, 2013), ce qui soulève des inquiétudes quant à leur impact sur la santé de l'environnement et de l'Homme. De plus, les pesticides et leurs résidus (produits de transformation) sont identifiés comme une menace pour la biodiversité et les fonctions écosystémiques, avec de possibles conséquences sur la durabilité des agrosystèmes (Mougin et Caquet, 2016).

Pourtant, en Europe, la mise sur le marché des pesticides est très strictement réglementée par la directive cadre européenne 1107/2009. Un des éléments-clefs de cette procédure complexe est la constitution par la firme agrochimique d'un dossier d'homologation qui comprend de nombreuses informations dont les propriétés physico-chimiques de la substance active, sa toxicité, son devenir dans l'environnement et son écotoxicité. L'analyse *a priori* du risque écotoxicologique des pesticides est un élément déterminant du dossier d'homologation. Il comprend notamment l'évaluation du risque pour des organismes non-cibles terrestres et aquatiques. Bien que des tests de pointe existent pour évaluer l'impact écotoxicologique des pesticides sur les macroorganismes et les microalgues non-cibles, les méthodes utilisées pour évaluer le risque pour les microorganismes hétérotrophes (bactéries et champignons) restent trop globales et en retard par rapport à certaines avancées récentes en écologie microbienne. Ainsi, aujourd'hui, l'évaluation *a priori* du risque écotoxicologique des pesticides sur les microorganismes hétérotrophes n'est conduite que dans les sols. Elle repose uniquement sur la mesure de la minéralisation du carbone (test OCDE 217) et de l'azote (test OCDE 216) par les microorganismes. Bien que ces tests soient standardisés et utilisés depuis de nombreuses années par la réglementation, ils sont trop globaux et pas assez sensibles pour rendre compte de l'effet des pesticides sur les micro-organismes du sol et sur les fonctions écosystémiques qu'ils soutiennent (Crouzet et al., 2015 ; Martin-Laurent et al., 2013). Récemment, l'EFSA (European Food Safety Authority) a proposé de définir de nouveaux objectifs de protection visant à évaluer l'écotoxicité des pesticides sur des fonctions écosystémiques remplies par les sols (EFSA, 2010). Pour atteindre cet objectif, l'EFSA a proposé d'utiliser les communautés microbiennes comme des proxys (bioindicateurs) des fonctions écosystémiques des sols. Les experts de l'agence ont souligné non seulement l'absence de méthodes standardisées pour atteindre cet objectif mais aussi l'absence de référentiel permettant d'évaluer la résilience des communautés microbiennes (EFSA, 2016a). Très récemment, l'agence a proposé de nouveaux tests pour évaluer l'impact des pesticides sur des microorganismes impliqués dans la fertilité du sol (bactéries nitrifiantes impliquées dans le cycle de l'azote et des champignons endomycorhizogènes, symbiotes obligatoires impliqués dans la nutrition minérale des plantes supérieures) (EFSA, 2016b). Si l'évaluation *a priori* du risque écotoxicologique fait partie intégrante du processus d'homologation des pesticides, l'évaluation *a posteriori* n'intervient que dans le cadre du renouvellement de l'autorisation 10 ans après sa délivrance (Storck et al., 2017). Qui plus est, celle-ci ne prend pas encore en compte l'impact écotoxicologique des pesticides et de leurs produits de transformation sur les microorganismes terrestres et aquatiques, faute d'un cadre réglementaire *ad hoc*. En effet, la directive cadre sur les sols (Van Camp et al., 2004) n'a toujours pas été adoptée par la Commission Européenne, bien qu'elle ait été proposée en 2006. Par ailleurs, la directive cadre sur l'eau (EU 2000/60), bien qu'elle prenne en compte le statut chimique des masses d'eau et leur qualité écologique, ne considère pas encore les fonctions remplies par les microorganismes comme des

objectifs de protection. Dans ce contexte, nous avons mené une étude visant à tester et à développer des indicateurs microbiens pour évaluer l'impact de pesticides sur certaines des fonctions écosystémiques liées au cycle des nutriments et au service d'épuration des compartiments terrestres et aquatiques des agrosystèmes. Ces indicateurs ont été testés pour évaluer *a priori* l'impact de pesticides appliqués seuls ou en mélange sur des fonctions microbiennes mesurées dans des microcosmes de sols et de sédiments (évaluation pré-homologation des pesticides). Ils ont aussi été testés pour évaluer l'impact *a posteriori* de pesticides appliqués dans différents contextes agronomiques (grandes cultures et contexte viticole) et pédoclimatiques (suivi post-homologation des pesticides).

2. Matériel et méthodes

2.1. Sites expérimentaux

Les rivières Morcille (Beaujolais) et Trec (Lot-et-Garonne) ainsi que le dispositif Protection Intégrée des Cultures (PIC, Domaine INRA Dijon, Côte d'Or) qui vise à tester différentes modalités pour contrôler les plantes adventices dans les cultures, allant de pratiques conventionnelles à la protection intégrée (S1, agriculture raisonnée ; S2, protection intégrée sans labour et désherbage ; S3, protection intégrée avec labour et désherbage localisé ; S4, protection intégrée avec désherbage chimique si nécessaire ; S5, protection intégrée sans herbicide), ont été utilisés pour conduire une étude *in silico* visant à sélectionner des pesticides représentatifs de l'exposition rencontrée dans un contexte viticole ou de grandes cultures, à utiliser dans l'étude d'impact *a priori*.

