

SYNTHESE
(destinée aux utilisateurs et gestionnaires publics)

Développement d'indicateurs microbiens pour l'évaluation de l'impact des pesticides sur des fonctions écosystémiques terrestres et aquatiques (acronyme : IMPEC)

Development of microbial indicators for the evaluation of the impact of pesticides on terrestrial and aquatic ecosystemic functions

Programme : Evaluation et réduction des risques liés à l'utilisation des Pesticides

APR 2011 « Changer les pratiques agricoles pour préserver les services écosystémiques »

Rapport final- Janvier_2016

**Fabrice Martin-Laurent, Coordonnateur (UMR Agroécologie, INRA Dijon)
Stéphane Pesce (Irstea Lyon), Olivier Crouzet, Nathalie Cheviron, Laure Mamy
et Christian Mougin et Pierre Benoit (UMR EcoSys, INRA Versailles et Grignon)**

En français

CONTEXTE GENERAL

Pour atteindre les objectifs réglementaires fixés par la Commission Européenne dans le cadre de la directive cadre sur l'eau (Directive 2000/60/CE), le gouvernement français a mis en place suite au Grenelle de l'Environnement, le plan Ecophyto. L'un des objectifs du plan est de réduire l'utilisation des pesticides en France afin de limiter la détérioration de qualité chimique et écologique des masses d'eau causée par les résidus de pesticides. Toutefois malgré les efforts consentis ces dernières années, le rapport de Dominique Potier au premier Ministre Manuel Valls intitulé 'Pesticides et agro-écologie, les champs du possible' rapportait qu'au cours du plan Ecophyto 1, la quantité de pesticides en France n'avait pas diminuée et que les pratiques agricoles en dépendaient encore largement. En raison de la connectivité Pour atteindre les objectifs réglementaires fixés par la Commission Européenne dans le cadre de la directive cadre sur l'eau (Directive 2000/60/CE), le gouvernement français a mis en place suite au Grenelle de l'Environnement, le plan Ecophyto. L'un des objectifs du plan est de réduire l'utilisation des pesticides en France afin de limiter la détérioration de qualité chimique et écologique des masses d'eau causée par les résidus de pesticides. Toutefois malgré les efforts consentis ces dernières années, le rapport de Dominique Potier au premier Ministre Manuel Valls intitulé 'Pesticides et agro-écologie, les champs du possible' rapportait qu'au cours du plan Ecophyto 1, la quantité de pesticides en France n'avait pas diminuée et que les pratiques agricoles en dépendaient encore largement. La connectivité des ressources aquatiques et terrestres à l'échelle des paysages agricoles est un des éléments à l'origine de la problématique environnementale engendrée par les pesticides. Lors de la préparation de la directive cadre européenne sur les sols, l'agriculture conventionnelle ayant recourt quasi-systématiquement aux pesticides avait été identifiée comme un risque majeur, susceptible d'altérer la biodiversité des sols et les fonctions écosystémiques qu'ils remplissent, mettant à terme en cause la durabilité des agrosystèmes (Van Camp et al. 2004). Le Millenium Ecosystem Assessment (2005) a aussi identifié le recourt à l'agrochimie comme une menace pour les fonctions écosystémiques remplies par les sols ((I) support : production primaire, cycle des nutriments ; (II) régulation : régulation du climat, contrôle de l'érosion et rétention des sédiments, filtration et contrôle biologique et (III) culturel : esthétique et récréatif). Etudes après études, l'usage des pesticides a été identifié comme une menace sur la biodiversité et l'activité des communautés microbiennes présentes dans les agrosystèmes, susceptible de compromettre leur durabilité (Philippot et al. 2007, Hussain et al. 2009) et de conduire à la détérioration des compartiments environnementaux adjacents notamment les cours d'eau récepteurs de la pollution chimique (Montuelle et al. 2010). Ainsi, sur le long terme, une altération des communautés microbiennes terrestres et aquatiques pourra avoir des conséquences sur l'expression des services écosystémiques conduisant, entres autres, à la diminution de la fertilité des sols, l'augmentation des risques d'érosion, et la diminution des capacités épuratrices contribuant à diminuer les rendements et à augmenter la pollution des sols et des eaux, respectivement. Bien que ces risques soient connus, nous restons démunis pour estimer les impacts des intrants chimiques (pesticides et engrais) sur les services écosystémiques et pour suivre leur évolution suite à des changements de pratique, notamment au travers de la mise en place d'itinéraires techniques innovants dits bas intrants. Dans ce contexte, le projet IMPEC visait à développer de nouveaux indicateurs microbiens susceptibles de rendre compte de l'impact des pesticides sur les populations microbiennes responsables de services écosystémiques clefs dans les environnements terrestres et aquatiques.

