



**INDICATEURS POUR L'EVALUATION DE L'IMPACT DES
PRODUITS PHYTOSANITAIRES SUR LA COMPOSANTE
MICROBIENNE DE LA QUALITE BIOLOGIQUE DES SOLS**
BIOINDICATORS FOR THE ASSESSMENT OF SIDE
EFFECTS OF PESTICIDES ON THE SOIL BIOLOGICAL
STATUS

Programme Evaluation et réduction des
risques liés à l'utilisation des pesticides
Rapport de fin de contrat : rapport scientifique

UMR 1219 Œnologie INRA Université V. Segalen
Bordeaux 2
ISVV
210 chemin de Leysotte
33882 VILLENAVE3 D'ORNON Cedex
G. Soulas
Tel: 05 57 57 58 35
Fax 05 57 57 58 13
Guy.soulas@oenologie.u-bordeaux2.fr

Date : 30/09/2010

N° de contrat : CV07000782
Date du contrat : 25./07/2007.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

INDICATEURS POUR L'EVALUATION DE L'IMPACT DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES SUR LA COMPOSANTE MICROBIOLOGIQUE DE LA QUALITE DES SOLS

EVALUATION ET REDUCTION DES RISQUES LIES A L'UTILISATION DES PESTICIDES

**Responsable scientifique du projet
Guy Soulas**

Autres partenaires scientifiques bénéficiaires :

**Robert Duran
Beatrice Lauga
Fabrice Martin-Laurent
Diederik van Tuinen
Vivienne Gianinazzi-Pearson
Emile Benizri
Corinne leyval
Pascal Guilbaut
Maxime Christen
Xavier Salducci**

A. Rappels sur les justifications du projet de recherche

A.1. Le contexte environnemental

Au delà de l'importance pondérale des micro-organismes du sol, c'est surtout la diversité de leur potentiel biocatalytique qui en fait des auxiliaires indispensables. Ils assurent en effet les transformations essentielles au déroulement des grands cycles biogéochimiques, notamment ceux du carbone et de l'azote (recyclage de la matière organique, fixation symbiotique de l'azote, nitrification, ...). Ils contribuent par ailleurs à l'épuration de composés (xénobiotiques, hydrocarbures, ...) dont le sol est un lieu de passage obligé et qui sont une menace à la fois pour les espèces telluriques et pour l'homme. Compte tenu de ces rôles, les micro-organismes apparaissent comme des acteurs essentiels et irremplaçables du fonctionnement des milieux terrestres et de la durabilité des agrosystèmes. Il semble important, et prioritaire, de se préoccuper de la protection de ce patrimoine biologique.

Inversement, la microflore des sols représente un révélateur potentiel de pressions écologiques, d'origine naturelle ou anthropique, susceptibles de porter atteinte à son intégrité fonctionnelle ou structurale. Les micro-organismes sont donc des indicateurs potentiels de la qualité biologique des milieux naturels (Roper et Ophel-Keller 1997). Ce rôle reste malgré tout relativement controversé. La raison essentielle réside dans la variabilité spatio-temporelle naturelle importante de l'abondance et de la distribution des micro-organismes dans le sol qui conduisent à identifier des effets écotoxicologiques dans un bruit de fond important (Kaputska, 1999 ; Sheppard, 1999 ; Nortcliff, 2002).

A.2. Le contexte réglementaire

La présence de pesticides dans les sols agricoles, dont le caractère permanent est confirmé année après année par les enquêtes de l'Ifen, n'est pas non plus sans risques toxicologiques (pénétration de résidus dans les productions agricoles, contamination des eaux souterraines) et écotoxicologiques (contamination des eaux continentales). En particulier, la prise de conscience que le sol représente une ressource non renouvelable à l'échelle humaine est particulièrement nette dans le milieu viticole à travers les notions de terroir et de développement durable.

Concernant les sols, deux tests microbiens sont actuellement requis, un test de minéralisation du carbone et un test de minéralisation de l'azote. Il s'agit là de tests globaux dont le choix a été dicté par l'hypothèse d'une liaison forte entre la taille de la communauté microbienne dans son ensemble, son activité minéralisatrice et la fertilité des sols (Domsch *et al.*, 1983). Ils s'avèrent notoirement insuffisants pour apprécier la multiplicité dimensionnelle de la réponse des communautés microbiennes naturelles exposées à un polluant. Ainsi, l'effet des pesticides sur les communautés microbiennes des sols, donc sur leur fertilité, reste encore globalement très mal connu après 60 années d'utilisation intensive de ces produits (Bromilow *et al.*, 1996 ; Caux *et al.*, 1998).

Malgré tout, compte tenu du rôle primordial joué par les communautés microbiennes sur le fonctionnement des milieux aquatiques et édaphiques, il s'agit probablement de bons candidats pour contribuer à une meilleure évaluation du risque lié à l'utilisation des pesticides.

A. 3. Le contexte normatif

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Au-delà de la stricte réglementation "Pesticides", d'autres essais microbiens sont actuellement proposés au "catalogue" AFNOR, sous la rubrique "Qualité du sol- Méthodes biologiques". Ainsi, il existe différentes normes relatives aux Lignes Directrices des essais en laboratoire pour la biodégradation / minéralisation de produits chimiques organiques en conditions aérobies (ISO 11226, ISO 14239) ou anaérobies (ISO 15473), aux méthodes de détermination de l'abondance et de l'activité microbienne (ISO 17155 et ISO 16072), de la biomasse microbienne des sols par respiration induite par le substrat ou par fumigation-extraction (ISO 14240), de l'activité déshydrogénase (ISO 23753), de la minéralisation de l'azote et de la nitrification (ISO 14238), de l'effet des polluants sur les champignons mycorhizogènes (norme expérimentale X31-205-1 et 2).

A.4. L'analyse biologique en France

Actuellement, parmi la petite cinquantaine de laboratoires d'analyses de sol exerçant en France, seuls 2 laboratoires, dont la société Celesta-lab (ex ALMA TERRA), utilisent le dosage de la biomasse microbienne en routine, un troisième laboratoire utilisant un test d'activité enzymatique. Bien qu'il n'y ait pas de chiffres officiels, on peut penser que les analyses biologiques concernent moins de 2000 échantillons sur les 300 000 à 500 000 analyses de terre annuelles. De par l'évolution des pratiques culturales vers des techniques simplifiées de travail du sol (les « TCS ») et une diminution globale des intrants quels qu'ils soient, la question de la vie biologique du sol et des capacités à la mesurer se pose de plus en plus fortement chez les agronomes et les agriculteurs.

Les professionnels de l'analyse (c'est le cas de Celesta-lab), relayant la demande du monde agricole, soulignent donc l'utilité d'un indicateur microbien pertinent permettant un diagnostic rapide du statut biologique d'un sol. Les applications seraient nombreuses, tant dans l'évaluation de l'état de dégradation biologique d'un agro-écosystème que dans l'expertise de nouvelles pratiques culturales améliorantes et régénératrices des sols.

B. Le projet de recherche

B.1. Objectifs généraux

Le projet de recherche visait à tester la valeur indicatrice de la microflore des sols vis à vis des risques liés à l'utilisation des pesticides au travers de trois démarches expérimentales s'appuyant sur différents outils analytiques.

Expérimentalement, nous avons mis en œuvre :

- Une démarche de type "Ecotoxicologique" reposant sur la mesure de l'effet de l'application de différentes doses d'un cocktail de pesticides sur différents bioindicateurs microbiens et l'établissement de courbes *doses-réponses* en vue de déterminer les caractéristiques de danger du cocktail. *Cette approche, qui n'avait pas été envisagée dans le projet initial, nous est apparue importante suite aux expérimentations 2008.*

- Une démarche de type "pre-homologation" à vocation réglementaire consistant à analyser dans le temps les effets de l'application d'une dose agronomique d'un cocktail de pesticides sur des échantillons de sol traités et incubés dans des microcosmes en conditions contrôlées de laboratoire. Dans un but prospectif, ces bioindicateurs microbiens ont été pris à différents stades de la chaîne « Recherche - Développement » et ont été sélectionnés pour représenter différents niveaux d'organisation biologique. Un ensemble de sols « représentatifs » des sols français ont été utilisés pour cette étude dont l'objectif était de développer des essais biologiques utilisables dans le cadre d'une procédure d'homologation. Accessoirement, ces indicateurs ont

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

également été utilisés pour comparer différentes pratiques d'entretien des sols en viticulture (voir en B.2.2. ci-après)

- En parallèle, sur un dispositif expérimental de plein champ (Montagne Saint Emilion) cultivé en vignes et comparant différentes pratiques d'entretien des sols (enherbement, désherbage mécanique ou chimique), nous avons suivi différents bioindicateurs microbiens après application du même cocktail de pesticides que celui utilisé au laboratoire. Pour des raisons évidentes d'opérationnalité, les indicateurs sélectionnés sont déjà en cours d'utilisation par les laboratoires d'analyse (référence) soit en cours de développement. Dans ce dernier cas, nous avons opté pour une approche analytique dite intégrée car nous permettant de réaliser l'ensemble des essais sur un échantillon unique. Il s'agit d'une étude telle qu'elle pourrait être pratiquée pour les besoins d'une surveillance en conditions naturelles en situation de **post-homologation**

B.2. Les dispositifs expérimentaux

B.2.1. Etudes de laboratoire

Pour ce qui concerne les études réalisées au laboratoire, approches écotoxicologique et pre-homologation, nous avons mis en place une expérimentation dans laquelle plusieurs sols agricoles, choisis pour être représentatif des sols Français, ont été traités avec un cocktail de pesticides représentatifs des traitements appliqués sur un domaine viticole.

Quatre sols ont été utilisés : (i) Montagne de St Emilion avec trois modalités : enherbement, désherbage chimique et désherbage mécanique (contexte viticole, site expérimental de la chambre d'agriculture, 33), (ii) Epoisses (contexte grandes cultures, domaine expérimental de l'INRA de Dijon, 21), (iii) Martincourt (contexte grandes cultures, site expérimental de l'INRA de Nancy, 54), (iv) Pau (contexte grandes cultures). Les propriétés physicochimiques de ces sols sont présentées dans le tableau de l'annexe 1.

L'expérience a été mise en place à l'INRA de Dijon selon le mode opératoire décrit succinctement dans la figure 1. Chaque partenaire a prélevé et adressé le sol tamisé à 5 mm à l'INRA de Dijon. Les échantillons de sol ont été stockés dès leur réception et jusqu'à leur utilisation à 4°C selon les recommandations émises par l'ISO (ISO-DIS 10381-6, Qualité du sol — Échantillonnage — Partie 6: Lignes directrices pour la collecte, la manipulation et la conservation dans des conditions aérobies de sols destinés à une étude en laboratoire des processus, de la biomasse et de la diversité microbienne).

Pour chaque sol, des mésocosmes de sol (200 g équivalent sec, n=6) ont été préparés, placés à 80% de la capacité de rétention en eau du sol et incubés au laboratoire (20°C dans l'obscurité) pendant 4 semaines afin de stabiliser la microflore du sol et notamment, éviter le « priming effect » lié à la remobilisation du C résultant de la déstructuration du sol inhérente à sa préparation par tamisage.

Par la suite, à t0 les mésocosmes ont été traités ou non avec le cocktail de pesticides constitués de deux fongicides (fenhexamide, anti botrytis et folpel, anti mildiou) et un insecticide (deltaméthrine). Nous avons choisi d'utiliser dans cette expérimentation les produits phytosanitaires formulés, sachant par ailleurs que ces produits ne renferment pas uniquement la matière active (MA) mais aussi d'autres molécules dont les adjuvants entrant dans sa formulation. Ils ont, en outre, été appliqués à la dose agronomique préconisée par l'index phytosanitaire en considérant la réalité des traitements phytosanitaires menés dans le contexte viticole dans notre dispositif expérimental. Ainsi, à t0 les différents sols ont été traités avec un mélange constitué de

-Teldor : 750g/ha (1.5 mg MA/200g sol eq sec, fenhexamide),

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

-Decis : 7.5g/ha (1.5µg MA/200g sol, deltaméthane),

-Acryptan : 1500g/ha (3 mg MA/200g sol, folpel).

Dans le cas particulier de l'étude "doses – réponses", nous avons mené une expérimentation où le cocktail de pesticide était apporté à 0, 1, (2, 5), 10 et 20 (40) fois la dose agronomique. Pour cette expérimentation, deux sols aux propriétés contrastées ont été choisis parmi les sols analysés en 2008 : Bordeaux (Bo 1 désherbage mécanique) et Martincourt.

Dans tous les cas, des mésocosmes (contrôle et traité) ont été sacrifiés 3 et 30 jours après traitement pour les analyses biologiques.

En parallèle, suite aux analyses multi-résidus réalisées en première année indiquant une absence de résidus dès 3 jours après le traitement, une nouvelle analyse multi-résidus a été menée en seconde année sur les sols traités avec le cocktail de pesticides ajouté à différentes doses à différents temps pour évaluer la dissipation des produits phytosanitaires. Les analyses ont été réalisées par le Laboratoire Centre Atlantique, LA ROCHELLE).

B.2.2. Etude de terrain

Ce dispositif a été mis en place au printemps 2007 par la Chambre d'Agriculture de Gironde (CA 33), sur une parcelle du domaine viticole du lycée agricole de Montagne-Saint-Emilion (33). Il vise à évaluer l'influence de trois modes d'entretien des sols (enherbement, entretien mécanique et désherbage chimique), associé ou non à un apport de produits phytosanitaires, sur la composante microbienne de la qualité des sols.



Enherbement



Entretien mécanique



Désherbage chimique

Le dispositif est constitué de 3 blocs comportant chacun 6 placettes, correspondant aux 3 modalités d'entretien du sol, associées ou non à un traitement par un "cocktail" de pesticides. Chaque placette occupe 3 inter rangs, sur une longueur de 3 piquetées (soit 15 mètres au total). Chaque placette est ainsi constituée de 9 « micro placettes » (1 piquetée x 1 inter rang). Le plan du dispositif est donné en annexe 2.

Le cocktail est constitué de deux fongicides (fenhexamide, anti-botrytis et folpel, anti-mildiou) et d'un insecticide (deltaméthane). Les produits utilisés sont le Teldor 750g/ha (1.5 mg MA/200g sol eq sec, M.A. = fenhexamide), le Decis 7.5g/ha (1.5µg MA/200g sol, M.A. = deltaméthane), et l'Acryptan 1500g/ha (3 mg MA/200g sol, M.A. = folpel).

L'apport du cocktail a été réalisé à l'aide d'une rampe de désherbage (cf. photographie ci-contre).



Pour chaque placette, l'échantillon de sol a été composé à partir de 9 prélèvements (1 par « micro placette ») réalisés à la tarière manuelle sur une profondeur de 15 cm, puis mélangés, homogénéisés et tamisés à 2 mm

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

.Le tableau 0 récapitule les dates des différentes interventions au cours des 2 années d'expérimentations.

B. 3. Les outils analytiques

B. 3.1 Outils analytiques de référence

Il s'agit d'essais biologiques déjà consacrés par l'usage et ayant donné lieu à une norme, ou en instance de normalisation.

B.3.1.1. Indicateurs globaux

Il s'agit de :

- la **biomasse microbienne**, selon la norme FD ISO 14240-2 modifiée selon Chaussod (1999) pour la concentration en K₂SO₄ (0.05 N),
- les activités **FDA hydrolases**, un groupe d'enzymes faiblement spécifiques qui interviennent dans le cycle de la matière organique, selon la méthode de Schnürer et Rosswall (1982),
- la **respiration microbienne** durant 4 semaine à 28°C (exprimée en mgC-CO₂ / kg MS / 28 jours) (Catroux *et al*, 1987),
- la quantité d'**azote potentiellement minéralisable** mesurée après 4 semaines d'incubation à 28°C (exprimée en mgN-(NH₄+NO₃) / kg MS / 28 jours), (Catroux *et al*, 1987).

Ils ont été mis en œuvre par le laboratoire Celesta-lab qui a été chargé de suivre ces différents indicateurs biologiques sur le dispositif de Montagne St Emilion. A chaque prélèvement, les paramètres physico-chimiques suivants ont été mesurés : humidité à 103°C (NF ISO 11465), pH eau (NF ISO 10390), carbone organique (NF ISO 14235), azote total Kjeldhal (NF ISO 11261) et reliquats d'azote minéral (NF ISO 14256-2).

Les prélèvements de terre ont été faits le 05/03/2008 (état des lieux de la parcelle), le 16/06/2008, soit 3 jours après l'apport 2008 du mélange de pesticides au sol, le 16/07/2008, soit environ 1 mois après l'apport et le 29/05/2009, soit 3 jours après l'apport 2009 de pesticides.

B.3.1.2. Indicateurs spécifiques

B.3.1.2.1. Test de germination des spores des champignons mycorhiziens à arbuscules

Justification. Les champignons endomycorhizogènes sont des symbiotes obligatoires des plantes pouvant représenter la majorité de la biomasse fongique d'un sol. Ces champignons vivent en symbiose avec 80% des familles de plante, ainsi que la majorité des plantes cultivées, et appartiennent tous au phylum des Gloméromycètes. Ces organismes développent au cours de leur interaction avec la plante, un réseau d'hyphes extra radiculaires pouvant atteindre 15m par gramme de sol. Ce mycélium composé d'hyphes ayant un diamètre 1/60ème plus fin que les racines, peut ainsi s'immiscer dans des agrégats de sols augmentant ainsi les zones de prospection pour l'apport de nutriment pour la plante, ainsi que la stabilité du sol. Ces champignons jouent un rôle important dans la santé des plantes, améliorant leur nutrition minérale, et augmentant leur résistance vis-à-vis des stress biotique ou abiotique. Ce sont des microorganismes ubiquistes, qui peuvent aussi être affectés par la présence de polluants dans les sols (Leyval, Singh and Joner, 1995, Weissenhorn and Leyval, 1996). Pour ces raisons, ils peuvent être considérés comme des bioindicateurs de qualité des

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

sols (Gianinazzi et al, 2005). Un test de toxicité a été proposé et accepté par la commission de normalisation T95E de l'AFNOR et au niveau ISO.

Principe. Le test consiste à placer 30 spores (50 à 250 μm) d'un champignon mycorhizien *Glomus mosseae* BEG12 entre deux membranes filtrantes quadrillées qui sont maintenues par un cadre de diapositive, qui est lui-même placé entre deux couches de sol à tester dans une boîte de Pétri. Le sol est placé à 90% de la capacité de rétention en eau et est mis en incubation à 24°C pendant 14 jours. Après 14 jours, les « sandwich » de spores sont retirés délicatement des sols, placés pendant 15 minutes dans une solution de bleu trypan pour colorer les structures fongiques. Les deux membranes sont séparées, et le pourcentage de spores germées est alors estimé sous la loupe binoculaire.

Mise en œuvre. En 2008, les tests ont été réalisés sur les sols (Martincourt, Bordeaux 1, Bordeaux 2, Bordeaux 3, Epoisses et Pau) des mésocosmes mis en place à Dijon avant traitement (T0) ou 3 jours (T3) et 30 jours (T30) après traitement avec le cocktail pesticides.

En 2009, les essais "doses – réponses" ont été réalisés uniquement avec la terre de Martincourt, à 4 niveaux de traitement avec le cocktail pesticides : 0, 1x, 10x et 20x.

La quantité d'échantillon disponible (200g) n'a pas permis de suivre rigoureusement la méthode précisée dans la norme AFNOR XP X31 205-1, qui nécessite 500 g de sol, notamment en ce qui concerne le nombre de répétitions, qui a dû être limité à 4 au lieu de 6.

B.3.1.2.2. Mesure du pouvoir de colonisation racinaire par les champignons endomycorhyzoïques. Approche MPN.