L'étude *a posteriori* a été menée dans le contexte viticole sur le bassin versant de l'Ardières (comprenant la Morcille), dans le contexte de grandes cultures sur le bassin versant de la Coise (Loire) et dans le dispositif PIC.

2.2. Classification *in silico* des pesticides

L'outil TyPol (Servien et al., 2014) a été utilisé pour classer *in silico*, selon leurs propriétés moléculaires (nombre et types d'atome, index de connectivité, surface, moment dipolaire, polarisabilité, énergies...), leur comportement dans l'environnement (caractérisé par le coefficient d'adsorption Koc, la durée de demi-vie de dégradation DT50...) et leur écotoxicité (BCF), les pesticides appliqués (dispositif PIC) ou détectés (rivières Morcille et Coise) afin de (i) choisir des pesticides représentatifs du scénario d'exposition pour évaluer l'impact *a priori* des pesticides et (ii) de caractériser le scénario d'exposition dans l'évaluation de l'impact *a posteriori* (Figure 1).

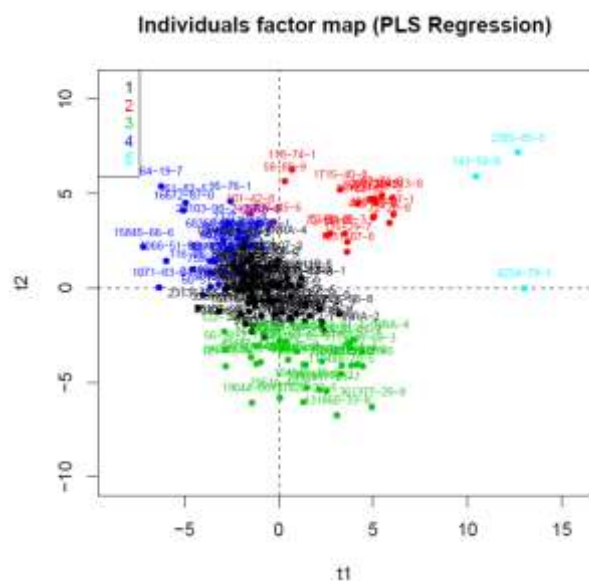


Figure 1 : Classification par typologie *in silico* des pesticides appliqués et/ou détectés dans les sites expérimentaux étudiés (groupe 1 : noir ; 2 : rouge ; 3 : vert ; 4 : bleu foncé et 5 : bleu clair).

2.3. Indicateurs microbiens testés

La composition taxonomique de la communauté bactérienne des sols et des sédiments a été évaluée par PCR quantitative (méthode ISO 17601) ciblant onze groupes microbiens à partir de l'ADN extrait directement d'échantillons de sols ou de sédiments (méthode ISO 11063) et utilisée comme proxy de la structure des communautés bactériennes.

Des activités enzymatiques extra-cellulaires impliquées dans les cycles du carbone (C), de l'azote (N), du soufre (S) et du phosphore (P) ont été mesurées comme proxys du cycle des nutriments (méthode ISO 20130). De plus, l'activité nitrifiante (méthode ISO 14238) a été mesurée comme un proxy du cycle de l'azote dans les sols.

La capacité de la communauté microbienne à minéraliser différents composés organiques plus ou moins complexes (acétate de sodium, 2,4-D et glyphosate) a été mesurée comme proxy de la capacité épuratrice des sols et des sédiments (méthode ISO 14239).

2.4. Evaluation de l'impact a priori des pesticides

L'évaluation *a priori* de l'impact de pesticides appliqués seuls ou en mélange, à des doses réalistes, sur les indicateurs des fonctions microbiennes a été conduite par une approche en microcosmes de sols ou de sédiments, s'inspirant des recommandations des tests OCDE. Le choix des pesticides testés dans chaque milieu est justifié par la suite (3.1). En plus du sol issu du site PIC, d'autres sols de sites expérimentaux ont été ajoutés à l'étude (Chambeire, La Cage, INRA Versailles et Plaine de Pierrelaye).

La dissipation des pesticides a été suivie soit avec des molécules marquées au ^{14}C (radiorespirométrie et bilan de masse), soit avec des techniques de chimie analytique afin de définir l'évolution du scénario d'exposition des communautés microbiennes. Des échantillons de sol ou de sédiments prélevés après 4 jours et 25 jours ont été analysés pour évaluer l'impact des pesticides sur le cycle des nutriments et la fonction épuratrice des communautés microbiennes des sols, mais aussi leurs compositions taxonomiques les différents indicateurs microbiens.