OBJECTIFS GENERAUX DU PROJET

Dans les compartiments terrestres et aquatiques des agrosystèmes, les microorganismes sont abondants, diversifiés et actifs. Ils sont impliqués dans différentes fonctions écosystémiques telles que le cycle des nutriments et le rôle filtre

des sols. Bien que le concept d'assurance écologique attribue une valeur positive à la biodiversité, les conséquences de la contamination des agrosystèmes par des pesticides, sur le fonctionnement des microorganismes demeurent controversées. Les avancées récentes de l'écologie microbienne ont permis le développement de nouveaux marqueurs pouvant rendre compte des effets de pesticides sur des fonctions écosystémiques remplies par les microorganismes. Ces marqueurs pourraient s'avérer intéressants pour évaluer/prévoir le risque environnemental de nouveaux pesticides mais aussi suivre la restauration de milieux contaminés, via l'évolution des fonctions écosystémiques rendues par les différents compartiments de l'environnement (sol et eau).

Dans ce contexte, le projet IMPEC visait à développer des indicateurs microbiens, en utilisant de nouvelles approches d'écologie microbienne, pour estimer l'impact des pesticides sur des fonctions écosystémiques terrestres et aquatiques: (i) la dégradation de différents composés carbonés et la nitrification, qui sont liées au service cycle des nutriments et (ii) la dégradation de différents composés pesticides liée au service filtre. Le projet visait à évaluer *a priori* l'impact de pesticides appliqués seuls ou en mélange sur le niveau d'expression de fonctions écosystémiques rendus par les sols et les sédiments (évaluation pré-homologation des pesticides). Il visait aussi à évaluer l'impact *a posteriori* de l'application de produits phytosanitaires sur des fonctions écosystémiques dans des contextes agronomiques (grandes cultures et contexte viticole) et pédoclimatiques contrastés (suivi post-homologation des pesticides). Pour atteindre ces objectifs, il convenait de caractériser du mieux possible les scénarios d'exposition de la communauté microbienne des sols. Pour ce qui concernait l'évaluation de l'impact des pesticides *a priori*, des scénarii d'exposition différenciés ont été définis sur la base de la typologie *in silico* menée à l'aide du QSAR Typol des pesticides utilisés et/ou retrouvés sur les sites expérimentaux étudiés. Pour ce qui concerne l'évaluation *a posteriori*, le choix des sites expérimentaux a été crucial puisque la connaissance des chroniques d'exposition a été l'élément clef retenu pour définir le scénario d'exposition des communautés microbiennes fonctionnelles. Les chroniques d'exposition des communautés benthiques de la Morcille sont décrites depuis de nombreuses années grâce aux travaux de l'Irstea de Lyon et elles permettront de définir le scénario d'exposition en contexte viticole. Pour ce qui concerne le compartiment terrestre, les chroniques d'exposition des communautés microbiennes seront déterminées par (i) l'historique de traitement enregistré depuis plus d'une dizaine d'années sur le dispositif PIC (Protection Intégrée des Cultures) du domaine de Bretenière (INRA Dijon) visant à tester des systèmes de culture innovants promouvant la diminution de l'utilisation des pesticides.

QUELQUES ELEMENTS DE METHODOLOGIE

L'objectif de ce projet était de développer des indicateurs microbiens permettant d'évaluer la résistance de services écosystémiques remplies par les sols et les sédiments contaminés par différents pesticides. Le projet IMPEC a non seulement ciblé le cycle des nutriments et la fonction épuratrice des communautés microbiennes des sols et des sédiments mais aussi leurs compositions taxonomiques. Des activités enzymatiques extracellulaires (ISO 20130) 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. La capacité de la communauté microbienne à minéraliser (ISO 14239) différents composés plus ou moins complexes (acétate de sodium, 2,4-D et glyphosate) a été mesurée comme proxy de

la capacité épuratrice des sols. La composition taxonomique de la communauté microbienne des sols et des sédiments a été évaluée par PCR quantitative (ISO 17601) ciblant onze groupes microbiens à partir de l'ADN extrait directement du sol ou des sédiments (ISO 11063).

Pour atteindre ces objectifs, le projet IMPEC était composé de trois actions : (a) typologie *in silico* des pesticides pour définir les différents scénarii d'exposition des communautés microbiennes, (b) évaluation *a priori* et (c) *a posteriori* de l'impact des pesticides sur des fonctions écosystémiques supportées par les communautés microbiennes des sols et des sédiments.

Le choix des pesticides testés dans l'évaluation *a priori* a été établi (a) en utilisant la méthodologie TyPol (Servien et al., 2014). Cette méthodologie a été appliquée pour classer les pesticides (i) retrouvés dans la rivière Morcille, localisée au cœur de la région viticole du Beaujolais et (ii) enregistrés dans l'historique de traitement du dispositif PIC dans un contexte de grandes cultures (dispositif PIC adventice, INRA Dijon). Cette étude a permis de sélectionner des pesticides représentatifs du contexte viticole (1 herbicide : glyphosate ; 2 fongicides : dimétomorphe, tébuconazole) et des grandes cultures (1 herbicide : isoproturon ; 1 insecticide : chlorpyrifos et 1 fongicide : tébuconazole).