Justification. Un second test biologique (test AFNOR X31-205-2), utilisant la mesure du pouvoir de colonisation racinaire d'une plante mycotrophe par les champignons endomycorhyzoïques, a été utilisé comme indicateur des effets secondaires de l'utilisation des produits phytosanitaires. Ce test (Most Probable Number, MPN) permet de quantifier le nombre de propagules dans un échantillon de sol, une propagule étant une structure biologique (spore, fragment racinaire ou mycélien) pouvant coloniser une racine et permettant ainsi le développement du champignon. Il représente donc le potentiel de mycorhization d'un sol déterminé.

Principe. Pour chaque temps 400g de sols ont été utilisés et une dilution sérielle effectuée. Le poireau a été utilisé comme plante piège, et le seuil de dilution du sol engendrant une colonisation racinaire a permis d'établir le nombre MPN (Sieverding, 1991).

Mise en œuvre. Pour les quantifications du nombre de propagules, les échantillons analysés proviennent des expériences de mésocosme mise en place à Dijon en 2008. Les échantillons analysés l'ont été à T0, soit juste après l'apport du cocktail de produit phytosanitaire, et après 30 jours d'incubation (T30). Les sols testés sont ceux de Martincourt, Pau, Bordeaux 1 (désherbage mécanique), Bordeaux 2 (enherbement) et Bordeaux 3 (désherbage chimique).

B.3.2. Nouveaux outils d'analyse

Il s'agit d'essais biologiques basés sur des approches méthodologiques nouvelles, avec pour objectif de diversifier les descripteurs du comportement microbien. En particulier, nous avons tenté de valider des mesures de diversité biochimique et taxonomique, ces dernières à un niveau global ou plus spécifique.

B.3.2.1. Indicateurs globaux

B.3.2.1.1. Détermination de la concentration en cellules microbiennes vivantes

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Justification. Les mesures de biomasse microbienne, obtenues par respiration induite par le substrat ou, plus fréquemment, par fumigation extraction (voir B.3.1.1.), ont depuis longtemps remplacé les approches plus conventionnelles basées sur le dénombrement direct des cellules microbiennes isolées sur milieux de culture auxquelles il est reproché d'être trop sélectives (de 1 à 5 % des micro-organismes sont ainsi détectés, Wilson, 1996) et consommatrices de temps. Nous lui avons préféré une technique de mesure par marquage fluorescent de l'ADN bactérien in situ (Pascaud *et al.*, 2008) qui cumule trois avantages : la technique n'est pas sélective, il est possible de cibler la fraction vivante de la communauté bactérienne et, techniquement, elle peut facilement être mise en œuvre en routine.

Principe. La méthode est basée sur un marquage de la microflore par deux intercalants de l'ADN qui génèrent de la fluorescence. L'un des intercalants, le SYTO 9 (485 nm, 528 nm) se fixe sur l'ADN des cellules mortes et vivantes tandis que le second, l'iodure de propidium (485 nm, 640 nm), se fixe uniquement sur l'ADN des cellules mortes en déplaçant le SYTO 9. Le principe consiste à enrichir une dilution appropriée d'une suspension de sol (entre 1/50 et 1/100 pour limiter l'effet de quenching du aux particules de sol) avec différentes concentrations cellulaires connues d'*E. coli*. L'ordonnée à l'origine de la droite de réponse obtenue permet de quantifier la fluorescence émise par les cellules indigènes vivantes et de calculer la concentration cellulaire correspondante par référence à la fluorescence émise par *E. coli*. Le marquage des cellules est réalisé avec un kit du commerce, le kit LIVE/DEAD BacLight Viability kit (Invitrogen), habituellement utilisé pour quantifier les proportions de cellules mortes et vivantes dans des cultures bactériennes.

Mise en œuvre. Les études ont porté uniquement sur le sol du dispositif de Montagne. Les trois approches expérimentales décrites en B.1. ont été réalisées : approche "écotoxicologiques" basée sur l'établissement des courbes "doses – réponses" (concentrations de 40X, 20X, 10X, 5X, 2,5X et 0X), approche pre-homologation et approche post-homologation.:

B.3.2.1.2. Détermination de l'activité déshydrogénase

Justification. En complément des mesures respirométriques (voir B.3.1.1.) (minéralisation du carbone ou consommation d'oxygène), déjà largement utilisées et dont il vient d'être proposé une variante technique à débit élevé (Kaufmann *et al.* 2006), le niveau de certaines enzymes pourrait aussi être un indicateur du fonctionnement et de la qualité biologique des sols (Dick, 1994). Les enzymes les plus couramment sollicitées sont celles qui sont en liaison directe avec l'oxydation de la matière organique des sols : oxydoréductases, transférases et hydrolases (voir B.3.1.1.). L'intérêt particulier des déshydrogénases tient justement au fait qu'il s'agit d'enzymes dont le fonctionnement est étroitement lié à une structure cellulaire intacte et viable (Rossel et Tarradellas, 1991), évitant ainsi toute interférence avec des enzymes existant à l'état libre dans le sol.

Principe. Le dosage est basé sur la capacité des sels de tétrazolium à servir d'accepteurs finaux d'électrons lors des processus respiratoires. Ces sels sont réduits en un composé coloré : le formazan dont la quantité, proportionnelle à l'activité respiratoire, est quantifiée par spectrophotométrie (485 nm). Le kit CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Prolifération Assay (Promega) a été utilisé. Le dosage de l'activité déshydrogénase est réalisé à partir d'une dilution appropriée d'une suspension de sol diluée en présence de milieu LB (1/10) et enrichie avec différentes concentrations cellulaires connues d'*E. coli*. Le développement de la coloration est suivi en continu avec un lecteur de microplaque pendant 16 heures toutes les demi-heures à une température de 30°C. La phase exponentielle initiale de développement de la coloration est utilisée pour calculer le temps nécessaire (t_s), appelé

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

temps critique, pour atteindre un niveau donné (y_s) de coloration en utilisant un modèle

exponentiel ($y_s = y_0 + ae^{bt_s}$). En première approche, la comparaison des t_s nous donne une mesure relative de l'activité déshydrogénase dans les différents échantillons de sol. Dans ce protocole particulier d'application, il s'agit d'une technique culture dépendante.

Mise en œuvre. Elle est identique à celle décrite pour la mesure de la concentration cellulaire bactérienne vivante.

B.3.2.1.3. Détermination de la diversité biochimique

Justification. Depuis ses premières descriptions (Garland and Mills, 1991), le système BIOLOG[®] de détermination de profils d'utilisation de substrats carbonés (ou de profils physiologiques de communautés microbiennes) a trouvé de nombreuses applications et est devenu l'une des techniques culture dépendante les plus utilisées pour caractériser la diversité physiologique des communautés microbiennes des sols et les effets de différentes pratiques culturales (Bending *et al.*, 2004; Crecchio *et al.*, 2004), notamment, l'utilisation de pesticides (el Fantroussi *et al.*, 1999; Griffiths *et al.*, 2008).

Principe. Le principe est identique à celui de l'activité déshydrogénase. Lorsqu'un substrat est utilisé comme source de carbone et d'énergie, les processus respiratoires génèrent un flux électronique qui contribuent à réduire un sel de tétrazolium en dérivé coloré. Nous avons utilisé le système des "Ecoplaques" Biolog partitionnées en trois zones identiques de 32 puits, chacun contenant un substrat carboné particulier et le sel de tétrazolium, un puits étant réservé sur chaque zone comme témoin. Les puits sont inoculés avec la dilution 10^{-4} d'une suspension de sol et l'apparition d'une coloration est mesurée au spectrophotomètre à 590 nm. Les plaques, placées à l'abri de la lumière dans une chambre à 26°C, sont lues toutes les 24 heures. Les différents profils d'utilisation des substrats ont été analysés d'abord par le calcul des indices de Shannon calculé de la manière suivante : les densités optiques de chaque puit sont transformées en coloration relative pour l'échantillon j et le substrat i ($RWCD_{ji}$):

$$RWCD_{ji} = \frac{OD_{ji}}{\sum_{i=1}^{i=31} OD_{ji}}$$

Les valeurs de $RWCD_{ji}$ ont été utilisées pour déterminer un indice de diversité synthétique H de Shannon-Weaver pour l'échantillon j :

$$H_j = -\sum_{i=1}^{i=31} RWCD_{ji} \log(RWCD_{ji})$$

Ces indices sont comparés avec une ANOVA à 2 ou 3 facteurs.

L'analyse de la distance euclidienne entre les différents échantillons a également été effectuée. Considérant l'ensemble des substrats i , la distance D_{kj} entre deux échantillons j et k est:

$$D_{kj} = \sqrt{\sum_{i=1}^{i=31} (OD_{ik} - OD_{ij})^2}$$

Mise en œuvre. Elle est identique à celle décrite pour la mesure de la concentration cellulaire bactérienne vivante.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Remarque. Ces 3 indicateurs en: **concentration cellulaire bactérienne vivante** (taille) faisant appel à une technique fluorométrique, **activité déshydrogénase** (fonction) et **diversité biochimique** (diversité) faisant toutes deux appel à une technique colorimétrique sont actuellement cours de développement. Ils ont été mis en oeuvre dans le cadre d'une **approche analytique** dite « **intégrée** » (Pascaud et al. soumis) car permettant de réaliser l'ensemble des mesures sur un seul et même échantillon.

B.3.2.1.3. Détermination de la **diversité spécifique**

Justification. L'essor récent des techniques dites "non culturales" basées sur une analyse de l'ADN extrait du sol, ARDRA (*Amplified RDNA Restriction Analysis*) (Moyer et al. 1994), DGGE (*Denaturing Gel Gradient Analysis*) (Muyzer et al. 1993), T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Avaniss-Aghajani et al. 1994) a largement contribué à un renouveau technique indéniable dans l'analyse de la diversité microbienne. Les inconvénients majeurs de ces techniques sont leur coût et la difficulté de les réaliser en routine, même si le passage de certaines d'entre elles sur séquenceur est un pas décisif dans cette voie. Dans ce contexte technique, en parallèle avec une technique qui a déjà fait ses preuves, la T-RFLP, nous avons pris le parti de développer une technique de comparaison de diversité spécifique basée sur une technique d'hybridation soustractive

Principe de l'approche par **T-RFLP** des gènes codant pour les ARNr 16S : l'ADN extrait (kit MoBio) de chaque triplicat a été amplifié par les amorces universelles 27F et 1489R (Lane, 1991) marquées par les fluorochromes Fam et Hex respectivement. Après digestion par l'enzyme de restriction *HaeIII* les produits de digestions ont été séparés par électrophorèse capillaire sur un séquenceur Applied Biosystems 3700. Les fragments terminaux de restriction obtenus pour chaque triplicat sont ensuite analysés dans le logiciel T-Align (Smith et al., 2005) afin de générer un profil consensus pour chaque échantillon. Le jeu de données résultant de l'analyse de l'ensemble des échantillons a finalement été traité par une analyse en composantes principales dans le logiciel Primer6.

Principe de la **technique soustractive**. Le principe de cette technique repose sur les propriétés d'appariement de l'ADNr 16S simple brin issu d'un échantillon de sol inconnu et d'un échantillon de référence de composition spécifique connue. Il s'agit donc de quantifier globalement une similitude de composition en espèces. Nous avons opéré de la façon suivante. L'ADNr 16S de l'échantillon inconnu est biotynilé par amplification avec une amorce 65 F-biotine. L'ADN des référence est amplifié avec le même couple d'amorces non biotynilées. Après fixation sur billes magnétiques, l'ADN inconnu est dénaturé à la soude. Les billes porteuses d'ADN simple brin sont mises en contact avec de l'ADN de référence en excès (rapport de 1 à 5) également dénaturé. Après hybridation, les billes magnétiques sont séparées puis lavées. La suspension est ensuite diluée, traitée avec un intercalant fluorogène (SYTO9) puis soumise à une mesure de fluorescence dont l'émission est proportionnelle à la quantité d'ADN double formée après hybridation. *En fait, les résultats prometteurs obtenus en première année n'ont pu être confirmés en seconde année en raison d'un manque de reproductibilité des résultats, probablement dû à un comportement colloïdal des billes magnétiques.*

Ce travail a été réorienté selon deux directions. Restant sur la même démarche, nous avons changé de support des brins d'ADN biotynilés. Nous testons actuellement les plaques de microtitration greffées streptavidine. Par ailleurs, nous avons également envisagé d'aborder le problème en utilisant une technique plus conventionnelle de biologie moléculaire, la SSCP. Ce choix se justifie par la présence d'une compétence locale ainsi que par la possibilité d'aborder le problème de façon compartative, nos collègues de Pau réalisant la même étude sur les mêmes échantillons par T-RFLP. Les résultats de ce travail en cours ne

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

sont pas actuellement disponibles. Ils seront fournis sous forme d'addendum et présentés lors de la réunion du 1er décembre.

Mise en oeuvre. Pour l'étude par T-RFLP, l'analyse a porté sur l'ADN extrait des sols de Pau, Martincourt, Epoisses et Bordeaux 1, 2 et 3 incubés en mésocosmes, prélevés avant traitement puis 3 et 30 jours après traitement. Pour l'étude par SSCP, elle portera sur les mêmes échantillons que ceux décrits pour la mesure de la concentration cellulaire bactérienne vivante. Les ADN correspondants ont été extraits par le laboratoire de Dijon (INRA MSE). Les analyses correspondantes seront réalisées courant novembre.

B.3.2.2. Indicateurs spécifiques

B.3.2.2.1. Mesure du pouvoir de colonisation racinaire par les champignons endomycorhizogènes. Approche moléculaire

Justification. (Voir B.3.1.2.2.)

Principe de l'étude du **polymorphisme de séquence** de la grande sous unité ribosomique pour évaluer et quantifier les champignons endomycorhizogènes endogènes aux sols testés. En raison de la quantité de champignons endomycorhizogènes présente dans ces sols, une série d'amplifications nichées/en gigogne a dû être entreprise. Une première amplification a été réalisée avec les amorces universelles LR1 et NDL22, ciblant l'extrémité 5' de la grande sous unité ribosomique. Le produit de cette amplification a ensuite servi pour une amplification avec l'amorce LR1 et une amorce nichée FLR2, ciblant les champignons. Ce produit a ensuite servi comme ADN cible pour une amplification ciblant : les Gloméromycètes (amorces FLR3-FL4) ; l'espèce *Glomus mosseae* (5.25-FLR4) ; les espèces *G. claroideum* et *etunicatum* (FLR3-Getunsp2) ainsi que deux ribotypes mis en évidence au cours de l'analyse : Gsp4 (Gsp4-2- FLR3) et Gsp5 (Gsp5-2-FLR3). Pour chaque amplification nichée, le produit d'amplification obtenu au préalable a été dilué 10x.

Principe de l'**analyse phylogénétique**. Après amplification avec les amorces FLR3-FLR4, les produits d'amplification obtenus ont été clonés dans le vecteur pCR2.1 TOPO (Invitrogen). Pour chaque sol, environ 30 clones ont été séquencés. Les séquences (environ 350 bp) ont été alignées avec le programme ClustalW, puis l'alignement optimisé manuellement. L'analyse phylogénétique par neighbour-joining a été effectuée, en ignorant les positions manquantes. La robustesse des branches a été testée par l'approche des bootstraps avec 1000 répétitions. Des amorces taxons spécifiques pour les espèces Gsp4 et Gsp5, ont été créés manuellement, et testés au préalable *in silico* au moyen du logiciel Amplify 3x (<http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>).

Principe de l'**analyse quantitative** de certaines espèces de champignons endomycorhizogènes endogènes présents dans les sols testés. Nous avons quantifié par qPCR l'ensemble des Gloméromycètes avec les amorces FLR3 et FLR4, et aussi plus spécifiquement deux taxa, à savoir *Glomus mosseae* (5.25-FLR4) et le groupe *G. claroideum/etunicatum* (Getunsp2-FLR3).

Mise en oeuvre. Pour les analyses du polymorphisme de séquence de la grande sous unité ribosomique. Les ADN du sol ont été extraits par le partenaire MSE (Dijon). Les ADN extraits proviennent des expériences de mésocosmes de 2008 et 2009 sur les sols de Bordeaux 1 et 2, et de Martincourt. Pour l'analyse phylogénétique, les ADN extraits des mésocosmes 2008 à partir des sols de Bordeaux 1 et 2 ainsi que ceux de Martincourt à T0, ont été utilisés. L'analyse quantitative par qPCR a été effectuée sur le sol de Martincourt

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

conservé en mésocosmes (2008) et sur le sol de Bordeaux pour l'étude "doses – réponses" (2009)

B.3.2.2.2. Mesure de la structure et de l'abondance de la communauté microbienne intervenant dans la dégradation du protocatechuate

Justification. La voie des β -cétoadipates responsable de la dégradation des composés phénoliques naturels (lignine,...) ou xénobiotiques (2,4-D,...) comporte un intermédiaire métabolique, le protocatechuate (Harwood et Parales, 1996), dont le cycle phénolique est ouvert par la 3,4-protocatechuate dioxygénase (gènes *pcaH*). Ces gènes sont dispersés au sein de la microflore où ils présentent un important polymorphisme de séquences. Toutefois, étant soumis à des transferts horizontaux, la valeur taxonomique de la phylogénie relative à ces gènes demeure faible étant donné qu'il n'existe pas une bonne congruence avec la phylogénie basée sur l'étude de l'ADNr 16S. Ils codent toutefois pour des enzymes appartenant à la famille des dioxygénases catalysant l'ouverture de cycles phénoliques et ils sont ainsi potentiellement de bons marqueurs fonctionnels du cycle du C dans le sol.

Principe de la détermination de la structure de la communauté *pca*. Elle a été évaluée par PCR-RFLP du gène *pcaH* (El Azhari *et al.* 2007) et l'abondance de la communauté par PCR quantitative de ce même gène (El Azhari *et al.* 2008). L'analyse de la structure de la communauté microbienne *pcaH* a été conduite à partir d'empreintes ADN ciblant le gène *pcaH* qui ont été digitalisées et analysées à l'aide de la suite de logiciel ADE-4 (Thioulouse *et al.*, XX). Cette analyse permet de représenter dans des plans issus d'une analyse en composantes principales (ACP) la variance des empreintes *pcaH*-PCR-RFLP générées pour chaque sol après différents temps d'incubation.

Principe de l'analyse de l'abondance de la communauté *pcaH*. Elle a été conduite par PCR quantitative selon la procédure décrite récemment par El Azhari *et al.* (2008). Brièvement, des amorces oligonucléotidiques dégénérées sont utilisées pour amplifier par PCR quantitative l'ADN extrait des différents sols. L'abondance relative de la communauté *pcaH* est exprimée par rapport à l'abondance de la communauté globale estimée par PCR quantitative ciblant une séquence de l'ADNr 16S de l'opéron ribosomique bactérien.

Mise en œuvre. Ces analyses ont été réalisées sur les différents ADN extrait des sols de Pau, Martincourt, Epoisses et Bordeaux 1, 2 et 3 incubés en mésocosmes, prélevés avant traitement puis 3 et 30 jours après l'ajout du cocktail de pesticides (approche pre-homologation), sur les sols des parcelles expérimentales de Montagne prélevés 3 jours et 30 jours après traitement (approche post-homologation) ainsi que dans le cadre de l'étude des courbes "doses – réponses" (concentrations 20X, 10X, 1X et 0X) sur les sols de Bordeaux et Martincourt.