2.5. Evaluation de l'impact a posteriori des pesticides

L'évaluation *a posteriori* a été menée dans des contextes agricoles différents (viticulture et grandes cultures), sur des sites expérimentaux suivis sur le long terme. Les scénarios d'exposition des communautés microbiennes des sédiments et des sols ont été évalués *in silico* avec TyPol sur la base du suivi de l'état chimique des cours d'eau (bassins versants de l'Ardières et de la Coise) et de l'historique de traitements phytosanitaires appliqués sur le dispositif PIC. Le plan d'échantillonnage des sédiments (Ardières et Coise, 3 stations pour chaque rivière d'amont en aval) et des sols (dispositif PIC, 5 pratiques culturales) permet de tester en laboratoire la réponse de la capacité épuratrice des communautés microbiennes à des gradients d'exposition aux pesticides sur le terrain et à long terme. La capacité épuratrice des communautés microbiennes est mesurée au laboratoire par radiorespirométrie et bilan de masse permettant de déterminer les fractions minéralisées, extractibles et liées pour chaque molécule étudiée. Les molécules de pesticides retenues d'après les passifs d'exposition étaient pour les sédiments : le chlorpyrifos, le diuron, le glyphosate et le tébuconazole et pour les sols : le chlorpyrifos, l'atrazine, le 2,4-D, le glyphosate et le tébuconazole. Un substrat carboné (acétate de sodium) facilement dégradable est utilisé comme référence.

3. Résultats et discussion

3.1. Typologie *in silico* des pesticides appliqués/détectés sur les sites d'étude

Dans l'objectif de choisir des pesticides modèles afin de mener l'évaluation du risque *a priori* des pesticides sur les microorganismes du sol, une centaine de pesticides appliqués sur le dispositif PIC (Côte d'Or) et détectés dans les rivières Morcille (Beaujolais) et Trec (Lot-et-Garonne), plus quelques

produits de leur transformation, ont été analysés avec TyPol. Le classement *in silico* a conduit à la répartition de ces différents pesticides et métabolites dans quatre groupes :

- Le groupe 1, à dominante herbicides, comprend des molécules caractérisées par une énergie totale élevée, peu halogénées, à faible index de connectivité (peu ramifiées) et caractérisées par des valeurs de DT₅₀ moyennes et des BCF (BioConcentration Factor) plutôt faibles. On y retrouve des pesticides de polarité élevée (ionisables) à moyenne (urées substituées).
- Le groupe 2, essentiellement composé d'insecticides, comprend des molécules halogénées, à fort index de connectivité de valence, caractérisées par des valeurs de DT₅₀, Kow et BCF plutôt élevés.
- Les groupes 3 et 4, à co-dominante fongicides-herbicides, comprennent des molécules caractérisées par une énergie totale moyenne et peu discriminées par les différents paramètres environnementaux, excepté pour le BCF : les molécules appartenant à ces groupes présentent en général des valeurs de BCF faibles à moyennes. On y trouve une grande diversité de molécules, majoritairement neutres et peu polaires. Les pesticides du groupe 4 sont cependant marqués par des structures chimiques complexes, avec plusieurs cycles aromatiques (pyréthroïdes, strobilurines, triazoles).

Nous avons retenu l'appartenance à des groupes TyPol distincts comme une clef de décision pour choisir les pesticides modèles utilisés dans l'évaluation du risque *a priori*. Nous partons du principe (i) que des pesticides appartenant au même groupe TyPol, en raison de propriétés moléculaires et environnementales semblables, causeraient des effets écotoxicologiques similaires et (ii) que, corollairement, des pesticides appartenant à des groupes TyPol différents causeraient des effets différents.

En appliquant ce raisonnement sur la classification TyPol (i) le dimétomorphe (DMM), le tébuconazole (TBZ) et le glyphosate (GLY) ont été retenus comme représentatifs des pratiques en viticulture dans le Beaujolais et (ii) l'isoproturon (IPU), le chlorpyrifos (CHL) et le tébuconazole (TBZ) comme représentatifs des pratiques en grandes cultures, pour mener l'étude de l'évaluation du risque *a priori* sur les compartiments aquatique (sédiments) et terrestre (sols).

3.2. *Evaluation a priori de l'impact de pesticides sur des fonctions microbiennes aquatiques et terrestres*

3.2.1. Impact des pesticides sur des fonctions microbiennes des sédiments

Les résultats sont présentés pour chaque traitement pesticides testé (dimétomorphe (fongicide), tébuconazole (fongicide), glyphosate (herbicide)) appliqués seuls ou en mélange (MIX), en comparaison avec le contrôle non exposé (témoin). A titre d'exemple, un des résultats obtenus est présenté dans la figure 2 qui montre les valeurs de ΔT_{25} (différence de temps nécessaire entre l'échantillon traité avec un pesticide et l'échantillon contrôle pour atteindre 25 % de minéralisation de la quantité initiale de pesticide marqué au ¹⁴C initialement apporté) mesurées dans les sédiments exposés aux différents traitements testés pendant 4 ou 28 jours.