L'évaluation *a priori* (b) de l'impact de ces différents pesticides seuls ou appliqués en mélange, à des doses réalistes, sur des fonctions microbiennes a été conduite sur des microcosmes de sols ou de sédiments incubés en conditions de laboratoire. Dans chacune de ces études la dissipation des pesticides a été suivie par radiorespirométrie afin de définir l'évolution du scénario d'exposition des communautés microbiennes. Des échantillons prélevés après 4 et 25 jours d'exposition ont été analysés par différentes méthodes pour estimer l'impact des pesticides sur le cycle des nutriments et la fonction épuratrice des communautés microbiennes des sols et des sédiments mais aussi sur leurs compositions taxonomiques.

L'évaluation *a posteriori* (c) de l'impact de pesticides sur des fonctions écosystémiques remplies par des microorganismes des sols ou des sédiments a été menée dans des contextes agricoles différents : grandes cultures (dispositif PIC, INRA Dijon ; bassin versant de la Coise, Irstea Lyon-Villeurbanne) et contexte viticole du Beaujolais (Bassin versant de l'Ardières, Irstea Lyon-Villeurbanne). La caractérisation du scénario d'exposition des communautés microbiennes (i) des sédiments a été réalisée par le suivi de l'état chimique des cours d'eau (Ardières et Coise) à différentes stations (gradient de pollution amont ⇒ aval) et la typologie *in silico* des contaminants et (ii) des sols par la consultation de l'historique de traitements phytosanitaires appliqués sur le dispositif PIC (gradient allant de pratiques culturales conventionnelles à la protection intégrée). Les échantillons de sédiments (Ardières et Coise, 3 stations pour chaque rivière) et de sol (dispositif PIC, 5 pratiques culturales) ont été analysés au laboratoire pour évaluer la fonction épuratrice des communautés microbiennes. Pour ce faire la minéralisation de différents composés a été évaluée par radiorepirométrie ; (i) dans les sédiments : l'acétate de sodium, le chlorpyrifos, le diuron, le glyphosate et le tébuconazole, (ii) dans les sols : l'acétate de sodium, l'atrazine, le 2,4-D et le glyphosate.

RESULTATS OBTENUS

1. Typologie *in silico*

Les pesticides appliqués sur le dispositif PIC (Domaine Bretenière, INRA Dijon) et ceux détectés dans la rivière Morcille (Irstea Lyon-Villeurbanne) et dans la rivière

Trec (Irstea Bordeaux) ont été analysés avec le Q-SAR TyPol. Environ une centaine de pesticides ont été analysés en considérant pour chacun d'entre eux sept paramètres environnementaux (Sw, Kow, Pvp, KH, Koc, DT50 et BCF) et quarante descripteurs moléculaires (nombre et types d'atome, index de connectivité, surface, moment dipolaire, polarisabilité, énergies).

La classification *in silico* obtenue avec TyPol a conduit à la répartition de ces différents pesticides et métabolites dans les cinq groupes:

- groupe 1 [à dominance herbicides] : molécules caractérisées par une énergie totale élevée mais peu halogénées, à faible index de connectivité (peu ramifiées), caractérisées par des valeurs de DT50 moyennes et des BCF plutôt faibles. On y retrouve des molécules de polarité élevée (composés ionisables) à moyenne (urées).
- groupe 2 [insecticides essentiellement]: molécules halogénées, à fort index de connectivité de valence, caractérisées par des valeurs de DT50, Kow et BCF plutôt élevés.
- groupes 3 et 4 [co-dominance fongicides-herbicides]: 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 molécules du groupe 4 sont cependant marquées par des structures plus complexes, avec plusieurs cycles aromatiques (pyrethroides, strobilurines, triazoles) et de polarisabilités plus élevées (en moyenne 42 Å³) que celles du groupe 3 (en moyenne 32 Å³).
- groupe 5 [chlordécone, mirex et kelevan]: molécules halogénées, de type homocubane, à très fort index de connectivité de valence et caractérisées par des valeurs de DT50 et BCF très élevées.

L'ensemble des molécules et des métabolites recensés sur les sites d'études (réseau PIC domaine d'Epoisses, Morcille (Beaujolais) et Trec (Lot-et-Garonne)) se retrouvaient dans les 4 premiers groupes issus de la classification TyPol. Nous avons choisi de retenir l'appartenance à des groupes distincts comme une clef de décision qui a été utilisée pour raisonner le choix des molécules à tester dans l'évaluation de l'impact écotoxicologique a priori. L'hypothèse sous-jacente est que les pesticides choisis seront représentatifs des autres composés appartenant au même groupe. Trois pesticides appartenant à trois groupes différents ont été choisis pour l'étude d'impact a priori. Ces trois pesticides, dont les caractéristiques moléculaires et environnementales diffèrent, sont censés produire différents scénarii d'exposition, susceptibles de perturber la composition et l'activité de la communauté microbienne des sols et des sédiments.