B.3.2.2.3. Mesure de l'activité et de l'abondance de la communauté microbienne nitrifiante

Justification. La nitrification réalisée par la microflore bactérienne qui transforme l'ammonium en nitrate est une étape clef du cycle de l'azote. La nitrification est réalisée selon deux étapes successives : (i) l'oxydation de l'ammonium en nitrite et (ii) l'oxydation du nitrite en nitrate. Ces deux étapes sont catalysées par l'ammonium monooxygénase (*amoA*) et la nitrite oxydo-reductase (*Nor*), respectivement. Il est communément admis que la première étape au cours de laquelle l'ammonium est transformé en nitrite est l'étape limitante de la nitrification (Philipps *et al.* 2000). C'est la raison pour laquelle un effort important de la communauté scientifique s'est porté sur l'étude des bactéries oxydant l'ammonium qui appartiennent à deux grands groupes phylogénétiques, l'un au sein des γ -protéobactéries et l'autre au sein des β -protéobactéries. Ces travaux ont permis le

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

développement d'outils moléculaires et biochimique permettant d'évaluer la structure, la densité et l'activité des communautés microbiennes nitrifiantes (Kowalchuck et Stephen 2001).

Principe. L'activité potentielle de la communauté nitrifiante a été évaluée par une mesure enzymatique selon la méthode décrite par Lensi *et al.* (1986). Globalement, on mesure la vitesse de formation de N₂O en phase anaérobie et en présence d'un mélange He-C₂H₂ (inhibiteur de la N₂O réductase) après apport exogène de nitrates et soustraction des nitrates initialement présent dans le sol. L'abondance de cette communauté a été mesurée par PCR quantitative ciblée sur le gène *amoA* selon la procédure décrite par Okano *et al.* (2004). Brièvement, des amorces oligonucléotidiques dégénérées sont utilisées pour amplifier le gène *amoA* des bactéries (AOB) et le gène *amoA* des Crenarchaeobactéries par PCR quantitative de l'ADN extrait des différents sols. L'abondance relative de la communauté *amoA* bactérienne et des Crenarchaeobactéries est exprimée par rapport à l'abondance estimée par PCR quantitative de la communauté globale bactérienne et de la communauté crenarchae, respectivement.

Mise en œuvre. Ces analyses ont été réalisées sur les sols, et les ADN extrait des sols, de Pau, Martincourt, Epoisses et Bordeaux 1, 2 et 3 des sols incubés en mésocosmes, prélevés avant traitement puis 3 et 30 jours après l'ajout du cocktail de pesticides (étude pre-homologation).

B.3.2.2.4. Mesure de l'abondance des communautés microbiennes impliquées dans la dégradation de composés xénobiotiques

Justification. Comme l'ont montré de nombreux auteurs, il est avéré que différents types bactériens présents dans les sols possèdent des capacités métaboliques vis-à-vis de nombreux pesticides. Ces activités microbiennes conduisent, à minima, à la transformation du xénobiotique mais aussi, parfois, à sa dégradation complète; C'est le cas de l'atrazine (de Souza *et al.*, 1995; Topp *et al.*, 2000), du diuron (Cullington and Walker, 1999), du 2,4-D (Streber *et al.*, 1987) etc... Ces capacités de transformations acquises par les microorganismes dans les sols peuvent également être affectées par l'application d'autres produits phytosanitaires si ceux-ci ont un effet délétère sur les populations qui possèdent cette fonction, ou au contraire s'ils participent à leur stimulation. Evaluer la dynamique des communautés microbiennes qui en sont porteuses est donc un point à prospecter puisqu'il peut permettre de juger de l'impact du traitement sur le potentiel génétique d'épuration présent dans le sol et relatif à divers xénobiotiques. Il s'agit donc de savoir si ces populations peuvent être stimulées par les traitements ou si au contraire elles sont partiellement éliminées ou insensibles. La réponse à cette question pourrait être apportée par la détermination du nombre de copies de gènes impliqués dans la dégradation des pesticides modèles par PCR en temps réel. En préambule, leur présence sera recherchée par PCR classique dans les communautés édaphiques.

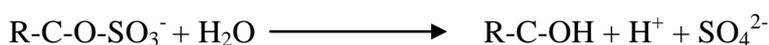
Principe. Le travail engagé dans le cadre de ce contrat a consisté en une étude prospective des possibilités de détection par PCR classique d'un certain nombre de gènes intervenant dans la dégradation de composés naturels et xénobiotiques. Différents couples d'amorces ont été testés (Tableau 1). Pour chaque gène deux amplifications successives ont été réalisées. Lorsque nous possédions suffisamment d'information sur le gène cible nous avons pu utiliser deux couples d'amorces pour réaliser une PCR gigogne. Dans ce cas, le deuxième couple est alors interne au premier produit d'amplification (cas des gènes *AtzA*, *AtzB* et *ndoB*). Dans le cas où nous ne possédions qu'une information limitée nous avons utilisé le même couple d'amorces dans deux PCR consécutives. Dans tous les cas, les produits obtenus après amplification ont été séquencés afin de confirmer la pertinence des amorces utilisées.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Mise en œuvre. Cette étude a été réalisée uniquement sur les trois sols de Bordeaux conservés en mésocosmes avant traitement puis 3 et 30 jours après traitement.

B.3.2.2.4. Mesure de l'abondance et de l'activité des communautés microbiennes impliquées dans la minéralisation du soufre organique

Justification. Dans la majorité des sols agricoles aérobies, le soufre minéral, présent sous forme de sulfate assimilables par les plantes, représente moins de 10 % du soufre total (Bettany et Steward, 1983). En général, le soufre organique représente plus de 95 % du soufre total des sols dans la plupart des régions tempérées (Tabatabai, 1984). L'activité microbienne de minéralisation qui permet de transformer ce soufre organique en sulfates requiert la synthèse d'enzymes appartenant à la famille des sulfatases (E.C. 3.1.6.). Les sulfatases sont susceptibles de catalyser l'hydrolyse d'une large gamme d'esters de sulfate qui peuvent être aromatiques ou aliphatiques (Kertesz, 1999). Un grand nombre de sulfatases sont définies sous le nom générique d'arylsulfatases (E.C. 3.1.6.1.) car elles sont susceptibles d'hydrolyser de petits substrats aromatiques synthétiques tel que le p-nitrophényl sulfate ou le nitrocatéchol sulfate. Cette activité arylsulfatase (ARS), largement représentée dans les sols, a ainsi été identifiée chez différents microorganismes, qu'il s'agisse d'espèces bactériennes (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) ou fongiques (*Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*). Elle catalyse l'hydrolyse des esters de sulfate minéral en clivant la liaison O-S.



L'activité ARS est couramment utilisée comme indicateur de la qualité des sols (Bandick et Dick, 1999 ; Ndiaye *et al.* 2000 ; De la Paz Jimenez *et al.* 2002). Par définition, un indicateur de la qualité agricole des sols doit intégrer les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol, et être impliqué dans des processus importants. L'activité ARS répond entièrement à ces divers critères et représente donc un indicateur de choix concernant le turnover du soufre dans les sols.

Principe de la Détermination de la **taille** de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable. Pour chaque sol et pour chaque traitement, la taille de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable a été estimée par étalement d'une suspension de sol sur un milieu de culture semi sélectif : le milieu M9-Xsulf, où la seule source de soufre est un ester de sulfate lié à un chromogène (Cregut *et al.* 2009). Après 21 jours d'incubation, le nombre de bactéries possédant l'activité ARS est exprimé en log CFU g⁻¹ de sol sec.

Principe de la détermination de l'**activité arylsulfatase** potentielle. L'activité arylsulfatase totale potentielle (extracellulaire et intracellulaire) est déterminée d'après la méthode de Tabatabai et Bremner (1970). L'activité arylsulfatase est exprimée en mg p-nitrophénol kg⁻¹sol h⁻¹.

Définition d'amorces ciblant le gène codant l'Arylsulfatase. Deux couples d'amorces ont été utilisés afin de détecter la communauté fonctionnelle bactérienne possédant l'activité ARS dans les différents sols et ainsi voir l'impact du mélange de produits phytosanitaires sur la structure de cette communauté:

- le premier couple atsAr/atsAf dessinés à partir d'alignements de gènes codant l'ARS chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Klebsiella pneumoniae* et *Mycobacter sp.*
- le second couple atsAr/atsA175f où l'amorce interne a été dessinée à partir d'alignements de séquences codantes chez des isolats du sol possédant l'activité ARS.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Mise en œuvre. Les travaux menés ont été réalisés sur les sols de Pau, Martincourt, Epoisses et Bordeaux 1, 2 et 3 conservés en mésocosmes et prélevés avant traitement avec le cocktail de pesticides puis 3 jours et 30 jours après ce traitement (étude pre-homologation). Une étude "Doses – réponses" a également été réalisée en 2009 sur les sols de Bordeaux 1 et Martincourt.

C. Résultats obtenus et discussion

C.1. Analyses chimiques

En 2008, des analyses multi résidus (Laboratoire Centre Atlantique, LA ROCHELLE) ont été réalisées sur les sols traités avec le cocktail de pesticides à différents temps : (i) t0 pour estimer les quantités résiduelles de pesticides liées à l'activité agricole et (ii) à t30 pour évaluer la dissipation des produits phytosanitaires appliqués sur les sols. Les résultats sont présentés ci-dessous dans le tableau 2.

Les analyses conduites sur les sols à T0 (i.e. avant l'apport du cocktail de produits phytosanitaires) montrent que seul le Folpel est détecté de manière systématique à des concentrations allant de 0,05 à 0,21 mg.kg⁻¹. Ce reliquat résulte très probablement du traitement des cultures mises en place sur les parcelles agricoles où ont été prélevés les sols.

Les analyses multi résidus conduites 30 jours après l'apport du cocktail de pesticides montrent que quel que soit le sol considéré, aucun des trois produits phytosanitaires entrant dans la composition du cocktail de pesticides n'a pu être détecté. Une première analyse de ces résultats suggère que les pesticides apportés (teldor 7,5 mg MA.kg⁻¹, decis 0,0075 mg MA.kg⁻¹ et acryptan 15 mg MA.kg⁻¹) ont été dissipés sur la période de l'incubation des sols. Toutefois, la limite de détection des pesticides recherchés étant de 0,01 mg.kg⁻¹, nous ne pouvons pas exclure la présence de pesticides rémanents à faibles concentrations. De plus, l'analyse multi résidus nous permet uniquement de quantifier la molécule mère mais ne permet pas de détecter les métabolites qui pourraient être formés dans le sol. Enfin, la dissipation de la matière active ne renseigne pas sur les processus impliqués : adsorption sur les composantes du sol et/ou dégradation abiotique/biotique. Il est à noter que le seuil de détection de l'analyse multi résidus ne permet pas à ce jour de détecter les produits phytosanitaires à faible dosage (Decis 0,0075 mg MA.kg⁻¹) même lorsque la dose maximale annuelle autorisée est appliquée sur le sol. Cette observation pose la question de la détection de ces nouveaux produits dans l'environnement.

De manière surprenante, le folpel, initialement détecté dans tous les sols à T0, n'est plus détecté dans aucun des sols testés. Cette observation peut certainement être expliquée par le fait que les sols utilisés dans cette expérimentation ont été prélevés des parcelles agricoles à la sortie de l'hiver, période au cours de laquelle la microflore du sol est particulièrement peu active. Ainsi, la préparation, le reconditionnement et l'incubation du sol dans des conditions (80% de la capacité de rétention en eau du sol, 20°C) propices à l'activité microbienne favoriseraient la dissipation de ce produit phytosanitaire.

Sur la base de ces analyses multi résidus, une nouvelle expérimentation a été conduite en 2009. Une analyse multi résidus (toujours réalisée par le Laboratoire Centre Atlantique, LA ROCHELLE) a été menée sur les sols de Bordeaux 1 (désherbage mécanique) et Martincourt traités avec le cocktail de pesticides ajouté à différentes doses à différents temps pour évaluer la dissipation des produits phytosanitaires appliqués sur les sols. Les résultats sont présentés ci-dessous dans la figure 2.

Les trois pesticides apportés sur les sols de Martincourt et de Bordeaux sont très rapidement dissipés. Ainsi après seulement trois jours d'incubation seulement de 1 à 3% du fenhexamide

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

initialement apporté peuvent être dosés dans le sol de Bordeaux et de Martincourt, respectivement. Pour ce qui concerne le folpel, seulement 3 à 6% de la quantité initialement apportée peut-être dosée après d'incubation. A noter que la dissipation du folpel suit des cinétiques différentes selon le sol considéré, étant plus rapide dans le sol de Martincourt que dans le sol de Bordeaux. En revanche, la cinétique de dissipation de la deltaméthrine suit des cinétiques plus lentes puisqu'il faut attendre 12 jours d'incubation pour atteindre une dissipation d'environ 70% du produit apporté initialement. A noter qu'à la dose agronomique, dès 12 jours aucun des trois pesticides apportés n'a pu être détecté.

Ces résultats sont en accord avec les Koc de ces produits [folpel 7000 à 20000 (=élevé) en outre *volatile* ; deltaméthrine > 460 000 (=très élevé) ; fenhexamide de l'ordre de 800/900 (=moyen)] et ils suggèrent que la dissipation de ces produits est essentiellement d'ordre physicochimique. Toutefois, pour ce qui concerne la deltaméthrine, les résultats du dosage multi résidu restent inattendus étant donné que le Koc très élevé de cette molécule laissait présager une très forte adsorption sur les composés du sol. Les courbes de dissipation des pesticides ne nous renseignent pas sur l'existence éventuelle de métabolites.

C.2. Analyses biologiques

C.2.1. Etude "Doses – réponses"

- Test de **germination des spores** des champignons mycorhiziens à arbuscules

Les résultats montrent un pourcentage de germination élevé des spores dans le sol témoin et dans le sol de Martincourt sans apport de pesticides (figure 3). Une tendance à la diminution de la germination avec l'augmentation de la dose de pesticides est observée, et une plus grande variabilité à la dose 20x, mais cet effet est faible et le pourcentage de germination reste élevé.

Cette absence d'effet des pesticides pourrait être liée aux composés utilisés, voire à la dose employée. Toutefois, on peut trouver dans la littérature des résultats différents quant à l'effet de pesticides sur les champignons MA. Ainsi, l'ajout de deux fongicides, dont le fenhexamide inhibait la germination des spores de *Glomus intraradices*, et cette inhibition augmentait avec la concentration des fongicides (Zocco *et al.* 2008). Schweiger et Jakobsen (1998) ont montré qu'en fonction des doses et des fongicides utilisés, leur effet sur le transport de phosphore par les hyphes mycorhiziennes, qui reflète leur vitalité, était plus ou moins affecté. En utilisant des racines de carottes transformées et mycorhizées, Campagnac *et al.* (2008) ont montré que le taux de colonisation des racines par *Glomus intraradices* n'était pas affecté par l'application de fenhexamide. En revanche, l'apport d'autres fongicides, tels que le triadimefon et le pyrazophos, semblait favoriser la formation de mycorhizes (Von Alten *et al.* 1993). Ainsi, il semble que l'effet des pesticides sur les champignons mycorhiziens et sur la colonisation mycorhizienne varie avec les pesticides employés et les plantes associées (Abd-Alla *et al.* 2000). Il faut toutefois souligner que la plupart de ces travaux ont été réalisés au laboratoire et ne sont pas des mesures *in situ*.

En conclusion, le cocktail de pesticides apporté à cette dose ne montre pas d'effet significatif sur la germination des spores de champignons mycorhiziens à arbuscules, mais seulement une tendance à la diminution. Cet essai ne renseigne que sur la première étape de la mycorhization, la germination des spores, qui doit conduire à la colonisation racinaire. Il faudrait donc suivre en complément la colonisation racinaire.

- Analyse de la **diversité métabolique**

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

LES RESULTATS CONCERNANT L'EVOLUTION DE LA DIVERSITE METABOLIQUE EN FONCTION DE LA DOSE DE TRAITEMENT DU SOL SONT INDIQUES DANS LA FIGURE 4

Les ANOVA à deux facteurs réalisées sur les indices de Shannon obtenus montrent que deux jours après la mise en contact du sol avec les différentes doses de pesticides, on n'observe pas de différence significative entre les différents traitements ($P=0,751$). Néanmoins, le calcul de l'indice de distance généralisée indique une différence significative entre traitements ($P<0.001$). La procédure de comparaisons multiples de Holm-Sidak montre qu'il y a une différence significative entre les échantillons non traités et traités à la dose 2,5X et les échantillons traités à une dose plus élevée.

- Détermination de la **densité cellulaire des bactéries vivantes**

La détermination de la densité cellulaire des bactéries vivantes (figure 5) ne révèle aucun effet statistiquement significatif du cocktail de pesticides sur la viabilité des cellules ($P=0,390$).

- Mesure de l'**activité déshydrogénase**

Concernant l'**activité déshydrogénase**, la tendance à une diminution des temps critiques, associés à une activité déshydrogénase plus élevée, variant de 446 h pour le témoin non traité à 377 h pour le traitement 40X n'a pas de signification statistique ($P=0.221$).

Ainsi, à l'exception de la caractérisation de la diversité fonctionnelle qui semblerait indiquer un effet significatif du cocktail pesticides qui se stabiliserait au delà de la dose 2.5X, aucun autre bioindicateur de niveau global n'est en mesure de confirmer ces effets. Ce résultat pourrait s'expliquer par les caractéristiques physico-chimiques des produits utilisés. En effet, on constate que les Koc du Folpel et de la Deltaméthrine sont extrêmement élevés, ce qui tend à limiter les accessibilités donc leurs effets biologiques. Par ailleurs, le Folpel est un produit volatil. Les courbes de dissipation rapportées par ailleurs tendent à conforter cette conclusion.

- Analyse par PCR quantitative de la **quantité de Glomérormycètes**

L'analyse par PCR quantitative de la quantité de Glomérormycètes et de *G. mosseae* a permis d'observer une diminution de l'ensemble des Glomérormycètes 3 jours après l'apport de la dose 20x, mais cet effet n'est pas confirmé après 30 jours, en raison de la grande variabilité expérimentale (figure 6). A l'exception de ce point, nous n'observons pas de différence statistiquement significative par l'apport du cocktail de produits phytosanitaires sur les Glomérormycètes. Pour *G. mosseae*, nous n'avons pas non plus observé d'effet statistiquement significatif.

La très faible teneur en champignons mycorrhizogènes présents dans les sols de Bordeaux a nécessité d'effectuer plusieurs préamplifications, avant de pouvoir détecter ces champignons. Il est fort probable que ces amplifications multiples ont réduit les éventuelles différences entre les différents traitements, masquant ainsi un effet éventuel de ces produits sur cette microflore. Ceci pourrait expliquer que l'effet négatif sur la population des Glomérormycètes, observé sur le sol de Martincourt en 2008, n'a pas été confirmé sur les sols de Bordeaux en 2009. Les sols testés étant pauvres en Glomérormycètes, un impact éventuel lié à l'apport de pesticides est techniquement difficile à mettre en évidence. D'autre part, la rapide dissipation ou l'adsorption des pesticides sur les sols, ne les rendant ainsi plus directement biodisponibles, pourraient aussi être une des causes de cette absence d'effet significatif sur cette communauté de champignons.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

- **Analyse de l'abondance de la communauté *pca***

L'impact du traitement des sols de Bordeaux et de Martincourt par le cocktail de pesticides sur l'abondance de la communauté *pca* a été évalué par PCR quantitative (El Azhari et al. 2008). Les résultats de ces analyses sont présentés figure 7.

Trois jours après l'apport du cocktail l'abondance spécifique de la communauté *pcaH* dans le sol de bordeaux diminue en fonction de la dose apportée ($P < 0.05$). Cet effet marqué à T3 n'est plus observé à T30. De plus, pour le sol de Martincourt, l'abondance spécifique de la communauté *pca* ne semble pas affectée par le cocktail de pesticides. Des expérimentations sont en cours pour évaluer l'impact de l'apport du cocktail à différentes doses sur la structure de la communauté *pca* afin de confirmer ces premiers résultats.