Après 4 jours d'exposition aux pesticides appliqués seuls ou en mélange, la composition et l'activité de la communauté microbienne des sédiments de la Morcille étaient modifiées de manière significative sur différents marqueurs (activités enzymatiques, capacité de dégradation des pesticides, abondance spécifique et composition de la communauté bactérienne). Ces modifications étaient pour la plupart transitoires ; la quasi-totalité des marqueurs n'étaient plus significativement différents du témoin après 25 jours d'exposition. Ces résultats montrent que la communauté microbienne des sédiments est résiliente. Les effets les plus marqués ont été obtenus dans les traitements DMM et MIX (modifications de la capacité de dégradation de l'atrazine et du 2,4-D, de l'activité phosphatase,...). Certains marqueurs sont sensibles à tous les pesticides appliqués (activité phosphatase, abondances des α - et β -protéobactéries, planctomycètes et des archaebactéries). Certains d'entre eux pourraient constituer des biomarqueurs d'exposition de la communauté microbienne des sédiments aux pesticides. En

revanche, d'autres marqueurs sont insensibles au traitement appliqué (capacité de dégradation du diuron, activité uréase, abondance communauté bactérienne totale, γ -protéobactéries, firmicutes).

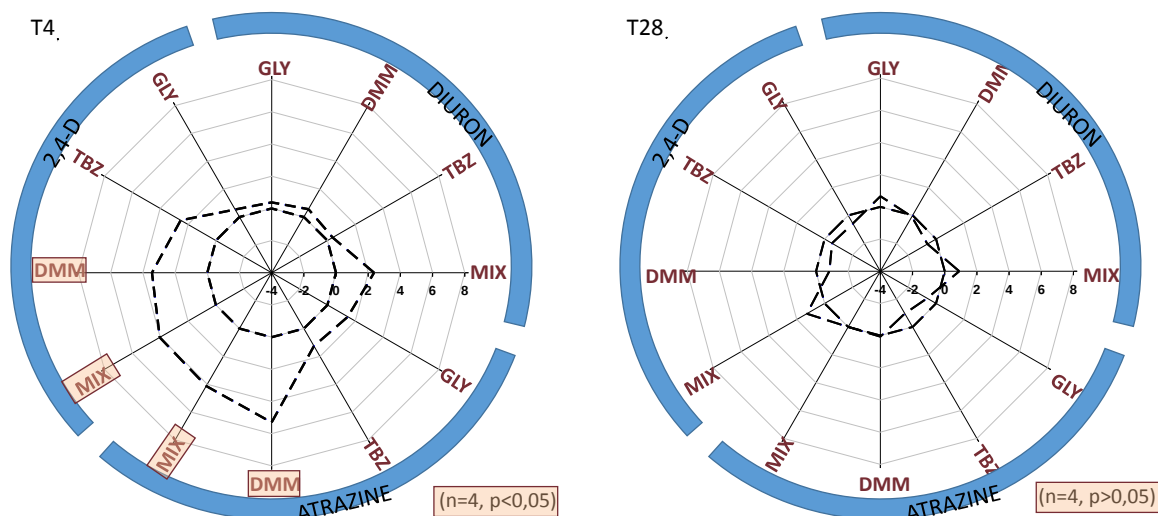


Figure 2 : Valeurs de ΔT_{25} (différence de temps nécessaire entre l'échantillon traité avec un pesticide et l'échantillon contrôle pour atteindre 25 % de minéralisation de la quantité initiale de pesticide marqué au ^{14}C initialement apporté) estimées pour la minéralisation de l'atrazine, du diuron ou du 2,4-D mesurée dans les microcosmes de sédiments exposés au glyphosate (GLY), tébuconazole (TBZ), dimétomorphe (DMM) ou mélange des trois pesticides (MIX) pendant 4 jours ou 28 jours (T4 et T28, respectivement). Les traitements entourés d'un carré orange diffèrent significativement du contrôle (ANOVA, test de Tuckey, $p < 0.05$, $n = 4$ par traitement).

3.2.2. Impact des pesticides sur des fonctions microbiennes des sols

Etant donné l'importance des propriétés physicochimiques des sols sur le devenir des pesticides, différents sols ont été étudiés: Chambeire et La Cage (limono-argileux) et Pierrelaye (sablo-limoneux). A titre d'exemple, la figure 3 présente la synthèse des résultats obtenus pour les différents indicateurs microbiens mesurés dans les microcosmes de sol de La Cage exposé à l'isoproturon (herbicide), au chlorpyrifos (insecticide), au tébuconazole (fongicide) et au mélange des trois composés (MIX), pendant 4 ou 25 jours (T4 et T25, respectivement).