2. Evaluation a priori de l'impact des pesticides sur les fonctions écosystémiques des sols et des sédiments

2.1. Evaluation de l'impact de pesticides sur des fonctions microbiennes des sédiments

Cette étude a consisté à exposer des microcosmes de sédiments (prélevés dans la station de référence de la rivière Morcille) à trois pesticides représentatifs des pratiques de protection de la vigne dans le contexte du Beaujolais (dimétomorphe (DMM), tébuconazole (TBZ), glyphosate (GLY)) appliqués seuls ou en mélange. Des échantillons prélevés après 4 et 25 jours d'exposition ont été analysés pour estimer l'impact des pesticides sur le cycle des nutriments et la fonction épuratrice des communautés microbiennes des sédiments mais aussi leurs compositions

taxonomiques. Cette étude a montré qu'après 4 jours d'exposition en 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, composition de la communauté bactérienne). Toutefois, ces modifications étaient pour la plupart transitoires car la quasi-totalité des marqueurs n'étaient plus différents du contrôle après 25 jours d'exposition. Ces résultats montrent que la communauté microbienne des sédiments était résiliente ; après la perturbation initiale causée par l'exposition aux pesticides, la composition et l'activité de la communauté microbienne étaient restaurées. Cette restauration était rendue possible probablement en raison de la dissipation des pesticides appliqués qui a levé la perturbation résultant de l'exposition de la communauté microbienne aux pesticides. Les effets les plus marqués ont été obtenus dans les traitements DMM et MIX (modification capacité de dégradation de l'atrazine et du 2,4-D, activité phosphatase,...). Certains marqueurs étaient sensibles à tous les pesticides appliqués (activité phosphatase, abondances des α - et β -protéobactéries, planctomyctes et des archéobactéries) tandis que d'autres demeuraient insensibles au traitement appliqué (capacité de dégradation du diuron, activité uréase, abondance communauté bactérienne totale, γ -protéobactéries, firmicutes). Les premiers pourraient constituer des marqueurs pertinents de l'exposition de la communauté microbienne des sédiments aux pesticides. Les seconds pourraient constituer des marqueurs de stabilité de la communauté microbienne. Au-delà de la significativité statistique des modifications observées suite à l'exposition aux pesticides, la signification biologique de ces modifications reste à déterminer d'autant que la communauté microbienne était résiliente. L'acquisition de référentiel (NOR, normal operating range) pour chaque paramètre mesuré devrait permettre d'interpréter la signification biologique de l'importance des modifications observées.

2.2. Evaluation de l'impact de pesticides sur des fonctions microbiennes des sols

Cette étude a consisté à exposer des microcosmes de trois sols différents (Chambeire, La Cage, Pierrelaye) à trois pesticides représentatifs des pratiques de protection des grandes cultures (isoproturon (IPU), chlorpyrifos (CHL), et tébuconazole (TCZ)) appliqués seuls ou en mélange. Des échantillons prélevés après 4 et 25 jours d'exposition ont été analysés pour estimer l'impact des pesticides sur le cycle des nutriments et la fonction épuratrice des communautés microbiennes des sols mais aussi leurs compositions taxonomiques.

Cette étude a permis de montrer que l'effet causé par l'exposition aux pesticides appliqués seuls ou mélange sur la communauté microbienne dépend du type de pesticide mais également du type de sol qui conditionne la biodisponibilité et le devenir du pesticide et donc l'exposition de la communauté microbienne. Nous avons pu montrer que l'exposition à l'IPU et au TBZ ne modifiait pas la composition, l'abondance et l'activité de la communauté microbienne dans les trois types de sol. En revanche, l'exposition au CHL et au MIX modifiait de manière significative mais transitoire la composition, l'abondance et l'activité de la communauté microbienne du sol de La Cage et dans une moindre mesure du sol de Pierrelaye. A la fin de la période d'incubation la plupart des proxys mesurés dans les microcosmes exposés aux pesticides avaient récupéré des valeurs comparables à celles observées dans les microcosmes contrôle indiquant la résilience de la communauté microbienne. La diminution de l'exposition au cours du temps en raison de la dissipation des pesticides a rendu possible la résilience de la communauté microbienne. La

redondance fonctionnelle de la communauté microbienne est probablement à l'origine de sa récupération. Les analyses menées ne permettent pas de dire si la récupération était accompagnée par des modifications de la diversité et/ou d'autres traits fonctionnels de la communauté microbienne. L'application du mélange de pesticides est une modalité expérimentale peu représentative des pratiques culturales. L'application de traitements successifs plus représentatifs des pratiques agricoles, constituerait un autre dispositif expérimental qui pourrait s'avérer intéressant pour évaluer l'effet de la succession de stress sur la capacité de récupération de la communauté microbienne des sols. Cette étude montre que des activités microbiennes telles que la nitrification ou la minéralisation du 2,4-D représentative de traits fonctionnels de la communauté microbienne liés au cycle des nutriments et à la capacité épuratrice des sols, respectivement, sont sensibles à l'exposition aux pesticides. Le fait que ces traits fonctionnels soient supportés par des groupes microbiens relativement peu abondants et peu diversifiés explique pour partie leur vulnérabilité aux pesticides. Toutefois, sur un temps relativement court ces traits fonctionnels sont récupérés montrant la résilience de la communauté microbienne.