*Pour conclure, une courbe dose-réponse a été établie pour ce qui concerne l'abondance spécifique de la communauté *pcaH* mais seulement pour un des deux sols. On notera que la réponse de ce marqueur semble peu sensible étant donné qu'il réagit aux doses les plus importantes ($\times 10$ et $\times 20$). Les résultats attendus sur la structure de la communauté *pcaH* pourraient utilement compléter ce jeu de données. En tout état de cause, il semblerait que la sensibilité de ce marqueur soit sol dépendant et qu'il semble être plus adapté aux sols légers déjà bien anthropisés.*

- **Taille de la communauté bactérienne cultivable fonctionnelle associée à l'activité ARS**

Nous notons, un effet significatif «dose de pesticides» sur la taille de la communauté bactérienne fonctionnelle, pour les sols de Martincourt et de Bordeaux, mais l'impact du mélange semble inverse (Figure 8).

En effet, concernant le sol de Martincourt, l'apport croissant du mélange semble, après 3 jours d'incubation, stimuler de manière significative la taille de la communauté bactérienne fonctionnelle. Nous observons ainsi une différence significative de la taille entre les faibles doses (0 et 1X) et les doses les plus fortes (10 et 20X). Deux hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer cette stimulation de la taille de la communauté bactérienne fonctionnelle. D'une part, elle pourrait résulter de l'utilisation des produits phytosanitaires comme source de carbone et/ou d'énergie. D'autre part, ce sol agricole est connu pour contenir de nombreuses espèces fongiques. En effet, nous avons identifié dans ce sol, à partir d'une étude taxonomique par une approche de type PCR-RFLP, plusieurs genres d'Ascomycètes tels *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Trichoderma sp.* possédant l'activité ARS. Or, le mélange des trois produits phytosanitaires apportés contient deux fongicides. Ainsi, même si nous nous intéressons ici qu'à une partie de la communauté bactérienne totale, il est possible de penser qu'à fortes doses, ce mélange a une action biocide sur la communauté fongique aboutissant d'une part à fournir des substrats carbonés aux bactéries, dont les fonctionnelles, mais aussi un espace libre plus favorable à leur développement.

Concernant le sol de Bordeaux, nous notons une diminution significative de la taille de la communauté bactérienne fonctionnelle dès la dose 1X. Il semble donc, que dans ce sol, l'apport du mélange de produits phytosanitaires conduise à une diminution de la taille de la communauté bactérienne respectivement de log CFU 6,39 à log CFU 6,14).

Ainsi, la taille de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable ne demeure pas stable suivant la dose de produits phytosanitaires mais semble répondre à l'apport de produits phytosanitaires, de manière différente selon de type de sol.

- **Détermination de l'activité arylsulfatase**

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Toutes doses confondues, nous observons une activité ARS significativement supérieure dans le sol de Martincourt (respectivement à 3 et 30 jours, 32,3 et 33,4 μg de P-nitrophénol sulfate/g sol sec/h) par rapport à celui de Bordeaux (respectivement à 3 et 30 jours, 17,7 et 18,3 μg de P-nitrophénol sulfate/g sol sec/h) (Figure 9). Ces résultats sont conformes à ceux obtenus lors de la première expérimentation en 2008 et pourraient être liés au fait que le sol de Martincourt est un sol agricole se caractérisant par des valeurs de pH basiques, un taux en S et C organiques élevés et des teneurs en argile également importantes ; ces caractéristiques physico-chimiques ayant été montrées corrélées à des valeurs élevées d'activité ARS.

Concernant chaque sol, nous ne notons aucun effet de l'apport du mélange de produits phytosanitaires et ceci quelle soit la dose apportée et aussi bien après 3 jours d'incubation (Figure 10) qu'après 30 jours (Figure 11).

Ainsi, l'activité ARS demeure stable et aucun « effet dose » des produits phytosanitaires apportés n'est noté, quelle que soit la dose apportée. Seul l'effet « type de sol » est significatif avec une activité la plus élevée dans le cas du sol de Martincourt et plus faible dans le cas du sol de Bordeaux. Par contre, nous ne constatons pas de lien entre ces mesures d'activité, qui restent stables quelle que soit la dose, et la taille de la communauté fonctionnelle cultivable.

C.2.2. Etude pre-homologation au laboratoire

- **Test de germination des spores des champignons mycorhiziens à arbuscules**

A T0, au moment de l'apport de pesticides, le pourcentage de germination des spores est élevé pour les sols de Martincourt et d'Epoisses. Pour les sols de Bordeaux, la variabilité entre les répétitions est plus élevée et les valeurs moyennes obtenues sont plus faibles que pour les autres sols (Figure 12). Toutefois, c'est pour le sol de Pau que le pourcentage de germination à T0 est le plus faible. Après 30 jours d'incubation, pour 4 des sols, Martincourt, Bordeaux 1 et 3 et Epoisses, le pourcentage de germination n'est pas significativement différent de la valeur à T0 30 jours. En revanche, pour Bordeaux 2, la germination est plus faible après 30 jours qu'à T0, alors que pour le sol de Pau, c'est l'inverse.

L'analyse des concentrations en pesticides dans les échantillons montre qu'à T0 seul le Folpel a été retrouvé dans les sols, mais pas les deux autres pesticides, tandis qu'à T30, aucun des trois pesticides n'a été détecté dans les sols. A T0, les pourcentages de germination des spores dans les sols ne sont pas corrélés négativement à la concentration en Folpel (figure 13). Pour cinq des sols étudiés, la germination des spores semblerait même augmenter avec la concentration en folpel.

Pour trois des sols testés, il n'y a pas de différence significative entre les échantillons prélevés à T0, qui contiennent des concentrations significatives de Folpel, et à T30, lorsque aucun des pesticides apportés n'est détectable, et les taux de germination sont élevés. Ceci indique l'absence d'effet de ces apports sur la germination des champignons mycorhiziens. Pour le sol de Bordeaux, la variabilité est toutefois importante, ce qui pourrait être lié au nombre insuffisant de répétitions ou à la texture compacte de ce sol.

Pour le sol de Pau, le taux de germination est faible à T0 suggérant une inhibition de la germination des spores dans ce sol. La concentration en Folpel mais aussi la concentration assez élevée de phosphore dans ce sol (Olsen P, 170 ppm), pourraient contribuer à expliquer cette inhibition. Cependant, après incubation, la germination revient à un niveau élevé, ce qui ne supporte pas l'hypothèse du niveau de P, et pourrait suggérer un effet de l'apport de folpel. En revanche, pour le sol de Bordeaux 2, le pourcentage de germination est plus faible après incubation et disparition du Folpel, ce qui est surprenant. Le sol de Bordeaux 2

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

provient d'une parcelle enherbée, tandis que Bordeaux 1 est travaillé et Bordeaux 3 est désherbé. Pour ces trois sols, une analyse des caractéristiques physico-chimiques à T0 et T30 serait souhaitable afin de mieux discuter les résultats.

En conclusion, les incubations en mésocosmes avec apport de pesticides montrent des résultats différents vis à vis de la germination des spores de champignons mycorhiziens selon les sols. Ainsi, pour quatre des sols testés, le pourcentage de germination des spores n'est pas différent entre les échantillons prélevés juste après apport de pesticides, qui s'est traduit par une concentration de Folpel de 0,05 à 0,2 mg kg⁻¹, et ceux prélevés un mois après, alors que les pesticides n'étaient plus détectables. Pour les sols de Pau et Bordeaux 2, en revanche, les valeurs diffèrent entre les deux prélèvements. Par ailleurs, le taux de germination des spores est plus faible dans les sols de Bordeaux que les autres, ce qui pourrait être lié aux caractéristiques physicochimiques de ces sols.

- Calcul du **pouvoir mycorhizogène** des sols

L'analyse du nombre de propagules par le test MPN, sur les différents sols testés, a mis en évidence, à l'exception du sol enherbé de Bordeaux (Bordeaux 2), que la quantité de champignons endomycorhizogènes dans les sols était extrêmement faible. Les valeurs obtenues étaient, pour la plupart des sols, inférieures à 100 propagules/kg de sol (Figure 14). Ces chiffres sont plus proches de ceux observés dans des sol nus que dans des sols cultivés où des valeurs de plus de 1500 propagules/kg peuvent être observés (Ouahmane *et al.*, 2006).

Pour le sol enherbé de Bordeaux (2) à T0, un nombre de propagules plus important (700 propagule/kg) que pour les autres sols était observé. Bien que supérieur aux autres sols, en raison de la différence dans le traitement de surface du sol, ce niveau était néanmoins faible. Pour la plupart des sols, il n'y a pas eu d'effet significatif de l'apport du cocktail des produits phytosanitaires sur le pouvoir de mycorhization des sols. Pour le sol de Bordeaux enherbé (Bordeaux 2), une tendance, statistiquement non significative, de réduction du nombre de propagules est observée 30 jours après l'apport des produits phytosanitaires.

- Analyse de la **diversité métabolique**

3 jours après traitement aucun effet statistiquement significatif des traitements pesticides des échantillons conservés en conditions de laboratoire ou de l'influence résiduelle du mode de désherbage n'a pu être mis en évidence sur la diversité métabolique.

30 jours après traitement, les échantillons non traités (H=3.29) ont mieux résisté à l'érosion de la diversité que les échantillons traités (H=3.25). la différence observée est statistiquement significative (P=0.043). L'ANOVA réalisée sur les indices de Shannon indique que les différences initiales ont été partiellement comblées et que ni le traitement pesticide ni le mode de conduite du sol n'ont d'effet statistiquement significatif sur le fonctionnement biochimique des communautés microbiennes des sols. A nouveau, la valeur de la probabilité associée à l'effet du mode de conduite (P=0.122) indique une tendance qui tendrait à associer aux traitements "enherbé" et "désherbage chimique" (H=3.28) une diversité métabolique supérieure à celle associée au désherbage mécanique (H=3.25).

- Mesure de la **concentration en cellules bactériennes vivantes**

Que ce soit à 3 jours ou à 30 jours, aucun effet du traitement pesticide ou de la technique de désherbage n'apparaît (figure 15). Ce résultat est confirmé par ANOVA, les probabilités étant supérieures à 0.220 quel que soit le facteur considéré.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

*Remarque : les résultats relatifs à l'étude de la concentration cellulaire vivante sont en partie imputables à un changement de formulation du réactif du kit Live Dead BacLight, avec une diminution conséquente de la concentration en SYTO 9. Les courbes de réponse à des apports croissants de standard interne (*E. coli*) prennent une forme curvilinéaire qui traduit un effet de saturation lié à la concentration limitée en fluorogène. Ceci nous a obligé à ne conserver que la partie initiale linéaire des courbes (trois points d'ajout) pour comparer avec les courbes de calibration correspondantes (*E. coli* dans le sérum physiologique), limitant ainsi considérablement la précision de nos mesures.*

- **Mesure de l'activité déshydrogénase**

Trois jours après l'apport du cocktail de pesticides aux mésocosmes contenant les sols de Bordeaux, on observe deux tendances nettes : la première qui se traduit par une augmentation de l'activité déshydrogénase révélée par une baisse des temps critiques dans les sols traités (figure 16) la seconde qui fait apparaître un nivellement des différences entre les sols soumis aux différentes conduites de désherbage observées immédiatement après le prélèvement sur les parcelles au temps T0 (voir C.2.3. Etude post-homologation).

Ces observations visuelles sont confirmées par ANOVA. Ainsi, concernant l'effet du cocktail pesticides, la probabilité ($P=0.067$) associée à l'augmentation de l'activité déshydrogénase dans les sols traités (temps critiques de 398 h contre 455 h) est très proche du niveau de signification statistique. Au contraire, la probabilité ($P=0.545$) associée à l'effet du mode de conduite du désherbage, indique bien que les effets observés initialement ont disparu.

Il est connu que certains pesticides contribuent à une augmentation de l'activité respiratoire de la communauté microbienne des sols (Rouard *et al.* 1996; Lors *et al.* 2006; Anderson, 2003). Cet effet est le résultat d'un découplage entre le transfert électronique et la production d'énergie au niveau des chaînes respiratoires. La baisse de la production énergétique est compensée par une accélération du métabolisme de la cellule. La disparition de l'effet lié au mode de conduite est probablement le résultat de la période de pré incubation de quatre semaines des sols au cours de laquelle les différences initiales, notamment en matière de carbone facilement minéralisable, ont été en partie gommées.

Trente jours après le traitement pesticide, on aboutit aux mêmes conclusions avec, pour ce qui concerne l'effet propre du traitement, une signification statistique ($P=0.042$) qui permet de confirmer la baisse d'activité déshydrogénase dans les sols non traités (temps critique 323 h) comparé aux sols traités (temps critique 289 h). Cet effet persiste donc au cours du temps. Comme précédemment, il n'y a pas d'effet résiduel lié aux pratiques culturales ($P=0.579$).

En conclusion, c'est, avec la diversité métabolique, le seul bioindicateur abordé à un niveau global qui permette de mettre en évidence un effet lié à la présence de pesticides. Ce résultat est encourageant. Mais, il s'agit ici d'une première observation obtenue avec un bioindicateur en cours de développement. En particulier, lors de l'étude "Doses – réponses", cet effet n'avait pas été observé. Cette étude avait été réalisée avec un sol frais. On peut penser que la période de pré-incubation des sols avant traitement des mésocosmes a contribué à fragiliser la microflore des sols et à la rendre réactive à la présence des pesticides.

- **Etude de la structure des communautés bactériennes totales**

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée sur les données T-RFLP obtenues pour l'ensemble des sols de l'expérimentation aux trois temps de prélèvement (Figure 17) indique que la structure des communautés bactériennes est propre à chacun des sols. Le traitement par les pesticides et les pratiques de désherbage, comme en atteste le

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

regroupement des trois modalités pour le sol de Bordeaux, n'apparaissent pas, comme attendu, être le facteur prépondérant dans la détermination de la composition des communautés bactériennes. La réponse au traitement, si elle existe, serait donc une réponse discrète et propre à chaque sol. Nous pouvons également remarquer que la structure de la communauté bactérienne du sol Bordelais se distingue clairement des trois autres sols selon l'axe 2 de l'ACP qui représente environ 10% de la variance. Finalement, les communautés n'évoluent que très peu au cours du temps. Il apparaît donc que la période de 4 semaines ait été suffisante pour assurer la stabilisation du sol en l'absence de réponse marquée au traitement.

Néanmoins, l'Analyse en Composantes Principales restreinte au sol de Bordeaux indique qu'il pourrait exister une relation entre l'évolution de la structure des communautés au cours du temps et les modalités de désherbage (Figure 18). En effet nous pouvons constater que contrairement aux modalités désherbage mécanique et enherbée, les communautés bactériennes présentes dans la parcelle du sol de Bordeaux désherbé chimiquement retrouve, 30 jours après le traitement, une structure proche de la structure initiale (T0). Il pourrait donc y avoir une résilience rapide sur ce sol après le traitement par les pesticides utilisés dans l'expérimentation. Au contraire, les communautés présentes dans le sol ayant subi un désherbage mécanique semblent être plus affectées par le traitement.

En ce qui concerne les sols d'Epoisse, Pau et Martincourt le traitement appliqué n'engendre pas au cours du temps de réorganisation flagrante des communautés bactériennes présentes dans chaque sol comme en atteste la faible dispersion des points sur l'ACP (Figure 19). Le traitement n'aurait donc, sur ces sols, que peu d'effet sur la structure des communautés microbiennes. Comme nous l'avons noté précédemment, ces trois sols se distinguent nettement selon les axes 1 et 2 de l'ACP.

En conclusion, l'analyse T-RFLP a montré globalement que les communautés bactériennes que nous étions capables de cibler par cette technique n'apparaissent être que peu éprouvées par le traitement pesticides. La communauté la plus réactive serait la communauté du sol de Bordeaux qui avait subi antérieurement des traitements herbicides au glyphosate (modalité Bordeaux 3). Dans ce cas, la communauté bactérienne semble plus apte à une prompt résilience même si l'impact du traitement apparaît être minime.

- Analyse moléculaire de la **diversité des champignons endomycorhizogènes**

Dans un premier temps, nous avons estimé la diversité des champignons endomycorhizogènes présents dans les sols de Martincourt et de Bordeaux 1 et 2. Après une analyse phylogénétique des séquences obtenues, nous les avons regroupées en ribotypes sur la base d'une valeur de bootstraap des branches, supérieure ou égale à 950% (Figure 20). Nous avons ainsi obtenu au total 9 ribotypes appartenant au genre *Glomus*, et un au genre *Acaulospora*. La plupart des ribotypes n'avaient pas d'homologie avec les séquences des bases de données, à l'exception de Gsp1 (proche de *G. mosseae*) et Gsp7 (proche de *G. claroideum*).

A la vue de la diversité des champignons endomycorhizogènes (Figure 21) observée, le sol de Martincourt est plus pauvre au niveau de la diversité que les deux sols de Bordeaux, qui ont une diversité équivalente, mais différent au niveau des ribotypes présents. La plupart des ribotypes détectés n'avaient pas d'homologie avec des séquences connues déposées dans les bases de données.

- Analyse **quantitative des Gloméromycètes**

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Pour l'analyse de l'ensemble des Gloméromycètes, sur le sol de Martincourt (figure 22), nous observons une réduction de près de 50% 3 jours après l'apport du cocktail composé de fenhexamide, folpel et de deltaméthrine. Il n'y a plus, par contre, d'effet statistiquement significatif entre 3 et 30 jours. Un effet similaire est observé pour *G. mosseae*, avec après 3j une forte réduction du nombre de copies du gène ribosomique, nombre qui reste ensuite stable jusqu'à 30j. Pour le troisième taxa, le groupe *G. claroideum/etunicatum*, une réduction plus lente mais statistiquement significative après 30j est observée.

En conclusion, les analyses que nous avons effectuées sur les champignons endomycorhizogènes endogènes aux sols testés avaient pour but de suivre l'impact des produits phytosanitaires. En raison de la faible teneur en Gloméromycètes dans ces sols, une série d'amplifications nichées ont été nécessaires afin de pouvoir mettre en évidence ces organismes. Ces amplifications peuvent par contre aplanir les différences éventuelles entre les différents échantillons masquant ainsi l'effet éventuel des produits phytosanitaires. Ceci pourrait expliquer que l'effet négatif sur la population des Gloméromycètes, observé sur le sol de Martincourt en 2008, n'a pas été confirmé sur les sols de Bordeaux en 2009. Les sols testés étant pauvre en Gloméromycètes, un impact éventuel lié à l'apport de pesticides est techniquement difficile à mettre en évidence. D'autre part, la rapide dissipation ou l'adsorption des pesticides aux agrégats de sols, ne les rendant ainsi plus directement biodisponibles, pourrait aussi être une des causes de cet absence d'effet significatif sur cette communauté de champignons.

- Analyse de la **structure de la communauté microbienne *pcaH***

Ces analyses moléculaires reposent sur l'extraction et l'amplification par polymérisation en chaînes (PCR) des acides nucléiques du sol. L'extraction des acides nucléiques du sol est réalisée selon le protocole décrit par Martin-Laurent *et al.* (2001). Nous présentons ci-dessous la séparation électrophorétique des ADN extraits des sols d'Epoisses, St Emilion, Martincourt et Pau (figure 23). Ces extraits d'ADN de sol présentent une taille importante et une faible dégradation (smear de faible intensité). Une première analyse PCR a montré que l'ADN de ces sols n'était pas contaminé par des acides humiques et qu'en conséquence, il était amplifiable indiquant ainsi que les empreintes moléculaires et les quantifications de séquences nucléotidiques pouvaient être réalisées.