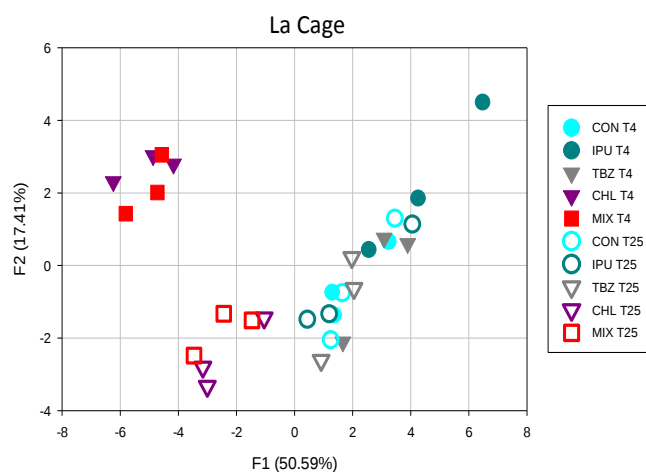


Figure 3 : Analyse en composante principale des indicateurs microbiens mesurés dans les microcosmes du sol de La Cage prélevés après 4 (T4) ou 25 (T25) jours d'exposition aux pesticides appliqués seuls (isoproturon (IPU), tébuconazole (TBZ) et chlorpyrifos (CHL)) ou en mélange (MIX). Ces mesures ont aussi été réalisées sur des microcosmes de sol témoin non exposés aux pesticides (CON).

L'effet causé par l'exposition aux pesticides appliqués seuls ou mélange sur les communautés microbiennes dépend non seulement du type de pesticide mais également du type de sol qui conditionne la biodisponibilité (donc l'exposition des microorganismes) et le devenir du pesticide et donc l'exposition de la communauté microbienne. Dans les trois types de sol, l'exposition des communautés microbiennes à l'IPU ou au TBZ ne modifie pas leur composition, leur abondance et leur activité, exceptée pour la nitrification qui était diminuée dans le sol de Pierrelaye. En revanche, l'exposition au CHL et au MIX modifie de manière significative mais transitoire la composition, l'abondance et l'activité de la communauté microbienne du sol de La Cage et celle du sol de Pierrelaye (surtout la nitrification). A la fin de la période d'incubation la plupart des proxys mesurés dans les microcosmes de sols exposés aux pesticides avaient récupéré des valeurs comparables à celles observées dans les microcosmes témoins indiquant la résilience des communautés microbiennes. Le sol de Pierrelaye exposé au CHL et au MIX présentant encore une nitrification impactée de -18 et -17%, respectivement, par rapport au témoin.

Il faut souligner que la modalité MIX (mélange de trois pesticides), employée pour étudier l'effet du « mélange de pesticides », n'est pas représentative des pratiques culturales. L'application successive des pesticides sur les microcosmes de sol pourrait constituer une modalité plus proche des pratiques culturales à tester pour évaluer l'impact des pesticides sur la communauté microbienne des sols.

Cette étude montre que la nitrification et la minéralisation de l'herbicide 2,4-D (proxys respectifs du cycle des nutriments et de la fonction épuratrice des sols) sont particulièrement sensibles à l'exposition aux pesticides. Une raison possible est qu'ils sont supportés par des groupes microbiens relativement peu abondants et peu diversifiés, associés à une faible redondance fonctionnelle. Toutefois, sur un temps relativement court, ces fonctions sont récupérées montrant la résilience de la communauté microbienne des sols, sauf dans le sol sablo-limoneux qui, de plus, est connu pour être plus problématique vis-à-vis du transfert de contaminants.

3.2.3 Interprétation écotoxicologiques de l'évaluation *a priori* des pesticides

Ces résultats indiquent que le fonctionnement des communautés microbiennes des sols et des sédiments i) est transitoirement perturbé par l'exposition à des pesticides appliqués à des doses représentant le pire des cas d'exposition. Les effets les plus importants étaient observés pour les microcosmes exposés à des mélanges de pesticides. ii) Les communautés microbiennes des sédiments et des sols sont, dans la majorité des cas, résilientes. En effet, suite à la perturbation initiale causée par l'application des pesticides, la composition et l'activité de la communauté microbienne sont restaurées après 28 jours. Cette résilience est possible par i) la dissipation des pesticides appliqués qui a levé ainsi la perturbation résultant de l'exposition de la communauté microbienne aux pesticides, mais aussi ii) du fait de réarrangements de la communauté microbienne rendus possible grâce à la redondance fonctionnelle en son sein. Toutefois, cette étude ne permet pas de dire si la résilience est accompagnée de modification de la diversité de la communauté microbienne.

Bien que statistiquement valable, la signification écologique de l'impact écotoxicologique transitoire des pesticides sur différents marqueurs de l'activité et de la composition de la communauté microbienne des sédiments reste à déterminer. Egalement, la réglementation (guide OCDE 216) mentionne que des effets écotoxicologiques inférieurs à 25% par rapport au témoin après 28 jours d'exposition sont négligeables. Ce seuil d'effet résiduel peut être sujet à réinterprétation au vu des récentes avancées en écologie microbienne sur les capacités de résilience des communautés microbiennes impliquées dans le cycle de l'azote (Nicol et Prosser, 2012). Dans le cas du sol sableux le plus à risque, même si l'effet sur la nitrification n'est que de - 18 % par rapport au contrôle après 28 jours, il peut être considéré comme écologiquement significatif au vu de l'importance de ce processus dans les agroécosystèmes.

Pour avancer sur cette question, il est nécessaire de développer des référentiels de variation naturelle des marqueurs étudiés (NOR, normal operating range, Pereira et Silva et *al.*, 2013), qui permettraient une meilleure interprétation des effets.