3. Evaluation a posteriori de l'impact des pesticides sur les fonctions écosystémiques des sols et des sédiments.

3.1. Evaluation a posteriori de l'impact des pesticides sur les fonctions écosystémiques des sédiments

Les travaux relatifs à l'évaluation a posteriori de l'impact de l'exposition environnementale sur la capacité d'atténuation des polluants chimiques des sédiments ont été menés au cours de l'année 2015 sur les bassins versants de l'Ardières (contexte viticole du Beaujolais) et de la Coise (contexte de grandes cultures). L'exposition environnementale des communautés microbiennes de trois stations expérimentales de l'Ardières et de la Coise a été évaluée par des analyses chimiques de la colonne d'eau et par la typologie *in silico* des molécules retrouvées. Cette étude a permis de montrer que les molécules détectées dans l'Ardières se distribuaient dans les groupes 1 (atrazine, chlorpyrifos-methyl, diuron, simazine), 3 (metolachlore, norflurazon, norflurazon-desmethyle, procymidone, tebuconazole) et 4 (dimetomorphe, azoxystrobine). Les molécules du groupe 1, comprenaient des molécules 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, tebuconazole, epoxiconazole). Comme pour l'Ardières, le groupe 1 comprenaient des molécules interdites persistantes retrouvées en 2014 et 2015. Le groupe 3 comprenait des herbicides organochlorés (acétochlor et s-metolachlor) et des fongicides triazoles (tebuconazole et epoxyconazole). 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* que la contamination de l'Ardières était dominée par des résidus de fongicides et d'insecticides appliqués dans le contexte viticole du Beaujolais, alors que 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 herbicides interdits sont retrouvés témoignant des usages passés, de la persistance de ces composés et

de la lenteur de leur transfert des parcelles agricoles vers les masses d'eau adjacentes.

La capacité épuratrice des communautés microbiennes de sédiments prélevés aux stations expérimentales de l'Ardières et de la Coise a été mesurée au laboratoire en radiorespirométrie en utilisant plusieurs substrats (acétate de sodium, chlorpyrifos, diuron, glyphosate et tébuconazole). Bien que l'Ardières et la Coise présentaient des profils de contamination différents, la capacité des communautés microbiennes des sédiments de ces deux rivières à minéraliser différents pesticides ne semblaient pas grandement affectée par le gradient (amont⇒aval) de contamination chimique observée dans ces cours d'eau. Cela suggère que les niveaux de contamination observés durant la période d'étude n'étaient pas suffisants pour induire une adaptation forte de la communauté microbienne sédimentaire à la biodégradation des pesticides testés ou que d'autres facteurs environnementaux (température, nutriments,...) masquaient l'effet ecotoxicologique du gradient de contamination. Cette étude nous a permis de confirmer que la communauté bactérienne des sédiments de ces deux rivières était active et capable de minéraliser le glyphosate, le chlorpyrifos et, dans une moindre mesure, le diuron.

3.2. Evaluation a posteriori de l'impact des pesticides sur les fonctions écosystémiques des sols

Les travaux relatifs à l'évaluation a posteriori de l'impact de l'exposition environnementale sur la capacité d'atténuation des polluants chimiques des sédiments ont été menés au cours l'année 2013 sur le dispositif PIC (domaine de Bretenière, INRA Dijon) visant à étudier l'impact de pratiques agricoles différenciées pour gérer les plantes adventices dans les grandes cultures allant de pratiques agricoles conventionnelles à la protection intégrée des cultures. La capacité épuratrice de la communauté microbienne des sols prélevés dans les différentes parcelles du dispositif PIC (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 désherbage mécanique) a été mesurée au laboratoire en radiorespirométrie en utilisant plusieurs substrats (acétate de sodium, chlorpyrifos, diuron, glyphosate et tébuconazole). Un bilan de masse a été réalisé à la fin de la période d'incubation afin de déterminer la répartition des molécules étudiées dans les différents compartiments du sol.

Les pratiques culturales différenciées appliquées sur le dispositif PIC (Unité expérimental, INRA Dijon) 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. Par contre, il semble qu'elles aient influencées la capacité de la communauté microbienne 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) ayant des valeurs intermédiaires entre ces deux extrêmes. 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 étant compris entre ces deux extrêmes. Pour conclure :

-les activités de minéralisation du glyphosate, du 2,4-D et de l'atrazine étaient les plus faibles dans la parcelle menée en protection intégré sans labour et désherbage, - tandis qu'elles étaient 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 tendent à indiquer que la capacité de minéralisation des pesticides est proportionnelle à l'exposition aux pesticides et qu'en conséquence elle pourrait constituer un marqueur d'exposition de la communauté microbienne aux pesticides.