L'analyse de la structure de la communauté *pca* a été conduite à partir d'empreintes ADN ciblant le gène *pcaH* qui ont été digitalisées et analysées à l'aide de la suite de logiciel ADE-4. Cette analyse permet de représenter dans des plans issus d'une Analyse en Composantes Principales (ACP) la variance des empreintes *pcaH*-PCR-RFLP générée pour chaque sol après différents temps d'incubation suite à l'ajout du cocktail de pesticides (figure 24).

Ainsi l'observation du panel T0 de la figure 24 montre que les sols de Bordeaux, Martincourt, Epoisses et Pau sont séparés selon l'axe 1 représentant 21 % de la variance observée. On notera que sur la base de l'analyse de la structure de la communauté *pcaH* les sols légers plutôt sablo limoneux (Bordeaux et Pau) sont proches et nettement discriminés des sols argilo limoneux d'Epoisses et de Martincourt. Au cours du temps, l'analyse de la structure des communautés *pcaH* garde globalement le même profil. On notera toutefois que, suite au traitement des sols par le cocktail de pesticides, les sols de Bordeaux soumis à différentes pratiques culturales, désherbage mécanique (Bordeaux 1), enherbement (Bordeaux 2), et désherbage chimique (Bordeaux3) sont discriminés principalement selon l'axe 2 de l'ACP représentant la majorité de la variance observée (60% de la variance à T3 et 44 % de la variance à T30). Cet effet provoqué par l'ajout du cocktail de pesticides diminue dans le temps mais perdure après 30 jours d'incubation. Cette observation semble indiquer que bien que le traitement du sol ne semble pas initialement affecter la structure de la

communauté *pcaH*, le traitement par le cocktail de pesticides modifie de manière différente la structure de la communauté *pcaH*. Elle suggère donc la présence d'un effet synergique de la pratique culturale et du traitement du sol par le cocktail de pesticides selon des mécanismes qui restent à éclaircir.

Au-delà de l'observation de l'évolution de la structure de la communauté *pcaH* dans les sols de Bordeaux révélée par la figure 25, l'analyse des empreintes *pcaH* RFLP menée par sol montre une tendance similaire pour le sol de Pau et de Martincourt pour lesquels l'ellipse observée à T0 est clairement discriminée de celle observée à T30. En revanche, pour le sol d'Epoisses, la variabilité observée sur le T30 masque d'éventuelles modifications de la structure de la communauté *pcaH*.

Pour conclure, l'analyse de la structure de la communauté pcaH responsable de la dégradation du protocatéchuate, intermédiaire métabolique clef de la voie des β-cétoadipates, montre que :

- les propriétés physicochimiques des sols l'influencent,
- le traitement du sol par le cocktail de pesticides peu l'influencer selon le type de sol et en interaction avec le mode de désherbage pratiqué sur la parcelle.

- **Analyse de l'abondance de la communauté microbienne *pcaH***

En préambule à cette analyse, un test a été conduit pour évaluer la présence d'inhibiteur de la qPCR comme décrit par Bru *et al.* (2008). Ce test consistant à ajouter une quantité connue du plasmide pGemT nous a permis de conclure que les ADN extraits des différents sols n'étaient pas contaminés par des inhibiteurs. L'analyse de l'abondance de la communauté *pcaH* a été conduite par PCR quantitative selon la procédure décrite récemment par El Azhari *et al.* (2008).

La communauté bactérienne *pcaH* varie de 4×10^4 à 1×10^5 copies par g de sol quel que soit le sol considéré (figure 26 panel A). Ces valeurs sont du même ordre que celles rapportées par El Azhari *et al.* 2008. Elles montrent que cette communauté bactérienne est ubiquiste dans les sols assurant la fonction de biodégradation de composés phénoliques naturels et xénobiotiques. Aux temps t0 et t3, l'abondance de la communauté bactérienne *pcaH* détectée dans les différents sols ne diffère pas statistiquement ($P < 0.05$). Toutefois, on notera qu'à T30 le sol d'Epoisses présente une communauté *pcaH* plus abondante que celle des sols de Bordeaux 3 et Martincourt. Malgré cette observation, la gamme de variation de ce paramètre reste relativement faible et en tout état de cause reste dans le même ordre de grandeur.

L'analyse de l'abondance relative de la communauté *pcaH* par rapport à l'abondance de la communauté bactérienne rend compte de la richesse spécifique de cette communauté fonctionnelle au sein de la communauté globale (figure 26, panel B). Elle révèle que suite à l'apport du cocktail de pesticides ce paramètre ne varie pas de manière significative dans les sols de Bordeaux et de Martincourt. On notera que pour les sols de Bordeaux soumis à différentes pratiques culturales, différentes tendances se dégagent suite à l'apport du cocktail de pesticides : (i) le sol enherbé se caractérise par une tendance à la baisse de l'abondance spécifique *pcaH* alors que (ii) le sol désherbé chimiquement se caractérise par une tendance à la hausse de l'abondance spécifique et que (iii) le sol désherbé mécaniquement se caractérise par sa stabilité. Bien que ces tendances ne « passent » pas le test statistique à 5% en raison de la variabilité des résultats de PCR quantitative, elles suggèrent que les pratiques culturales influencent la réaction de la communauté *pcaH* à l'apport de pesticides. Toutefois, comme observé précédemment, il semblerait que suite au traitement du sol d'Epoisses par le

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

cocktail de pesticides, la richesse spécifique de la communauté *pcaH* augmente de manière significative ($p < 0.05$, test de Fischer).

*Pour conclure, la communauté *pcaH* est détectée dans les différents sols dans des gammes allant de 10^4 à 10^5 copies par gramme de sol. L'abondance spécifique de cette communauté fonctionnelle ne semble pas affectée par l'apport du cocktail de pesticides. Pour un des sols, l'abondance spécifique de la communauté augmente suite à l'ajout du cocktail. Il est probable que cette fonction ubiquiste représentée dans de nombreux taxons bactériens soit peu sensible en terme d'abondance à des variations extrinsèques mais plutôt reliée à des paramètres intrinsèques tels que la matière organique labile des sols par exemple. Dans ce cas, cette communauté fonctionnelle garderait une abondance spécifique relativement stable mais varierait dans sa composition comme l'analyse de la structure de ces communautés le suggérerait. Par conséquent, pour utiliser l'abondance spécifique de *pcaH* comme un marqueur microbien de la qualité des sols, il faudrait descendre dans des groupes taxonomiques susceptibles de réagir à la variation de paramètres extrinsèques, plutôt que de travailler sur la communauté *pcaH* dans son ensemble.*

- **Analyse de l'activité nitrifiante**

L'activité nitrifiante varie selon les sols ; ainsi les sols argilo limoneux de Martincourt et d'Epoisses se caractérisent par une activité nitrifiante beaucoup plus élevée que celle observée dans les sols sableux de Bordeaux et Pau. Ces derniers présentent en effet une activité nitrifiante très modérée (figure 27). Ces résultats sont accord avec la littérature qui rapporte d'importantes gammes de variations de l'activité nitrifiante de la microflore en fonction de paramètres physicochimique du sol.

Suite à l'ajout du cocktail de pesticides, l'activité nitrifiante des sols de Bordeaux 2, Epoisses et Pau diminue au cours de l'incubation (figure 27). Toutefois, cette tendance n'a pas pu être testée statistiquement étant donné que, pour des raisons techniques, nous n'avons pas pu faire de répétitions par faute de disponibilité de sols.

- **Analyse de l'abondance de la communauté nitrifiante**

Dans les différents sols testés, nous avons détecté à l'aide d'amorces oligonucléotidiques dégénérées permettant d'amplifier spécifiquement *amoA* d'origine bactérienne, de 1×10^3 à 3×10^4 copies par ng d'ADN de sol (figure 28, panel A). On notera que les valeurs les plus faibles sont observées dans les sols sableux de Pau et de Bordeaux. Cette observation est en accord avec les données d'activité nitrifiante qui étaient nettement plus faibles dans ces deux sols. Suite au traitement du sol avec le cocktail de pesticides, l'abondance spécifique du gène *amoA* bactérien reste stable quel que soit le sol considéré.

De plus, à l'aide d'amorces oligonucléotidiques dégénérées permettant d'amplifier spécifiquement *amoA* d'archaebactéries, nous avons détecté de 9×10^3 à 5×10^4 copies du gène *amoA* par ng d'ADN de sol (figure 28, panel B). On notera ici que contrairement à l'abondance du gène *amoA* d'origine bactérienne, l'abondance du gène *amoA* provenant des Archeobactéries est plus importante dans les sols bordelais présentant une activité nitrifiante peu importante. L'abondance spécifique de la communauté nitrifiante d'Archeobactéries quantifiée dans les différents est stable au cours du temps suite au traitement du sol avec le cocktail de pesticides. Seul le sol de Pau présente après 30 jours d'incubation une diminution significative de l'abondance spécifique.

Pour conclure, l'activité potentielle et l'abondance spécifique de la communauté nitrifiante ne semblent pas être affectées par le traitement du sol par le cocktail de pesticides. Ces deux marqueurs varient en fonction des paramètres physicochimiques du sol, la plus faible

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

activité potentielle et la plus basse abondance spécifique de la communauté amoA étant détectées dans les sols sableux de Pau et Bordeaux. Comme nous l'avons suggéré pour la communauté fonctionnelle pcaH il est probable que la redondance fonctionnelle de la communauté nitrifiante masque pour partie des changements de sa composition. Pour explorer cette perspective, il aurait fallu envisager d'étudier la structure des populations formant la communauté nitrifiante.

- **Recherche de gènes impliqués dans la dégradation de pesticides**

Il s'agissait dans cette approche de mettre en place une démarche qui permettrait d'évaluer l'impact d'un traitement pesticide sur le potentiel génétique d'épuration préexistant dans le sol. Nous avons travaillé uniquement sur les sols de Bordeaux pour éprouver notre démarche. Afin de pallier la faible quantité d'ADN cible dans le sol ou la faible spécificité des amorces, l'amplification de chaque gène a été réalisée par deux amplifications consécutives. Cette approche nous a permis d'obtenir un produit d'amplification pour la plupart des gènes ciblés (tableau 3). Seul le gène *mpd* qui code pour une méthyl parathion hydrolase impliquée dans la dégradation du méthyl parathion (insecticides de la famille des organophosphorés) et le gène *tfdA* qui code pour une 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygénase intervenant dans la dégradation du 2,4-D (herbicide de la famille des aryloacides) n'ont pu être amplifiés et détectés dans les sols. L'obtention d'un produit d'amplification n'étant pas une garantie suffisante nous avons réalisé le séquençage des amplicons sur les produits positifs. Alors que les amplifications ciblant le gène *AtzA* et *ndoB* sont conformes aux produits attendus, il s'est avéré que l'amplification utilisant les amorces de la littérature décrites pour le gène *Cat* n'avait pas permis de cibler ce gène. La comparaison des séquences obtenues après amplification avec les bases de données n'a montré aucune similarité avec les séquences répertoriées remettant en cause la spécificité de ces amorces dans une utilisation ciblant la communauté édaphique dans son ensemble.

Les résultats obtenus sur le sol de Bordeaux indiquent qu'il existe dans les trois parcelles un potentiel de dégradation pour l'atrazine et des hydrocarbures polyaromatiques (HAP). Avec la réserve de rigueur que nous nous devons puisque les résultats sont obtenus par PCR après de nombreux cycles d'amplification, la différence d'intensité obtenue entre les échantillons à l'issue de la PCR pourrait suggérer que ce potentiel varie au cours du temps (données non montrées). La démonstration faite de ces capacités de dégradation préexistantes pourrait donc être suivie par une étude de la dynamique des gènes correspondants au cours du temps après le traitement afin de juger de son impact sur les communautés dégradant l'atrazine ou les hydrocarbures polyaromatiques. Ceci pourrait être réalisé par des méthodes de PCR quantitative. Une approche quantitative menée en parallèle sur le gène de l'*ARNr 16S* et couplée à des tests statistiques permettrait ensuite d'exprimer les résultats obtenus en terme d'impact sur l'abondance des communautés dégradants ces xénobiotiques.

De façon intéressante, nous avons pu montré que le sol de Bordeaux, auquel nous avons limité la deuxième partie de notre étude, comporte des gènes impliqués dans la dégradation de xénobiotiques. Il serait donc intéressant de poursuivre cette approche afin de connaître la dynamique de ces gènes après le traitement pesticide, et donc ainsi des populations qui possèdent les fonctions cataboliques associées. Appliqué à l'ensemble des sols, cela permettrait d'évaluer l'impact du traitement sur le potentiel génétique de dégradation qu'ils renferment.

- **Taille de la communauté bactérienne cultivable fonctionnelle impliquée dans l'ARS**

Concernant la taille de la communauté bactérienne cultivable fonctionnelle, quel que soit le temps considéré, la densité est toujours significativement supérieure dans le sol d'Époisses

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

(log CFU 7.09) en comparaison avec celui de Pau (log CFU 6.41), (Figure 29). Pour les autres sols, la taille de la communauté bactérienne cultivable fonctionnelle se situe à des valeurs intermédiaires (de log CFU 6,74 à 6,89).

Nous aurions pu nous attendre à des densités supérieures pour le sol de Martincourt dans la mesure où ce sol est riche en carbone organique et qu'il a déjà été montré que des teneurs élevées en carbone stimulent la taille de la communauté bactérienne globale et/ou fonctionnelle.

Au cours du temps, et quel que soit le type de sol considéré, nous constatons, après 3 jours d'incubation, une augmentation significative de la densité des bactéries fonctionnelles respectivement de log CFU 6.76 à log CFU 6.9, (Figure 30). Cette augmentation pourrait reposer sur deux hypothèses : elle pourrait résulter de la mise en conditions d'incubation favorable au développement bactérien et/ou de l'utilisation des produits phytosanitaires comme source de carbone et/ou d'énergie. Il aurait fallu disposer d'un sol témoin non amendé en produits phytosanitaires, mais incubé dans les mêmes conditions que les sols sur lesquels un mélange de pesticides a été apporté, afin de pouvoir trancher entre ces deux hypothèses. Néanmoins sachant qu'une pré incubation de 15 jours a été menée avant traitement des différents sols, cette première hypothèse semble pouvoir être écartée. Par contre, du fait que la taille diminue entre 3 et 30 jours, la deuxième hypothèse apparaît plus plausible, comme si la microflore avait complètement dégradé et utilisé les pesticides comme source d'énergie et de développement. En effet, il est connu, en particulier pour le fenhexamid, que ce produit se caractérise dans le sol par une dégradation très rapide. Il a été montré, en effet, pour de nombreux sols, que la moitié de la matière active avait disparu en moins d'un jour. A de faibles concentrations, toute une gamme de métabolites est formée et, eux aussi, sont ensuite dégradés en dioxyde de carbone. Ces voies de dégradation passaient par une méthylation du groupe hydroxy, une hydroxylation et une déchloration du composé aromatique (Anderson *et al.* 1999).

Ainsi, la taille de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable ne demeure pas stable au cours du temps et il semble qu'elle réponde à l'apport de produits phytosanitaires. L'apport du mélange semble stimuler cette taille laissant penser à une utilisation par la microflore du mélange de pesticides comme substrat.

En outre, l'effet « type de sol » est également significatif avec une taille de la communauté bactérienne fonctionnelle la plus élevée dans le cas du sol d'Epoisses et la plus faible dans le cas du sol de Pau. Pour le sol de Bordeaux, aucune influence des pratiques de désherbage n'est mise en évidence.

• Mesure de l'activité arylsulfatase

Concernant l'activité ARS (Figure 31), les niveaux d'activité totale mesurés sur les sols étudiés sont conformes aux résultats présentés dans la littérature avec des valeurs autour de 40-60 μg de PNS g^{-1} sol sec h^{-1} pour le sol de Martincourt (Dedourge 2003 ; Vong *et al.* 2007), et de l'ordre de 30 et 50 μg de PNS g^{-1} sol sec h^{-1} pour le sol d'Epoisses (Slezack-Deschaumes *et al.* 2009). Nous constatons des valeurs toujours significativement plus élevées dans le cas du sol de Martincourt. Ce sol montre un taux de carbone organique important de l'ordre de 29 g kg^{-1} . Or, il a été montré que cette activité enzymatique est corrélée positivement avec le taux de carbone organique du sol (Deng et Tabatabai, 1997).

De plus les sols de Martincourt et d'Epoisses sont des sols agricoles dont les valeurs de pH varient de 6.7 à 8.2. Ceci pourrait aussi expliquer les plus fortes activités mesurées par rapport au sol de Pau dont le pH est relativement faible (5.8). En effet, l'activité ARS est connue pour avoir un optimum de pH plutôt basique (Fitzgerald et Milazzo, 1970). Par

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

ailleurs, le sol de Martincourt est particulièrement riche en S organique corrélativement à un taux en C organique élevé, ce qui peut également expliquer une activité plus importante dans ce sol, ceci malgré la présence importante de calcaire qui entraîne, en général, une limitation de l'activité microbienne. Enfin, l'activité arylsulfatase est connue pour être significativement corrélées avec le taux d'argiles. Ce phénomène est dû à la stabilisation des enzymes extracellulaires par adsorption au niveau des surfaces internes ou externes des argiles (Klose *et al.* 1999). Ceci est confirmé par nos résultats qui montrent que ce sont bien les sols d'Epoisses et de Martincourt, dont les teneurs en argiles sont élevées, qui présentent les activités les plus importantes.

Cet « effet sol » est prépondérant et malgré l'apport de produits phytosanitaires, nous n'observons pas d'évolution de l'activité ARS au cours du temps. Deux hypothèses peuvent être émises : i°) soit l'apport de pesticides n'a aucun effet sur la communauté bactérienne cultivable et en particulier sur la fonction arylsulfatase de cette dernière, ii°) soit en fonction des caractéristiques physico-chimiques des sols, l'effet de l'apport de produits phytosanitaire est neutralisé (adsorption éventuelle aboutissant à un effet neutre). Mais cette dernière hypothèse semble peu probable dans la mesure où le sol de Pau est très riche en acide humique et devrait donc réagir différemment des autres sols avec une capacité d'adsorption plus élevée et un impact moindre des produits, ce qui n'est pas le cas.

Ainsi, l'activité ARS demeure stable au cours du temps et aucun effet de l'apport de produits phytosanitaires n'est noté. Seul l'effet « type de sol » est significatif avec une activité la plus élevée dans le cas du sol de Martincourt et la plus faible dans le cas du sol de Bordeaux. Pour ce dernier cas, aucune influence des pratiques de désherbage n'est mise en évidence.

- Amplification du **gène codant l'arylsulfatase**

Des essais d'amplification menés sur le sol d'Epoisses à t0, t3 et t30 jours ont permis de mettre en évidence un fragment à la taille attendue. Ce fragment a été cloné et envoyé au séquençage de façon à s'assurer qu'il s'agit bien d'une séquence affiliée au gène codant l'ARS. Les résultats sont en cours d'obtention.

C.2.3. Etude post-homologation

- Détermination de la **biomasse microbienne**

La figure 32 présente les résultats des dosages de la biomasse microbienne pour les quatre temps de prélèvement. En annexe 3 sont présentés les résultats obtenus par date de prélèvement.

Les traitements « témoin » et « pesticides » ont été distingués dès la première date de prélèvement par commodité de présentation mais n'existent réellement qu'à partir de la 2^{ème} série de prélèvement (06/2008).

Quelle que soit la date du prélèvement, on n'observe pas de différences significatives entre les biomasses microbiennes des modalités traitées avec les pesticides (p) et de leurs homologues non traitées (t).