3.3 Evaluation a posteriori de l'impact de pesticides sur des fonctions microbiennes aquatiques et terrestres

3.3.1. Impact des pesticides sur des fonctions microbiennes des sédiments

L'exposition environnementale des communautés microbiennes de trois sites de prélèvement sur chacune des rivières Ardières (viticulture) et Coise (grandes cultures) a été évaluée en 2014 et 2015 par la combinaison d'analyses chimiques de la colonne d'eau et de la typologie *in silico* des molécules détectées (Figure 4).

Les résidus de pesticides détectés dans l'Ardières se distribuaient dans les groupes 1 (atrazine, chlorpyrifos-méthyl, diuron, simazine), 3 (métolachlore, norflurazon, norflurazon-desméthyle, procymidone, tébuconazole) et 4 (dimétomorphe, azoxystrobine). Les molécules du groupe 1 comprenaient des molécules aujourd'hui interdites (s-triazines [atrazine, simazine] et urées-substituées [diuron]) et le chlorpyrifos. Certaines molécules des groupes 3 et 4 n'étaient pas détectées chaque année (groupe 3 procymidone et groupe 4 azoxystrobine). Les molécules détectées dans la Coise se distribuaient dans les groupes 1 (atrazine, simazine, carbaryl, diuron et isoproturon) et 3 (acétochlore, s-métolachlore, tébuconazole, époxiconazole). Comme pour l'Ardières, le groupe 1 comprenaient des molécules interdites persistantes retrouvées en 2014 et 2015. Le groupe 3 comprenait des herbicides organochlorés (acétochlore et s-métolachlore) et des fongicides triazoles (tébuconazole et époxiconazole). La typologie des contaminations de l'Ardières et de La Coise a permis de distinguer ces deux rivières par leur « empreinte pesticide ». Ainsi la présence de résidus de pesticides du groupe 4 (fongicides) était spécifique à l'Ardières. L'analyse *in silico* montre que la contamination de l'Ardières était dominée par des résidus de fongicides et d'insecticides connus pour être appliqués dans les vignes du Beaujolais. La contamination de la Coise était dominée par des résidus d'herbicides et de fongicides utilisés dans les grandes cultures (rotation à base de blé/colza/orge). Toutefois, dans les deux bassins versants, des pesticides interdits sont retrouvés, témoignant des usages passés, de leur persistance et de la lenteur de leur transfert depuis les parcelles agricoles vers les eaux superficielles adjacentes.

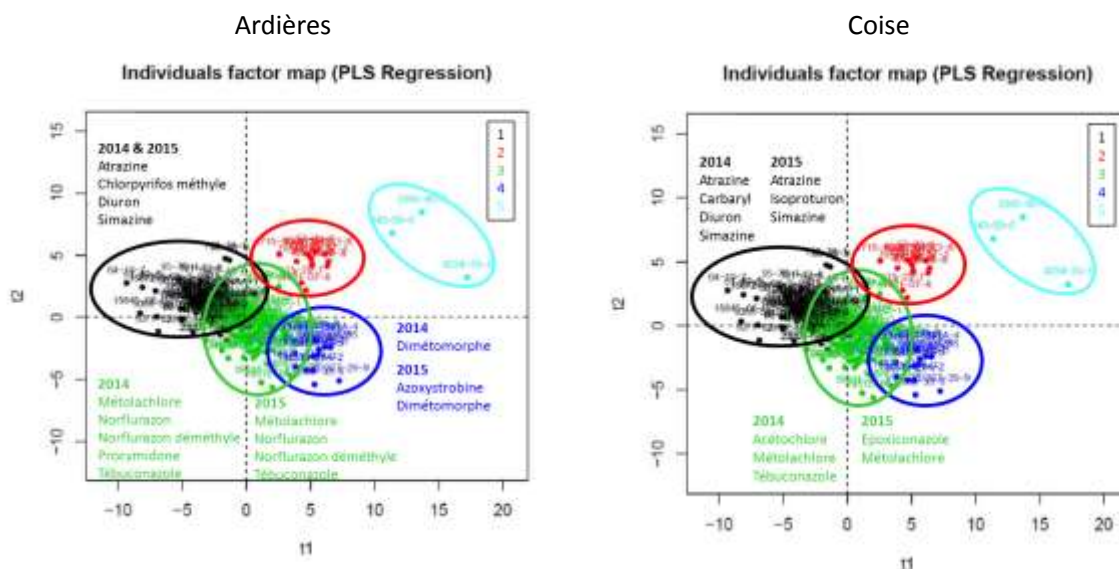


Figure 4 : Classification par typologie *in silico* des molécules (pesticides et produits de transformation) détectées dans l'Ardières (panneau de gauche) et dans la Coise (panneau de droite) (groupe 1 : noir ; 2 : rouge ; 3 : vert ; 4 : bleu foncé et 5 : bleu clair).