IMPLICATIONS PRATIQUES, RECOMMANDATIONS, REALISATIONS PRATIQUES, VALORISATION

- Implications pratiques :

Le projet IMPEC a permis l'exploration d'un bouquet de méthodologies pour évaluer l'impact a priori et a posteriori de quelques pesticides appliqués seuls ou mélange sur les microorganismes du sol et des sédiments et sur les fonctions écosystémiques qu'ils supportent (cycle des nutriments et capacité épuratrice). Il propose une méthodologie in silico (QSAR TyPol) pour raisonner le choix des pesticides à étudier dans des expérimentations menées au laboratoire. Il suggère que l'évaluation a priori de l'impact des pesticides sur les microorganismes du sol menée dans le cadre de la réglementation pour l'autorisation de mise sur le marché des pesticides (r 1107/2009 CE) en étudiant simplement la minéralisation du carbone (OCDE 217) et de l'azote (OCDE 216) pourrait être améliorée en considérant d'autres tests fonctionnels rendant compte de fonctions écosystémiques des sols supportées par les microorganismes.

IMPEC propose de nouvelles perspectives pour mener l'évaluation a priori, visant à estimer l'impact des pesticides sur les fonctions écosystémiques remplies par les communautés microbiennes des sols et des sédiments comme l'a récemment suggéré l'EFSA dans une opinion scientifique proposant de nouveaux objectifs spécifiques de protection (incluant les fonctions écosystémiques du sol supportées par les microorganismes) pour mener les études de risque environnemental requises dans le processus d'homologation des produits phytosanitaires (EFSA, 2010).

Par ailleurs, IMPEC a montré que les impacts écotoxicologiques observés sur différents proxys étaient la plupart du temps transitoire montrant la capacité de la communauté microbienne à récupérer de la perturbation engendrée par l'exposition aux pesticides. IMPEC souligne l'importance de la considération des concepts de résistance et de résilience qui sous-tendent la récupération des fonctions microbiennes supportant des services écosystémiques des sols. Ces considérations sont en accord avec la nouvelle opinion scientifique publiée par l'EFSA suggérant l'implémentation dans du concept de 'récupération écologique' dans les études de risque environnemental requises dans le processus d'homologation des produits phytosanitaires (EFSA, 2016).

IMPEC a montré que l'évaluation de l'impact a posteriori des pesticides sur la capacité épuratrice de la communauté microbienne des sédiments ou des sols était difficile à mener en raison de la variation de nombreux autres facteurs 'confondants' (pédo-climat, stress abiotique et biotique) pouvant cacher la modification engendrée par l'exposition aux résidus de pesticides. Toutefois, sur une expérience à long terme mise en place depuis plus d'une dizaine d'années, l'analyse de la capacité épuratrice du sol a permis de discriminer les parcelles en fonction des pratiques culturales suggérant que ce indicateur microbien pourrait être un indicateur d'exposition aux pesticides.

- Recommandations et limites éventuelles :

IMPEC recommande de poursuivre les recherches visant à estimer l'impact a priori des pesticides sur des fonctions microbiennes supportant des fonctions écosystémiques des sols afin de définir des tests fonctionnels pouvant être utilisés dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental requise dans le processus d'homologation.

La typologie *in silico* est un outil performant qui permet la classification des pesticides selon leurs propriétés physicochimiques et environnementales permettant de raisonner le choix des pesticides étudiés. Toutefois, nous n'avons pour l'instant pas d'informations nous permettant d'estimer la variation de l'impact écotoxicologique de pesticides appartenant au même groupe TyPol sur la communauté microbienne. Des études supplémentaires doivent être menées pour évaluer la valeur écotoxicologique de la classification TyPol.

Les résultats d'IMPEC montre que l'impact écotoxicologique causé par les pesticides semble être sol dépendant posant la question de la généralité de nos observations. Pour mener les études d'évaluation du risque environnemental, l'EFSA recommande la considération de trois pédoclimats (scandinave, tempéré et méditerranéen). Au vu des résultats d'IMPEC cela paraît insuffisant car au sein du pédoclimat tempéré nous avons démontré de la variabilité. L'étude de la réponse écotoxicologique de sols représentatifs des sols français en réponse apparaît donc nécessaire.

Par ailleurs la question de l'interprétation biologique des résultats obtenus sur les différents indicateurs microbiens reste ouverte. En effet, la signification biologique d'une différence statistique sur la mesure d'un indicateur microbien en réponse à l'exposition à un pesticide par rapport à un traitement contrôle reste pour l'instant inconnue en l'absence de référentiel (normal operating range).

- Réalisations pratiques et valorisation :

Les travaux menés dans le cadre d'IMPEC ont permis de tester quatre méthodes en cours de normalisation auprès de l'ISO : (i) ISO 17601 'Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative realtime PCR from DNA directly extracted from soil', (ii) ISO NP/14239 'Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions', (iii) ISO NP/16072 'Laboratory methods for determination of microbial soil respiration' (Chef de projet : F Martin-Laurent, UMR Agroécologie) et (iv) ISO 'Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using colorimetric substrates in micro-well plates' (Chef de projet : N Cheviron, UMR AgroSys). Ces méthodes sont disponibles et pourront dorénavant être considérées pour conduire l'évaluation de l'impact des pesticides sur les microorganismes du sol.

Par ailleurs, ils ont également permis d'alimenter la réflexion ayant conduit à la rédaction d'une opinion scientifique de l'EFSA intitulée 'Scientific opinion on the temporal and spatial recovery of non-target organisms for environmental risk assessments' publiée en Février 2016.