A chaque prélèvement les modalités « enherbement » (Et ou Ep) présentent les plus fortes biomasses microbiennes, sans quelles soient cependant significativement différentes de toutes les autres modalités.

Mis à part pour le prélèvement 3 (16/07/2008) de la modalité Tt, nous n'avons pas observé d'effet date de prélèvement sur la valeur de la biomasse microbienne.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

- Dosage des **activités FDA hydrolases**

La figure 33 présente les résultats des dosages des activités FDA hydrolases pour les quatre temps de prélèvement. En annexe 4 est présenté les résultats obtenus par date de prélèvement.

Pour chaque date de prélèvement, on n'observe pas de différences significatives entre les activités FDA hydrolases des modalités traitées avec les pesticides (p) et de leurs homologues non traitées (t).

Pour une date de prélèvement donnée on n'observe pas non plus de différences entre les modalités d'entretien du sol.

Il apparaît nettement un effet « date de prélèvement », avec des valeurs fréquemment significativement plus fortes pour les prélèvements de 07/2008 et 05/2009.

- Mesure des **activités respiratoires**

La figure 34 présente les résultats des mesures de la respiration de la microflore du sol lors de l'incubation en microcosme durant 28 jours à 28°C. En annexe 5 est présenté les résultats obtenus par date de prélèvement.

Quelle que soit la date du prélèvement, on n'observe pas de différences significatives entre la respiration des modalités traitées avec les pesticides (p) et de leurs homologues non traitées (t).

A chaque prélèvement les modalités « enherbement » (Et ou Ep) présentent les plus fortes respirations, sans quelles soient cependant significativement différentes de toutes les autres modalités. On note quand même que pour 2 dates de prélèvement, le 16/07/2008 et le 29/05/2009, la modalité Ep (enherbement + pesticides) a un niveau de respiration significativement plus élevé que la modalité Dp (désherbée + pesticides).

La variabilité saisonnière du potentiel respiratoire du sol n'est pas très élevée. On observe cependant un écart significatif pour 4 modalités sur 6 entre les prélèvements 2 (16/06/2008) et 4 (29/05/2009), les valeurs des prélèvements 4 étant plus élevées que celles des prélèvements 2 .

- Mesures des **activités potentielles de minéralisation de l'azote.**

La figure 35 présente les résultats des mesures du potentiel de minéralisation de l'azote des sols après 4 semaines en incubation contrôlée (28°C). En annexe 6 est présenté les résultats obtenus par date de prélèvement.

Quelle que soit la date du prélèvement, on n'observe pas de différences significatives entre les potentialités de minéralisation de l'azote des modalités traitées avec les pesticides (p) et de leurs homologues non traitées (t).

Pour une date de prélèvement donnée, on n'observe pas non plus d'effet lié à la présence de l'enherbement sur le potentiel de minéralisation de l'azote.

On n'observe pas non plus d'effet « date de prélèvement » sur la mesure de la quantité d'azote potentiellement minéralisable.

En conclusion, Le cocktail de pesticides appliqué au sol n'exerce pas d'effets significatifs, directs sur la biomasse microbienne et ses activités telles que mesurés avec des méthodes d'analyse normalisées qui font partie du catalogue des laboratoire d'analyse de sol. Cela n'exclu pas un effet à long terme et/ou cumulatif des pesticides.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Une analyse multivariée devrait être réalisée pour mettre éventuellement en évidence des effets plurifactoriels.

- Analyse de la **diversité biochimique**

Avant traitement, l'analyse des indices de Shannon permettent de mettre en évidence des différences significatives entre les différents types de conduites ($P=0,028$) (figure 36). Le test de comparaisons multiples de Holm-Sidak nous permet de mettre en évidence des différences entre les communautés de micro-organismes présentes dans les sols désherbés chimiquement ou mécaniquement et celle présente dans les sols enherbés.

L'ANOVA réalisée sur les indices de Shannon déterminés 3 jours après application des pesticides indique que les différences initiales ont été partiellement comblées et que ni le traitement pesticide ni le mode de conduite du sol n'ont d'effet statistiquement significatif sur le fonctionnement biochimique des communautés microbiennes des sols. Cependant, la valeur de la probabilité associée à l'effet du mode de conduite ($P=0,072$) indique une tendance qui tendraient à associer aux traitements "enherbé" et "désherbage chimique" une diversité métabolique supérieure aux désherbage mécanique.

30 jours après l'application des traitements pesticides sur la parcelle expérimentale, alors que les traitements pesticide restent sans effet, il est à nouveau possible de mettre en évidence les différences significatives ($P=0,008$) au niveau de la diversité biochimique des communautés microbiennes lié au mode de désherbage. L'enherbement favorise cette diversité ($H=3,31$) par rapport au désherbage mécanique ($H=3,28$) et chimique ($H=3,22$).

- Analyse de la **concentration cellulaire bactérienne vivante**

L'ANOVA confirme les impressions visuelles de la figure 37 : avant l'application du traitement pesticide, il n'est pas possible de différencier les différents sols en fonction de leur mode d'entretien ($P=0,803$).

Ainsi qu'il ressort de la figure 38, impression confirmée par ANOVA, 3 jours ou 30 jours après l'application du traitement, aucune différence n'apparaît entre les échantillons traités ou non traités ($P=0,207$ ou $0,735$) ainsi qu'entre les sols soumis à différents types de conduite ($P=0,462$ ou $0,166$).

- Détermination de l'**activité déshydrogénase**

Avant apport des pesticides, la figure 39 indique une activité déshydrogénase supérieure (temps critiques plus faibles) dans les échantillons de sol prélevés dans les parcelles enherbées. Il s'agit d'une tendance qui n'est pas totalement confirmée par ANOVA, la probabilité associée étant de 0.08.

Cette tendance ne se manifeste plus ($P>0,5$), que ce soit 3 jours ou 30 jours après apport des pesticides (figure 40).

En conclusion, contrairement à l'étude réalisée en laboratoire, et à l'exception des résultats observés lors du premier prélèvement, l'activité déshydrogénase ne semble pas affectée ni par le mode d'entretien du sol, encore moins par un apport de pesticides. Comme nous l'avons souligné, la fragilisation de la microflore du sol par une longue période de pré incubation (1 mois) était probablement à l'origine des effets observés dans l'étude au laboratoire. Dans le cas présent, les essais ont été réalisés sur du sol frais qui a probablement conservé toute sa capacité de tolérance vis-à-vis d'un stress chimique. Il est plus surprenant de constater qu'un enherbement permanent du sol n'a pas de conséquence visible sur l'activité de la microflore. La détermination de la diversité biochimique, reste

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

donc le seul indicateur permettant de discriminer de façon significative une pratique culturale telle que l'enherbement. On pourrait d'ores et déjà envisager une étape de normalisation afin de faire entrer ce type d'indicateur dans le catalogue des laboratoires d'analyse.

- **Analyse de l'abondance spécifique de la communauté *pca***

Seule approche analytique au niveau moléculaire, l'analyse de l'abondance de la communauté *pca* dans les sols des parcelles viticoles de la montagne Saint Emilion donne les résultats présentés figure 41.

Le gène *pca* est détecté dans une gamme de variation allant de 2×10^4 à 9×10^4 copies de *pcaH* par g de sol. L'abondance de cette communauté dépend des pratiques culturales appliquées sur la parcelle viticole ; ainsi les parcelles soumises au désherbage mécanique présente une communauté *pca* plus abondante que celles soumises à l'enherbement ($p < 0.05$, test de fisher). Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que le désherbage mécanique conduit à un apport de fragments végétaux au sol, favorisant le développement de communautés microbiennes la dégradant. L'observation détaillée des données de la figure 11 montre que le traitement du sol par le cocktail de pesticides n'induit pas de modification de l'abondance de la communauté fonctionnelle *pca*.

L'analyse de l'abondance spécifique de la communauté *pca* dans les sols des parcelles viticoles de la montagne Saint Emilion est présentée figure 42.

L'analyse de la figure 42 montre que contrairement à ce que nous observions pour l'abondance de la communauté *pca* (figure.41), l'abondance spécifique de la communauté *pca* ne semble pas être affectée par les pratiques culturales. Ces observations ne sont toutefois pas contradictoires ; elles montrent que les variations d'abondance de la communauté *pca* observées dans les parcelles viticoles s'accompagnent aussi de la variation de l'abondance globale de la communauté.

Toutefois, l'analyse de l'abondance spécifique de cette communauté indique que ce paramètre varie en réponse au traitement par le cocktail de pesticides mais pas pour toutes les pratiques culturales. Ainsi, l'abondance de la communauté *pca* des sols désherbés mécaniquement ne semble pas affectée par le traitement avec le cocktail de pesticides. A contrario les sols désherbés chimiquement présentent des variations significatives de l'abondance de la communauté *pca* : celle-ci diminue dans les sols désherbés chimiquement traité par le cocktail de pesticides. Cette observation semble indiquer qu'il pourrait exister une interaction entre la pratique culturale et le traitement phytosanitaire sur l'abondance de la communauté *pca*.

*Pour conclure, l'abondance de la communauté *pca* est affecté par les pratiques culturales en place sur les parcelles viticoles ; cette communauté semble plus abondante sur les sols désherbés mécaniquement que sur les sols enherbés. De plus, l'abondance spécifique de cette communauté fonctionnelle n'est réduite que dans les sols désherbés chimiquement. Cette dernière observation semble suggérer l'existence d'une interaction de type synergique entre le traitement phytosanitaire et les pratiques culturales sur l'abondance de la communauté *pca*.*

Conclusion

Au regard des résultats présentés, nous pouvons dire que globalement, en utilisant un ensemble de bioindicateurs pris à différents niveaux d'organisation biologique, l'impact du cocktail de pesticides (folpel, deltaméthrine et fenhexamide) sur la microflore de différents

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

sols reste toujours très limité, souvent à la limite de la signification statistique, voire nul. Nous pouvons cependant dégager quelques tendances intéressantes ... et quelques explications.

Ainsi, les bioindicateurs globaux de référence (biomasse microbienne, activité FDA hydrolase, activité respiratoire et azote potentiellement minéralisable) n'ont pas permis de mettre en évidence un effet du cocktail de pesticides, même si des tendances positives de l'enherbement se dessinent sans pour autant atteindre le seuil de signification statistique. Parmi les indicateurs globaux en cours de développement, la diversité biochimique ainsi que dans certains cas, l'activité déshydrogénase sont les seuls indicateurs qui permettent de mettre en évidence un effet lié à la présence de pesticides ainsi, d'ailleurs, qu'au mode d'entretien du sol. Ce résultat est encourageant sachant que, pour l'activité déshydrogénase au moins, il s'agit d'un bioindicateur en cours de développement encore largement perfectible. Notons également que les résultats les plus significatifs ont été obtenus sur les sols conservés au laboratoire. Il est possible de penser que la période de pré incubation des sols avant traitement des mésocosmes a contribué à fragiliser la microflore des sols et à la rendre plus réactive à la présence des pesticides. Cette observation suggère que la combinaison du stress chimique avec un stress physicochimique (température, humidité) peut contribuer à affecter la microflore. Enfin, les communautés bactériennes que nous étions capable de cibler par T-RFLP n'apparaissent être que peu éprouvées par le traitement pesticide. La communauté la plus réactive serait la communauté du sol de Bordeaux qui avait subi antérieurement des traitements au glyphosate. Dans ce cas, la communauté bactérienne semble plus apte à une prompt résilience même si l'impact du traitement semble minime.

Des quatre approches visant à évaluer l'impact de l'apport d'un mélange de pesticides sur les champignons mycorhizogènes à arbuscules (MA), seuls les deux tests de germination des spores et de mesure du pouvoir de colonisation des champignons MA se sont avérés positifs. Le second, en particulier, a permis de mettre en évidence un effet négatif, statistiquement non significatif, de l'apport des pesticides dans le sol enherbé de Bordeaux. Cette tendance n'a pu être confirmée par le test quantitatif, vraisemblablement en raison de la faible quantité de champignons MA présents initialement dans les sols viticoles.

L'analyse de l'impact écotoxicologique des pesticides testés sur la structure, l'abondance et la diversité de communautés fonctionnelles des sols impliquées dans le cycle du carbone (communauté *pca*) et de l'azote (communauté *amoA*) a montré que globalement ces marqueurs étaient peu affectés par l'application du cocktail. Toutefois, l'un des marqueurs (i.e. communauté *pca*) présente une abondance significativement moindre à de fortes doses (x10 et x20) et voit sa structure altérée suite à l'application de produits phytosanitaires dans certains sols. Ces premières indications tendent à indiquer que le développement de ce marqueur à une échelle taxonomique plus fine pourrait contribuer à terme à révéler l'impact d'actions anthropiques sur les populations entrant dans la composition de la communauté fonctionnelle *pca*. Des développements similaires pourraient être envisagés pour la communauté *amoA* responsable de la nitrification dans les sols.

Une approche moléculaire qui permettrait de suivre la dynamique des communautés intervenant dans la dégradation de composés xénobiotiques est en cours de développement.

Il ressort de nos expérimentations que l'apport de produits phytosanitaires n'a eu aucun impact sur l'activité arylsulfatase (ARS) potentielle totale quels que soient le type de sol utilisé, la dose considérée (y compris jusqu'à 20 fois la dose agronomique) et le temps d'incubation (3 et 30 jours). Ainsi, soit cet « indicateur » n'est pas assez sensible, soit l'apport de produits phytosanitaires n'a pas d'impact sur cette activité. En effet, des produits testés, cette activité ne semble pas affectée. Par contre, un effet sur la taille de la communauté

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

bactérienne fonctionnelle cultivable ARS a pu être observé, mais la question de la pertinence de cet indicateur demeure dans la mesure où l'effet observé est variable suivant le type de sol.

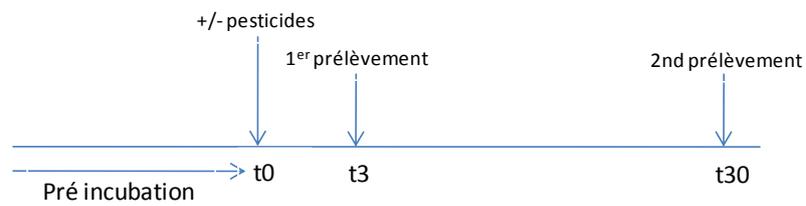
Il nous est possible d'avancer ici quelques hypothèses pour expliquer ces résultats. D'abord, il est apparu que le choix des pesticides, que nous avons raisonné en fonction de considérations pratiques, s'est avéré peu pertinent. Les caractéristiques physico-chimiques et biologiques des différents produits, Koc élevés à très élevés (deltaméthrine et folpel), volatilité importante (folpel) et demi-vie très courte (fenhexamide), limitent probablement l'accessibilité biologique des produits et ses effets sur les organismes vivants. Toutefois, les analyses chimiques montrent une disponibilité (anormalement ?) élevée de la deltaméthrine qui présente un Koc élevé (> 300000). Un choix plus pertinent des pesticides pourrait être réalisé par une approche de type QSAR en cours de développement au sein du réseau micropolluants organiques du département Environnement et Agronomie de l'INRA

Dans de nombreux cas, les effets observés se sont avérés être des tendances non confirmées par voie statistique. Nous nous demandons si (suggérons que ?) dans le contexte d'études appliquées à un milieu aussi hétérogène que le sol, un relèvement du niveau de signification statistique (risque de première espèce de 10 %) ne serait pas judicieux et acceptable dans le cadre d'une démarche conservatrice.

Nous nous attendions à un effet plus marqué de l'enherbement du sol sur ses caractéristiques biologiques à l'exception de l'abondance de la communauté pca et de la diversité des populations de champignons endomycorhizogènes. Les effets mesurés sont, là encore, faibles et souvent à la limite de la signification. Il s'agit là probablement du résultat de la mise en place récente du dispositif expérimental de plein champ, de l'ordre de l'année en début d'essai.

Enfin, nous ne nous sommes intéressés qu'à des effets aigus. Il n'est pas exclu que des effets chroniques à long terme puissent apparaître même avec le type de produits que nous avons testé et dont le re-largage progressif pourrait avoir des effets cumulatifs délétères. Par ailleurs, les stress liés à la présence de pesticides dans les sols s'ajoutent à d'autres stress physico-chimiques, de sorte que dans de prochaines études visant à évaluer la pertinence des marqueurs microbiens de la qualité des sols, des combinaisons de stress devraient être prises en compte. Ces études permettraient éventuellement de mettre en évidence des effets synergiques des différents stress sur la biodiversité fonctionnelle des communautés microbiennes telluriques assurant les services écosystémiques remplis par le sol.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols



Sol de la Montagne St Emilion (série 100, 200 et 300)
Sol d'Epoisses
Sol de Martincourt
Sol de Pau

Figure 1 Schéma présentant l'expérimentation mise en place dans les laboratoires de l'INRA de Dijon (pour le sol de la Montagne St Emilion trois traitements différents ont été considérés : série 100 travail du sol, série 200 enherbement et série 300 désherbage).

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Intervention	2008	2009
Prélèvement Sol "point zéro"	5 mars	15 mai
Apport Cocktail	13 juin	26 mai
Prélèvement Sol "T+3j"	16 juin	29 mai
Prélèvement Sol "T+30j"	15 juillet	

Tableau 0 : dates des différentes interventions au cours des 2 années d'expérimentations.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Tableau 1: Caractéristiques des gènes impliqués dans la dégradation des pesticides retenus dans l'étude et séquences des amorces utilisées pour le criblage par PCR

Gène cible	Nom amorces	Séquence amorce (5' -3')	Composé cible	Fonction	Référence
<i>atzA</i>	Couple 1 :		Atrazine	Atrazine chlorohydrolase	(de Souza et al., 1998)
	<i>atzA</i> ASoF	CCATGTGAACCAGATCCT			
	<i>atzA</i> ASoR	TGAAGCGTCCACATTACC			
	Couple 2 :				
<i>atzA</i> -A1 F	ACGGGCGTCAATTCTATGAC	(Devers et al., 2004)			
<i>atzA</i> -A1 R	CACCCACCTCACCATAGACC				
<i>atzB</i>	<i>atzB</i> - BSoF	TCACCGGGGATGTCGCGGGC	Atrazine	Hydroxyatrazine ethylaminohydrolase	(de Souza et al., 1998)
	<i>atzB</i> - BSoR	CTCTCCCGCATGGCATCGGG			
	<i>atzB</i> B1 R <i>atzB</i> B1 F	CACCACTGTGCTGTGGTAGA AGGGTGTGAGGTGGTGAAC			
<i>mpd</i>	<i>mpd</i> F	GAATTCATATGCCCTGAAGAAC	Organophosphorés (insecticides)	Methyl Parathion Hydrolase	(Cui et al., 2001)
	<i>mpd</i> R	GAATTCTCGAGCTTGGGGTTGACGACC G			
<i>catA</i>	<i>catA</i> F <i>catA</i> R	CCATTGAAGGGCCGCTCTATGT ACCGAARTTGATCTGCGTSGTCA	Isoproturon, chlorotoluron, diuron, fluometuron	catechol 1,2-dioxygenase	(Sun et al., 2009)
<i>tfdA</i>	GoF	AACGCAGCGRTRTRCCCA	2,4 D	2,4- Dichlorophenoxyacetate monooxygenase	(Vieuble-Gonod et al., 2006)
	GoR	ACGGAGTTCTGYGAYATG			
	HoF	ACGGAGTTCTGYGAYATG			(Hogan et al., 1997)
	HoR	AACGCAGCGRTRTRCCCA			
<i>ndoB</i>	Couple 1 :		hydrocarbures polyaromatiques	naphthalene 1,2- dioxygenase	(Bordenave et al., 2008)
	FRT5A	TYRARGCYAACTGGAA			
	FRT4B	GWHDYGYTYCCATRTTGTG			
	Couple 2 :				
	FRT6A	TACCACGTBGGTTGGAC			
FRT3B	CATGTCTTTTICKACVATGGC				

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Sol	t0			t30		
	Deltamétrine (mg.kg ⁻¹)	Fenhexamide (mg.kg ⁻¹)	Folpel (mg.kg ⁻¹)	Deltamétrine (mg.kg ⁻¹)	Fenhexamide (mg.kg ⁻¹)	Folpel (mg.kg ⁻¹)
Epoisses	n.d.	n.d.	0,21	n.d.	n.d.	n.d.
Martincourt	n.d.	n.d.	0,14	n.d.	n.d.	n. d.
Montagne St Emilion						
Série 100	n.d.	n.d.	0,05	n.d.	n.d.	n.d.
Série 200	n.d.	n.d.	0,07	n.d.	n.d.	n.d.
Série 300	n.d.	n.d.	0,07	n.d.	n.d.	n.d.
Pau	n.d.	n.d.	0,20	n.d.	n.d.	n.d.