La communauté bactérienne des sédiments de l'Ardières et la Coise était active et capable de minéraliser le glyphosate, le chlorpyrifos et, dans une moindre mesure, le diuron. La capacité des communautés microbiennes des sédiments à minéraliser ces pesticides n'était pas affectée par le

gradient de contamination chimique (amont⇒aval) observée dans ces deux cours d'eau caractérisés par des « empreintes pesticides » différentes. Cela suggère que les niveaux de contamination en pesticides observés durant la période d'étude n'étaient pas suffisants i) pour induire l'adaptation de la communauté microbienne sédimentaire à la biodégradation des pesticides auxquels elle était exposée chroniquement ou ii) pour modifier sa capacité à minéraliser des substrats facilement dégradables, tels que l'acétate de sodium. Cela met en évidence la limite de ces descripteurs pour évaluer l'effet écotoxicologique du gradient de contamination chimique (amont⇒aval).

3.3.2. Impact des pesticides sur des fonctions microbiennes des sols

L'évaluation *a posteriori* de l'impact de l'exposition environnementale sur la capacité d'épuration de la communauté microbienne des sols a été conduite sur les différentes parcelles du dispositif PIC (section 2.1).

Les pratiques culturales différenciées appliquées sur ce dispositif depuis plus d'une dizaine d'année ne semblent pas avoir influencé de manière significative l'activité microbienne des sols évaluée par la minéralisation d'un composé carboné simple tel que l'acétate de sodium. En revanche, il semble qu'elles aient influencé la capacité de la communauté microbienne des sols à dégrader des composés plus complexes tels que le glyphosate, le 2,4-D ou encore l'atrazine. L'activité de minéralisation du glyphosate et de l'atrazine étaient les plus élevées dans les échantillons prélevés sur la parcelle S1 (agriculture raisonnée) et la plus faible dans ceux provenant de la parcelle S2 (protection intégrée sans labour et désherbage). Les autres traitements (S3, protection intégrée avec labour et désherbage localisé ; S4, protection intégrée avec désherbage chimique si nécessaire ; S5, protection intégrée sans désherbage mécanique) avaient des valeurs intermédiaires. Pour le 2,4-D, l'activité de minéralisation la plus élevée a été enregistrée dans le traitement S4, la plus faible dans les sols S2 et S3, les autres traitements ayant des valeurs comprises entre ces deux extrêmes.

Pour conclure, les activités de minéralisation du glyphosate, du 2,4-D et de l'atrazine sont les plus faibles dans la parcelle menée en protection intégrée sans labour et désherbage. En revanche, elles sont les plus élevées dans les sols exposés aux pesticides probablement en raison de l'adaptation de la communauté microbienne résultant de l'exposition à ces composés. Ces premiers résultats indiquent que la capacité de minéralisation des pesticides est un trait microbien affecté par les pratiques de désherbage et, qu'en conséquence, il pourrait constituer un marqueur d'exposition de la communauté microbienne aux pesticides.

Conclusion

Cette étude visait à tester un bouquet d'indicateurs microbiens pour évaluer l'impact *a priori* des pesticides appliqués seuls ou en mélange sur des fonctions microbiennes (cycle des nutriments et capacité épuratrice) du sol et des sédiments. L'EFSA a en effet engagé une réflexion concertée avec des experts européens pour définir de nouveaux objectifs spécifiques de protection (incluant les fonctions écosystémiques du sol supportées par les microorganismes) dans les études d'évaluation du risque écotoxicologique pour l'homologation des produits phytosanitaires (EFSA, 2010).

La typologie *in silico* (TyPol), permettant par des analyses statistiques multivariées de classer des pesticides, représentatifs d'une classe donnée définie par des descripteurs moléculaires et un comportement dans l'environnement (constante d'adsorption, solubilité, temps de demi-vie), a été employée pour choisir des pesticides modèles. Cette classification permet, d'une part, de limiter le nombre de molécules à tester et, d'autre part, d'envisager d'étendre les résultats observés pour un composé à un ensemble de composés présentant un profil typologique similaire.

L'évaluation *a priori* a montré que l'exposition aux pesticides causait des impacts écotoxicologiques sur différents proxys, dont certains, pourraient être considérés comme des traits microbiens terrestres et

aquatiques. Ces effets étaient pour la plupart transitoires, montrant la capacité de la communauté microbienne à récupérer de la perturbation engendrée par l'exposition aux pesticides. Cette observation souligne l'importance de la considération des concepts de résistance et de résilience qui sous-tendent la récupération des traits microbiens supportant des fonctions écosystémiques terrestres et aquatiques. Elle peut cependant interroger quant à la vulnérabilité des communautés microbiennes dans un contexte d'exposition chronique et/ou successive, généralement observée dans les agrosystèmes.