Deux articles scientifiques ont été publiés dans des revues internationales et d'autres sont en préparation. Dix communications scientifiques ont été réalisées dans des colloques nationaux et internationaux.

PARTENARIATS MIS EN PLACE

IMPEC reposait sur un partenariat scientifique développé entre UR Maly (Irtrea Lyon-Villeurbanne), l'UMR AgroSys (INRA Versailles-Grignon) et l'UMR Agroécologie (INRA Dijon). Par ailleurs sur la base de ce partenariat scientifique, IMPEC a

développé sa sphère d'influence auprès d'instances normatives et réglementaires telles que l'AFNOR (commission T95E Ecotoxicologie terrestre), l'ISO (ISO SC4/WG4) et l'EFSA (SC Overarching, WG Elements of Environmental Risk Assessment) au travers des travaux menés par N Cheviron et C Mouglin (UMR AgroSys, INRA Versailles) et F Martin-Laurent (UMR Agroécologie, INRA Dijon).

POUR EN SAVOIR PLUS

EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR), 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 Journal 2010;8(10):1821. [55 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2010.1821.

EFSA Scientific Committee, 2016. Scientific opinion on recovery in environmental risk assessments at EFSA. EFSA Journal 2016; 14(2):4313. 85 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4313

ISO/DIS 17601 Soil quality - Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative realtime PCR from DNA directly extracted from soil.

ISO/CD 20130 Soil quality – Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using colorimetric substrates in micro-well plates.

ISO/NP 14239 Soil quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

ISO/NP 16072 Soil quality – Laboratory methods for determination of microbial soil respiration.

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. *Ecological Indicators* 29: 18-25.

Storck V, Lucini L, Mamy L, Ferrari F, Papadopoulou ES, Nikolaki S, Karas PA, Servien R, Karpouzas DG, 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.

LISTE DES OPERATIONS DE VALORISATION ISSUES DU CONTRAT (ARTICLES DE VALORISATION, PARTICIPATIONS A DES COLLOQUES, ENSEIGNEMENT ET FORMATION, COMMUNICATION, EXPERTISES...)

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	
Publications scientifiques parues	<p>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. <i>Ecological Indicators</i> 29: 18-25.</p> <p>Storck V, Lucini L, Mamy L, Ferrari F, Papadopoulou ES, Nikolaki S, Karas PA, Servien R, Karpouzas DG, Trevisan M, Benoit P, Martin-Laurent F (2016) Identification and characterization of tebuconazole transformation products in soil by combining suspect screening and molecular typology. <i>Environmental Pollution</i> 208: 537-545.</p>
Publications scientifiques à paraître	
Publications scientifiques prévues	<p>S. Pesce, M. Devers-Lamrani, N. Rouard, Martin-Laurent F. (2016) Functional resilience of stream sediment microbial communities following acute pesticide exposure. In preparation.</p> <p>Crouzet O, Devers M, Cheviron N, Marraud C, Grondin V, Rouard N, Beguet J, Martin-Laurent F. (2016) Multi-criteria assessment of the effect pesticides on soil microbial composition and activity. In preparation.</p>
COLLOQUES	
Participations passées à des colloques	<p>Pesce S., Martin-Laurent F., (2014) La biodégradation des pesticides: un paramètre fonctionnel sous-considéré en écologie et écotoxicologie microbienne? LMGE, Clermont-Ferrand, 26 mai 2014.</p> <p>Devers-Lamrani M., Pesce S., Rouard N., Crouzet O., Cheviron N., Martin-Laurent F. (2014) Impact écotoxicologique de pesticides sur les communautés microbiennes naturelles responsables de la biodégradation de pesticides dans les sédiments de rivière. 44^{ème} congrès du Groupe Français des Pesticides. Schoelcher, Martinique, 26-29 Mai.</p> <p>Martin-Laurent F., Devers M., Rouard N., Crouzet O., Cheviron N., Pesce S. (2014) Ecotoxicological impact of pesticides on natural microbial</p>

Participations futures à des colloques

communities responsible for pesticide biodegradation in river sediments. IUMS 2014, Montréal, Canada, 27 juillet-1^{er} août 2014.

Pesce S., Margoum C., Rouard N., Foulquier A., Martin-Laurent F. (2014) Freshwater sediment pesticide biodegradation potential as an ecological indicator of microbial recovery following a decrease in chronic pesticide exposure. IUMS 2014, Montréal, Canada, 27 juillet-1^{er} août 2014.

Crouzet O., Devers-Lamrani M., Rouard N., Cheviron N., Grondin V., Martin-Laurent F. (2015) Impact écotoxicologique de mélanges de pesticides sur des fonctions microbiennes des sols : apport d'une prise en compte écologique dans l'évaluation des risques. VII colloque de l'AFEM, Anglet, France, 4-6 Novembre 2015.

Mamy L, Benoit P, Barriuso E, Bedos C, Bessac F, Louchart X, Martin-Laurent F., Miege C, Patureau D (2015). Prédiction du comportement des pesticides dans l'environnement à partir de leurs propriétés moléculaires. 45^e congrès du Groupe Français des Pesticides, Versailles, 27-29 mai 2015.