Tableau 2. Résultats des analyses multi-résidus des sols d'Epoisses, Martincourt, Montagne St Emilion et Pau traités par le cocktail de pesticides (deltamétrine, folpel et fenhexamide) à t0 (avant traitement) et à t30 (après 30 jours de traitement). n.d. pour non détecté (limite de détection=absence de résidus à la limite de détection égale à la moitié de la limite de quantification précisée dans la colonne LQ=0,01 mg.kg⁻¹ sol).

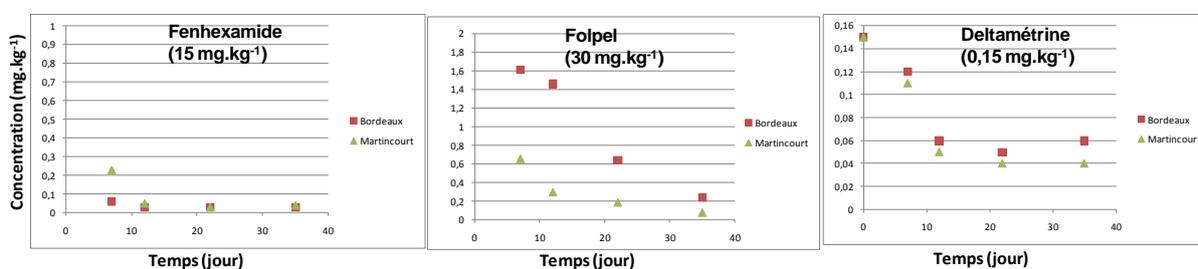


Figure 2 : Dosage du fenhexamide, du folpel et de la deltamétrine dans les sols de Bordeaux et de Martincourt. Ces sols ont été traités à 20 fois la dose agronomique avec le fenhexamide à 15 mg/kg de sol, le folpel à 30 mg/kg et la deltamétrine à 0.15 mg/kg.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

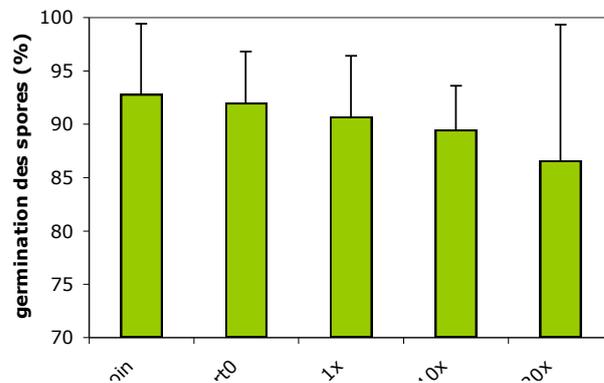


Figure 3 : Pourcentage de germination des spores de *Glomus mosseae* dans le sol témoin et le sol de Martincourt avec et sans apport de pesticides

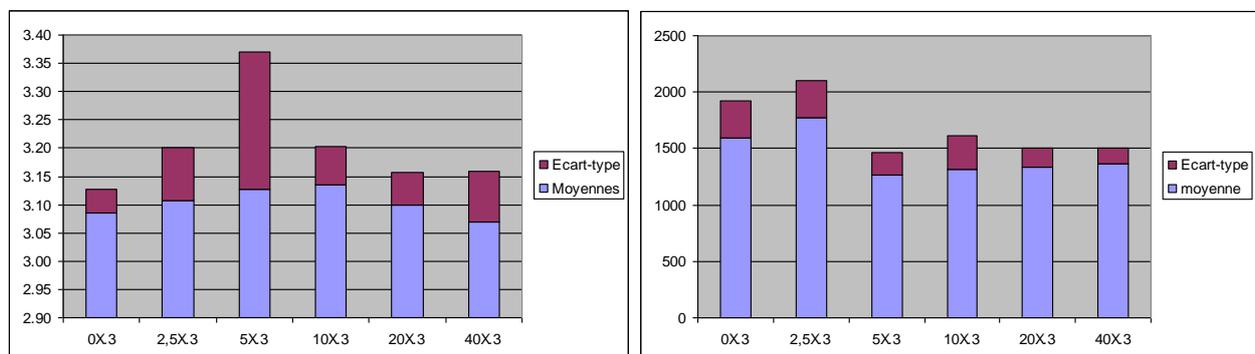


Figure 4 : Distances généralisées (diagramme de droite) et indices de Shannon (diagramme de gauche) pour les échantillons de sol traités à différentes doses de cocktail pesticides

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

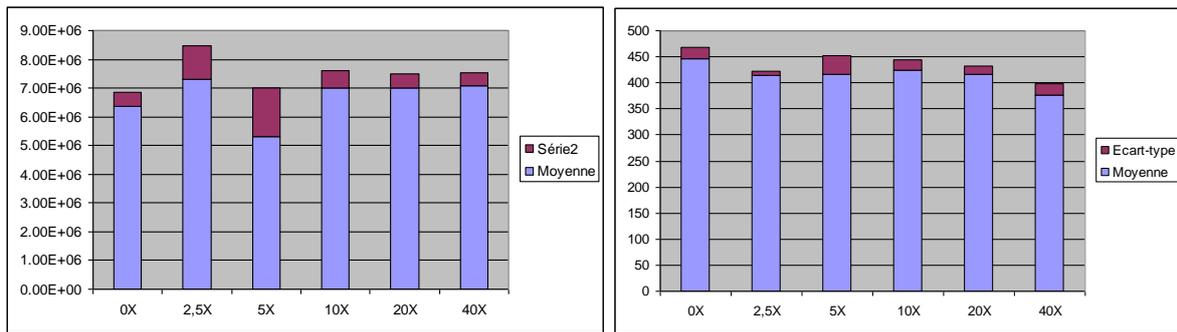


Figure 5 : Concentration en cellules bactériennes vivantes (diagramme gauche) et activité déshydrogénase (diagramme droit) pour les échantillons de sol traités à différentes doses de cocktail pesticides

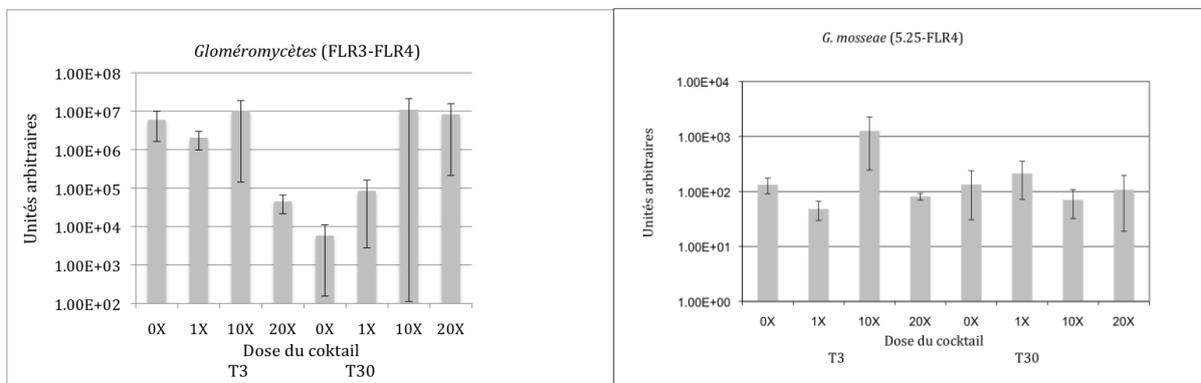


Figure 6. qPCR, sur le sol de Bordeaux avec différents doses de fenhexamide, folpel et de deltamétrine (1x, 10x et 20x). Les prélèvements ont été effectués 3j (T3) et 30 jours après

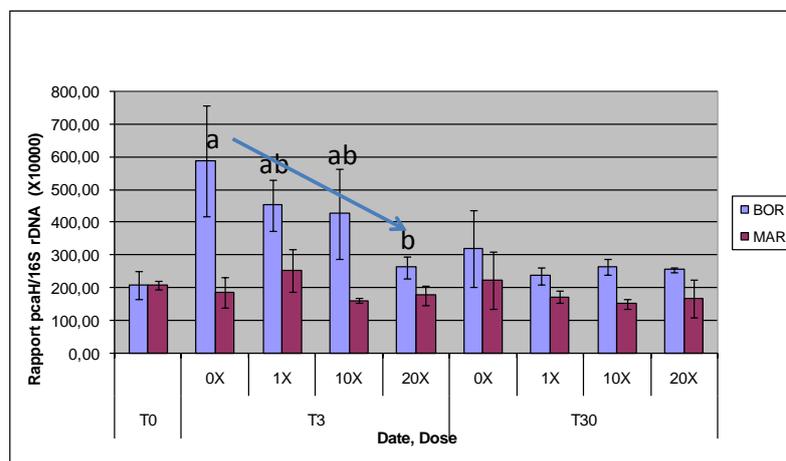


Figure 7 : Quantification de l'abondance spécifique de la communauté pcaH par rapport à la comDosage du fenhexamide, du folpel et de la deltamétrine dans les sols de Bordeaux et de Martincourt. Ces sols ont été traités à 20 fois la dose agronomique avec le fenhexamide à 15 mg/kg de sol, le folpel à 30 mg/kg et la deltamétrine à 0.15 mg/kg.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

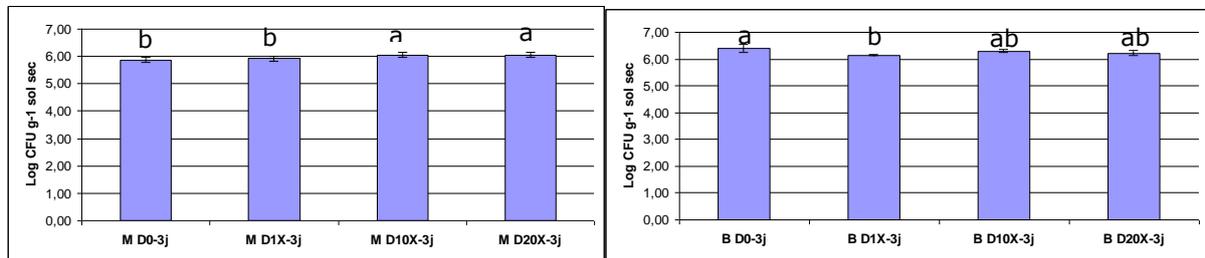


Figure 8 : Taille de la communauté bactérienne cultivable fonctionnelle. Effet des doses de pesticides, pour chaque sol (M : Martincourt, B : Bordeaux)

Les valeurs d'histogramme avec la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keuls)

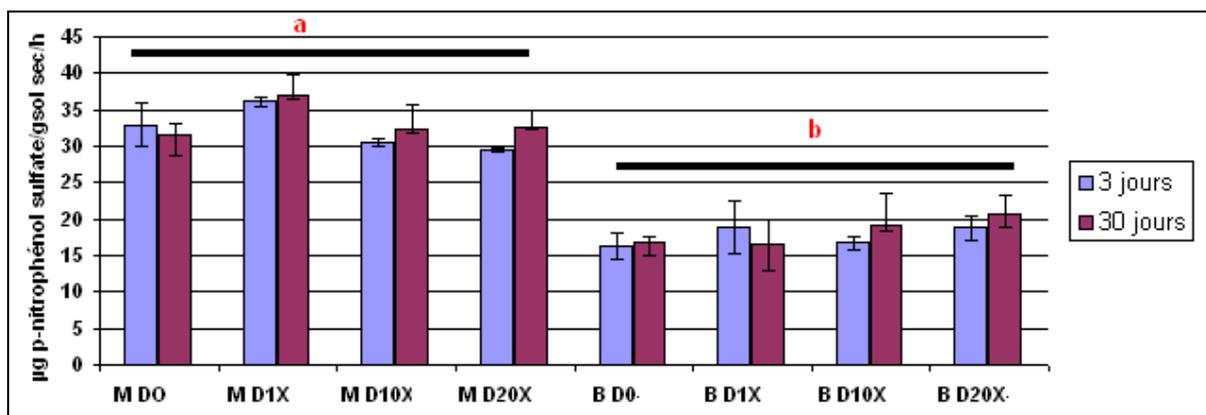


Figure 9 : Activité ARS suivant les différents sols et les doses du mélange de produits phytosanitaires apportées (M : Martincourt, B : Bordeaux) après 3 et 30 jours d'incubation

Les valeurs d'histogramme avec la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keuls)

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

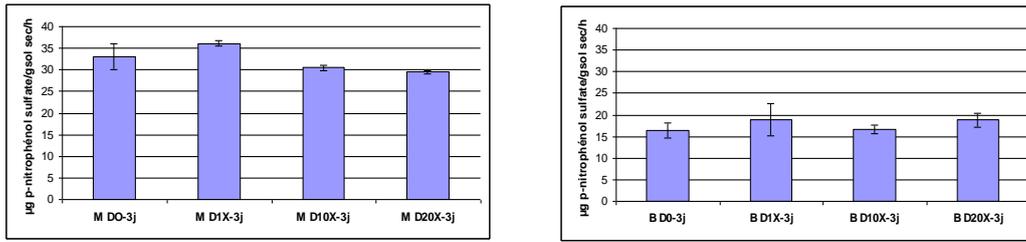


Figure 10 : Activité ARS suivant les doses du mélange de produits phytosanitaires apportées, pour chaque sol (M : Martincourt, B : Bordeaux) après 3 jours d'incubation

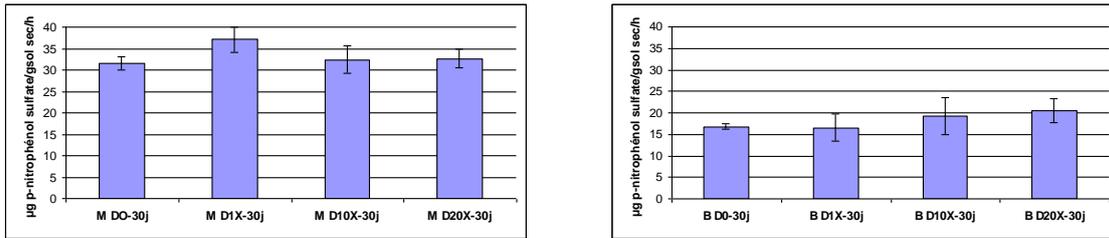


Figure 11 : Activité ARS suivant les doses du mélange de produits phytosanitaires apportées, pour chaque sol (M : Martincourt, B : Bordeaux) après 30 jours d'incubation

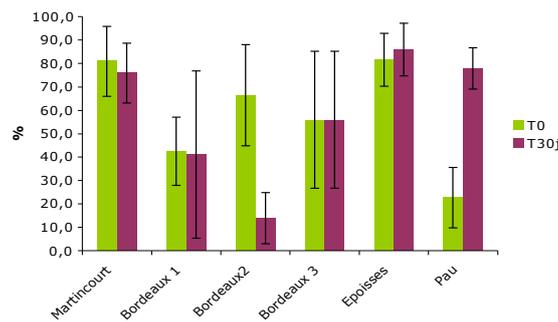


Figure 12 : Pourcentage de germination des spores de *Glomus mosseae* dans les sols à T0 et après 30 jours (T30j). Moyenne et écart-type (n=4).

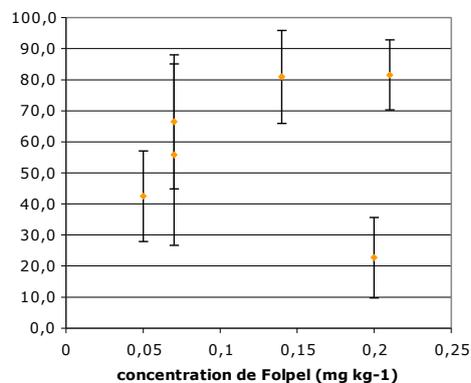


Figure 13: Pourcentage de germination des spores de *Glomus mosseae* dans les différents sols prélevés à T0 en fonction de la concentration en Folpel.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

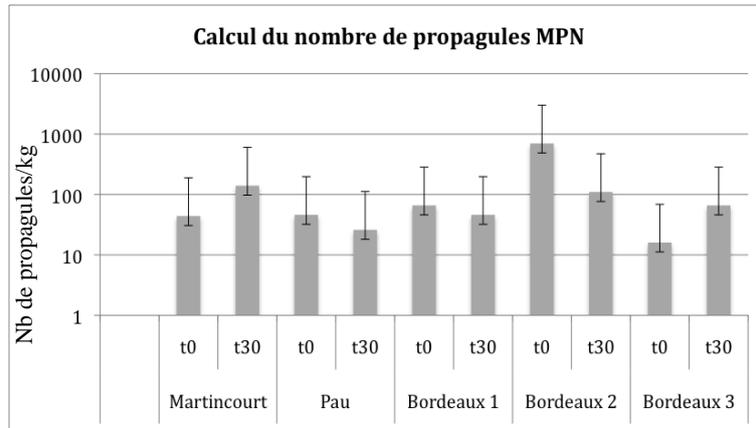


Figure 14. Calcul du nombre de propagules dans les différents sols et en fonction du temps. T0 : juste après l'application du cocktail de produits phytosanitaires ; T30 : 30j après application. Bordeaux 1 (désherbage mécanique), bordeaux 2 (enherbement) et Bordeaux 3 (désherbage chimique).

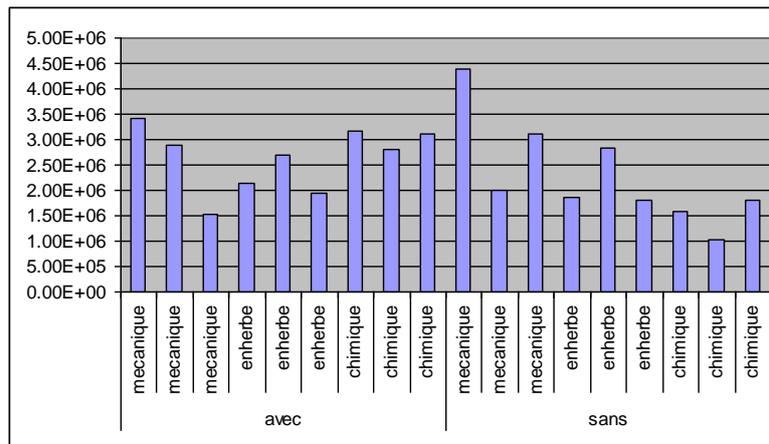


Figure 15 : Taille de la communauté bactérienne vivante des sols traités au laboratoire correspondant aux trois techniques de conduite de désherbage 30 jours après apport des pesticides

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

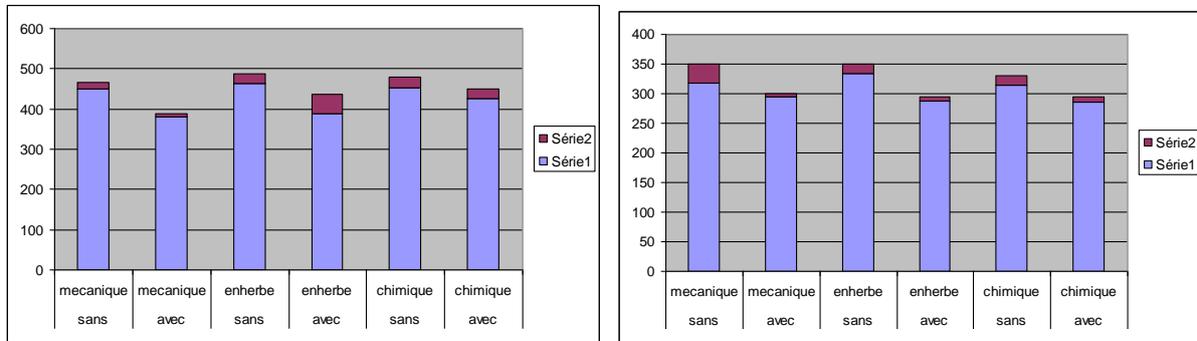


Figure 16 : Mesure de l'activité déshydrogénase dans les sols de Bordeaux issus des mésocosmes 3 jours (diagramme de gauche) et 30 jours après traitement (diagramme de droite).