L'évaluation *a posteriori* a montré qu'il était difficile d'établir une relation de causalité entre une exposition aux pesticides et un effet sur un trait microbien (ex : capacité épuratrice de la communauté microbienne) en raison de la variation de nombreux « facteurs confondants » (pédo-climat, stress abiotique et biotique) pouvant la cacher. Toutefois, sur une étude de cas à long terme sur le dispositif PIC, la capacité épuratrice due à l'activité de biodégradation microbienne de pesticides a permis de discriminer les parcelles en fonction des pratiques culturales, suggérant son potentiel indicateur d'exposition aux pesticides. Un suivi réalisé sur la Morcille entre 2008 et 2011 a également démontré la pertinence de ce type de trait pour évaluer la récupération des communautés sédimentaires suite à une diminution de pression chimique par le diuron dans le cours d'eau, consécutivement à un changement de pratique viticole découlant de l'interdiction d'utilisation de cet herbicide (Pesce et al., 2013).

Remerciements

Le site Atelier Ardières-Morcille est soutenu par la Zone Atelier du Bassin du Rhône (ZABR). Les auteurs remercient Virginie Grondin et Christelle Marraud pour leur soutien techniques, lors des mesures d'activité microbiennes. Les mesures d'activités enzymatiques dans les sols ont été réalisées par la plateforme Biochem-Env, un service de l'Infrastructure de Recherche AnaEE-France, soutenue par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) (ANR-11-INBS-0001).

Ce projet a bénéficié du soutien financier de l'ONEMA dans le cadre de l'appel à projet de recherche 2011 du programme « Changer les pratiques agricoles pour préserver les services écosystémiques », en appui à la mise en œuvre de l'Axe 3 du Plan Ecophyto I.

Références bibliographiques

- Crouzet O., Poly F., Bonnemoy F., Bru D., Batisson I., Bohatier J., Philippot L., Mallet C., 2016. Functional and structural responses of soil N-cycling microbial communities to the herbicide mesotrione: a dose—effect microcosm approach, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 4207–4217.
- CGDD/SOeS, 2013. Les pesticides dans les cours d'eau français en 2013. Chiffres & statistiques, n°697, 12 p.
- EFSA, 2010. Scientific opinion on the development of specific protection goal options for environmental risk assessment of pesticides, in particular in relation to the revision of the guidance documents on aquatic and terrestrial ecotoxicology (SANCO/3268/2001 and SANCO/10329/2002), EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR). *EFSA Journal* 2010 8 (10) 1821.
- EFSA, 2016a. Recovery in environmental risk assessments at EFSA, EFSA Scientific Committee. *EFSA Journal* 2016 14 (2) 4313.
- EFSA, 2016b. Scientific Opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for in-soil organisms, EFSA Scientific Committee, Public consultation.
- EU-Regulation 1107/2009/EC of the European Parliament and the council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC.
- EU-Regulation Water Framework Directive 2000/60/EC. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for community action in the field of water policy.

Hossard L., Guichard L., Makowski D., 2017. Lack of evidence for a decrease in synthetic pesticide use on the main arable crops in France. *Science of the Total Environment*, 575, 152-161.

ISO 11063 (2012) Method to directly extract DNA from soil samples.

ISO 14239 (1997) Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

ISO 17601 (2016) Method to quantify the abundance of microbial communities from soil DNA extracts.

ISO 20130 (2017) Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using colorimetric substrates in micro-well plates.

Martin-Laurent F., Kandeler E., Petric I., Djuric S., Karpouzias D., 2013. ECOFUN-MICROBIODIV: an FP7 European project for developing and evaluating innovative tools for assessing the impact of pesticides on soil functional microbial diversity: towards new pesticide registration regulation? *Env. Sci. Poll. Res.* 2: 1203-1205.

Mougin C., Caquet T., 2016. Plan Ecophyto, pesticides et biodiversité : premiers enseignements. *Science et pseudo-sciences*. 316 : 37-41.

Pereira e Silva M.C., Semenov A.V., Schmitt H., van Elsas J.D., Salles J.F., 2013. Microbe-mediated processes as indicators to establish the normal operating range of soil functioning. *Soil Biology and Biochemistry*, 57, 995–1002

Pesce S., Margoum C., Rouard N., Foulquier A., Martin-Laurent F., 2013. Freshwater sediment pesticide biodegradation potential as an ecological indicator of microbial recovery following a decrease in chronic pesticide exposure: A case study with the herbicide diuron. *Ecol. Indic.* 29: 18-25.

Potier D., 2014. Pesticides et agro-écologie ; les champs du possible. *Ecophyto, réduire et améliorer l'utilisation des phytos*. pp 248.

Servien R., Mamy L., Li Z., Rossard V., Latrille E., Bessac F., Patureau D., Benoit P., 2014. TyPol - a new methodology for organic compounds clustering based on their molecular characteristics and environmental behavior. *Chemosphere* 111, 613–622.

Storck V., Karpouzias D.G., Martin-Laurent F., 2017. Towards a better pesticide policy for the European Union. *Sci. Tot. Env.* 575:1027-1033.

Van-Camp L., Bujarrabal B., Gentile A.R., Jones R.J.A., Montanarella L., Olazabal C., Selvaradjou S.K., 2004. Reports of the technical working groups established under the thematic strategy for soil protection. EUR 21319 EN/4, 872 pp. Office for Official Publications of the, European Communities, Luxembourg.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « *Innovations Agronomiques* », la date de sa publication, et son URL)