Mamy L, Benoit P, Barriuso E, Bedos C, Bessac F, Louchart X, Martin-Laurent F., Miege C, Patureau D (2015). Prediction of the fate of pesticides in the environment from their molecular properties. XV Symposium on Pesticide Chemistry, Piacenza, Italie – 2-4 Sept. 2015.

Pesce S., Margoum C., Rouard N., Foulquier A., Martin-Laurent F. (2015) Benthic microbial community adaptation to pesticide: a promising biological indicator to assess ecological recovery following a decrease in pesticide contamination. 9th Symposium for European Freshwater Sciences (SEFS), Genève, Suisse, 5-10 Juillet 2015.

Crouzet O, Devers M, Cheviron N, Marraud C, Grondin V, Rouard N, Beguet J, Martin-Laurent F. Indicateurs microbiens de réponse aux pesticides : effet à court terme et résilience. 3^{èmes} journées d'écotoxicologie microbienne (16-18 mars 2016 – Rovaltain, Valence)

F Martin-Laurent, J Beguet, O Crouzet, N Cheviron, M Devers, N Rouard, S Pesce, L Mamy et P Benoit. Evaluation de l'impact des pesticides sur des fonctions écosystémiques terrestres. 3^{èmes} journées d'écotoxicologie microbienne (16-18 mars 2016 – Rovaltain, Valence)

	THESES
Diplômes passés	<p>Tadla C. (2013) La dégradation de l'atrazine: du champ au gène. Licence Professionnelle Microbiologie Industrielle et Biotechnologies. Université Claude Bernard Lyon I, France.</p> <p>Cribiu P. (2015) Analyse et prédiction des effets de pesticides sur des processus microbiens des sols : utilisation de l'outil TyPol. Rapport de Stage de Master ENTPE (Lyon) 88 pp. Encadrement : L. Mamy, O. Crouzet.</p>
Thèses en cours	<p>Veronika Storck. Sujet : Estimation de l'impact écotoxicologique des pesticides sur les communautés microbiennes des sols agricoles : vers le développement de nouvelles recommandations et de nouvelles méthodes pour évaluer la toxicité des pesticides vis-à-vis des communautés microbiennes des sols (Financement du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Ecole Doctorale E2S, Université de Bourgogne, 2013 – 2016, Directeur de thèse : F. Martin-Laurent).</p>
	ARTICLES DE VALORISATION-VULGARISATION
Articles de valorisation parus	<p>Martin-Laurent F., Devers M, Pesce S (2013) Influence de la biodégradation dans l'atténuation des pesticides sur un bassin versant viticole : potentialité des différents éléments du paysage et rôle des zones tampons. Innovations Agronomiques 28 : 35-48.</p>
Articles de valorisation à paraître	
Articles de valorisation prévus	
	AUTRES ACTIONS VERS LES MEDIAS
Actions vers les médias (interviews...) effectuées	
Actions vers les médias prévues	
	ENSEIGNEMENT - FORMATION
Enseignements/formations dispensés	<p>Benoit P. Présentation des travaux in silico avec Typol dans le cadre d'un module de 3^{ème} année AgroParisTech METATOX « De l'évaluation à la gestion des risques toxicologiques pour la santé des écosystèmes et de l'Homme » - Octobre 2015</p>
Enseignements/formations prévus	
	EXPERTISES
Expertises menées	<p>Coordination de l'essai inter-laboratoire international pour valider le standard ISO/DIS 17061 (ISO TC190/SC4/WG4) (Project Leader: F Martin-Laurent, UMR Agroécologie).</p>

<p>Expertises en cours Expertises prévues</p>	<p>Scientific opinion on the temporal and spatial recovery of non-target organisms for environmental risk assessments (European Food Safety Authority (EFSA), SC Overarching, WG Elements of Environmental Risk Assessment (Scientific expert: F Martin-Laurent, UMR Agroécologie).</p>
<p>Méthodologies produites</p>	<p>METHODOLOGIES (GUIDES...) ISO/DIS 17601 Soil quality - Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative realtime PCR from DNA directly extracted from soil (Project Leader: F Martin-Laurent, UMR Agroécologie).</p>
<p>Méthodologies en cours d'élaboration</p>	<p>ISO/CD 20130 Soil quality – Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using colorimetric substrates in micro-well plates (Project Leader : N Cheviron, UMR EcoSys). ISO/NP 14239 Soil quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions (Project Leader: F Martin-Laurent, UMR Agroécologie).</p>
<p>Méthodologies prévues</p>	<p>ISO/NP 16072 Soil quality – Laboratory methods for determination of microbial soil respiration (Project Leader: F Martin-Laurent, UMR Agroécologie).</p>
<p>Précisez...</p>	<p>AUTRES Benoit P. Présentation de l'outil Typol et de son utilisation dans le cadre du projet IMPEC au séminaire « Pesticides, écotoxicologie et exposition environnementale » organisée par la DS Environnement INRA et ALLENVI - 11-12 décembre 2014.</p>