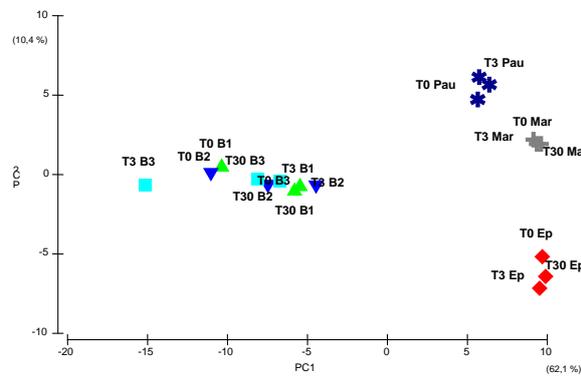


Figure 17 : Suivi de l'effet des traitements au cours du temps sur la structure des communautés bactériennes des 6 sols de l'expérimentation basé sur une analyse en composantes principales des profils T-RFLP des gènes de l'ADNr 16S.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

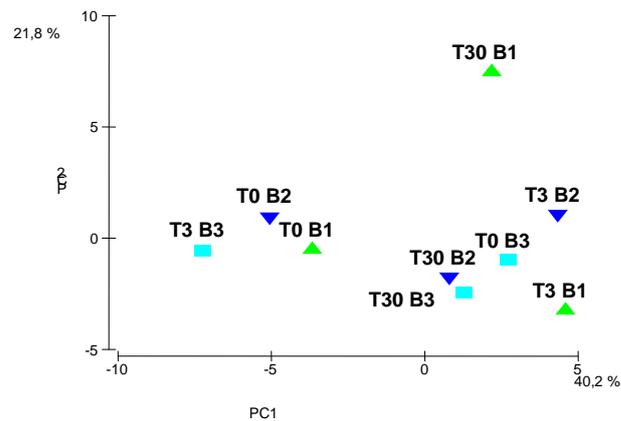


Figure 18 : Suivi de l'effet des traitements au cours du temps sur la structure des communautés bactériennes du sol de Bordeaux. Analyse en composantes principales des profils T-RFLP des gènes de l'*ADNr 16S* pour le sol de Bordeaux prélevé sur 3 parcelles différant par les pratiques de désherbage (B1: parcelle désherbée mécaniquement, B2: parcelle enherbée, B3, parcelle désherbée chimiquement avec du glyphosate).

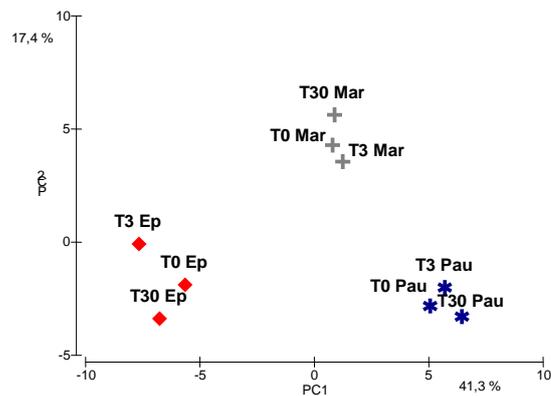


Figure 19 : Suivi de l'effet des traitements au cours du temps sur la structure des communautés bactériennes des sols d'Epoisses, Martincourt et Pau basé sur une analyse en composantes principales des profils T-RFLP des gènes de l'*ADNr 16S*

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

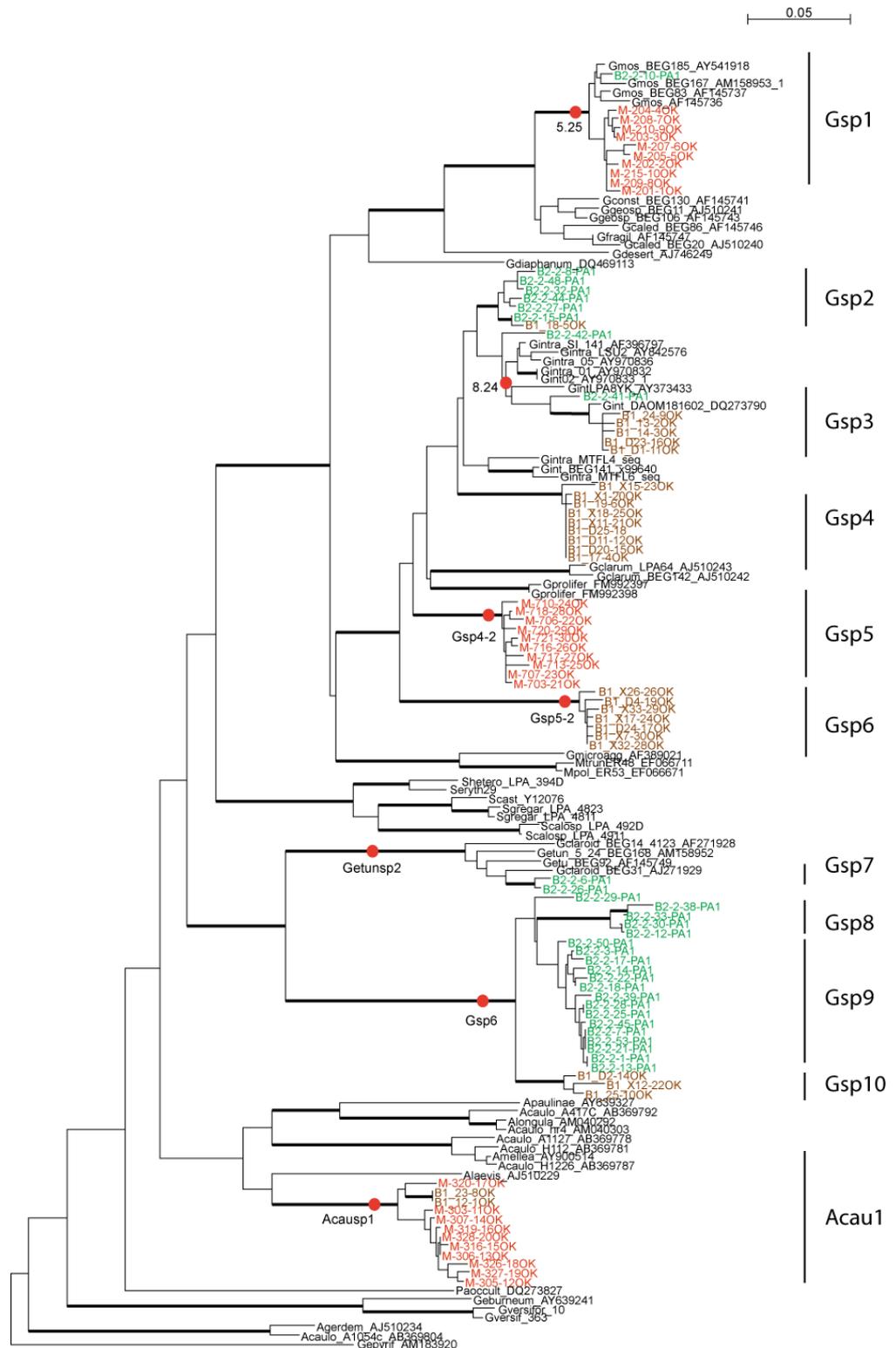


Figure 20 : Analyse phylogénétique des séquences obtenues des sols de Bordeaux 1 (brun), Bordeaux 2 (vert) et Martincourt (rouge). Les séquences en noir sont celles des bases de données publiques. Les branches en gras, ont une valeur de bootstraap $\geq 95\%$. Les pastilles rouges schématisent la position des amorces taxons spécifiques utilisés.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

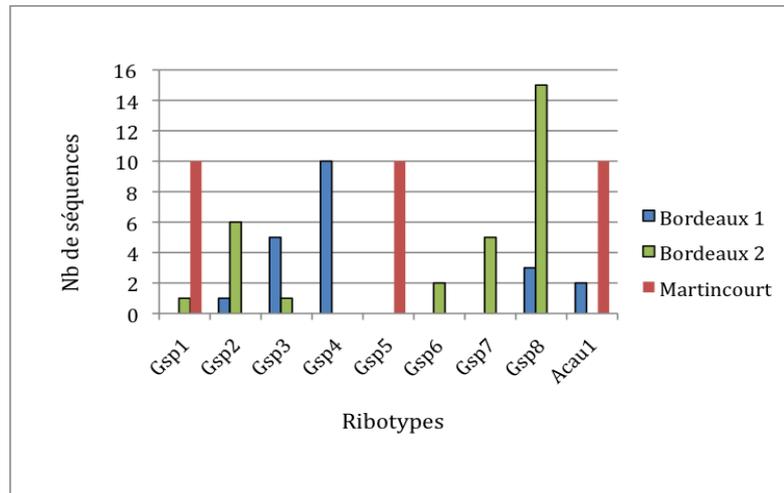


Figure 21 : Distributions des différents ribotypes fongiques dans les sols de Bordeaux 1 (désherbage mécanique), Bordeaux 2 (enherbement) et Martincourt

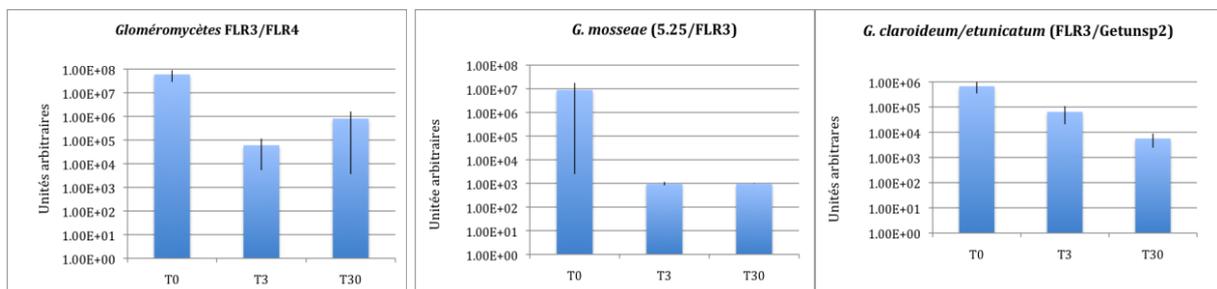


Figure 22 : qPCR, sur les sols de Martincourt avant l'apport du cocktail de pesticides (T0) et 3 (T3) et 30 jours après (T30). Les unités sont arbitraires. Les barres erreurs représentent l'erreur standard.

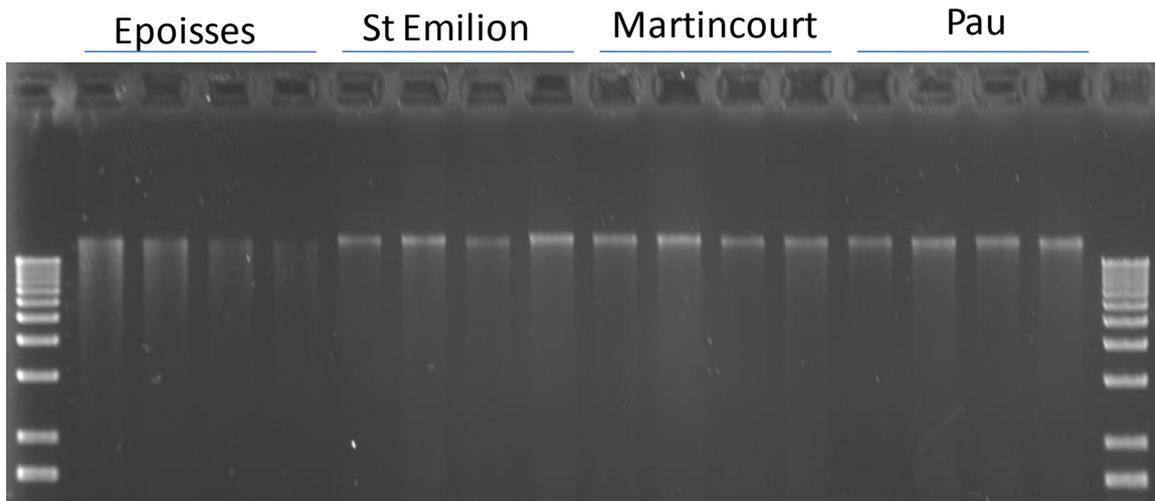


Fig. 2 Analyse électrophorétique de la qualité de l'ADN extrait des sols d'Epoisses, St Emilion, Martincourt et Pau selon le mode opératoire décrit par Martin-Laurent et al. 2001 en cours de normalisation auprès de l'ISO et de l'AFNOR.

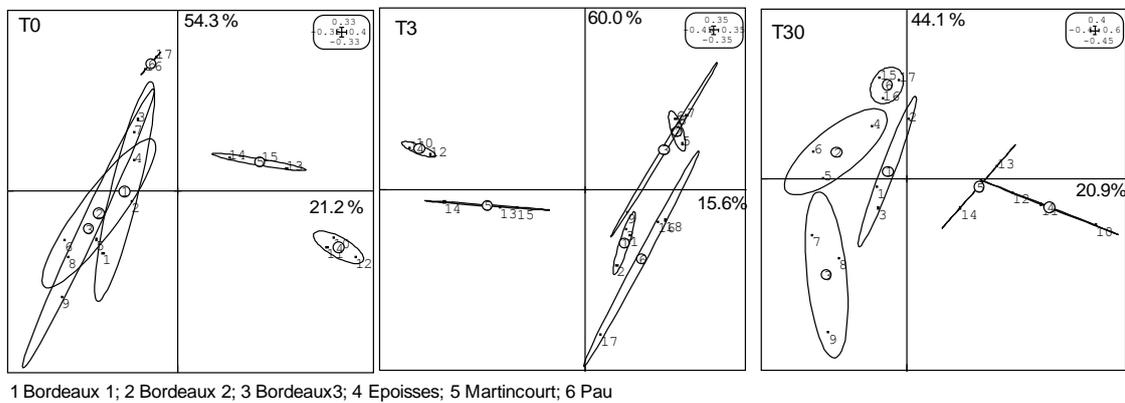


Figure 24. Analyse de la structure de la communauté *pcaH* observée dans les sols de Bordeaux, Epoisses, Martincourt et Pau à t0 (avant l'ajout du cocktail) et après 3 et 30 jours d'incubation suite à l'apport du cocktail de pesticides constitué de Teldor, Decis et Acryptan.

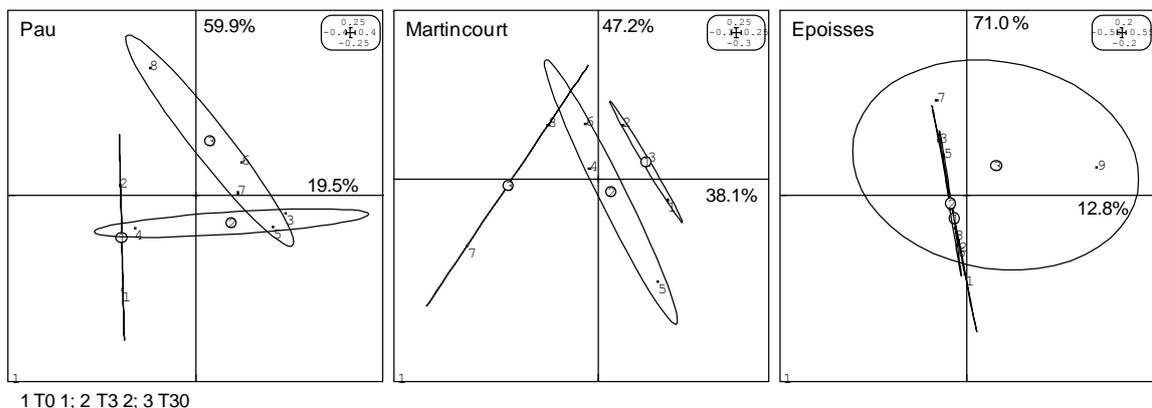


Figure 25. Analyse de la structure de la communauté *pcaH* observée dans les sols de Pau, Martincourt et Epoisses à t0 (avant l'ajout du cocktail), T3 et T30 suite à l'apport du cocktail de pesticides constitué de Teldor, Decis et Acryptan.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

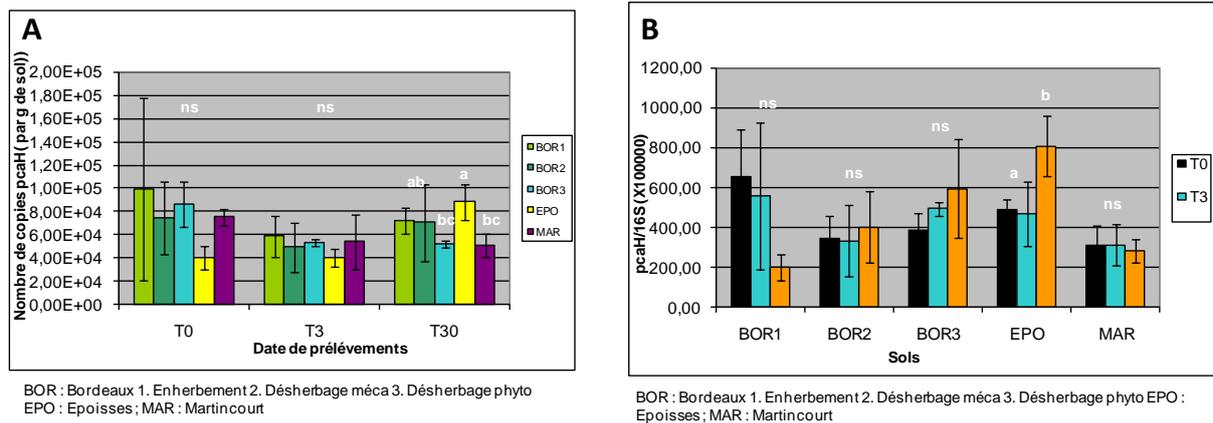


Figure 26 Panel A. Analyse de l'abondance de la communauté *pcaH* observée dans les sols de Bordeaux, Epoisses et Martincourt à t0 (avant l'ajout du cocktail), T3 et T30 suite à l'apport du cocktail de pesticides constitué de Teldor, Decis et Acryptan. Panel B Analyse de l'abondance relative de la communauté *pcaH* par rapport à la communauté bactérienne globale (ADNr 16S) observée dans les sols de Bordeaux (désherbage mécanique (Bordeaux 1) enherbement (Bordeaux 2), et désherbage chimique (Bordeaux3)), Epoisses et Martincourt.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

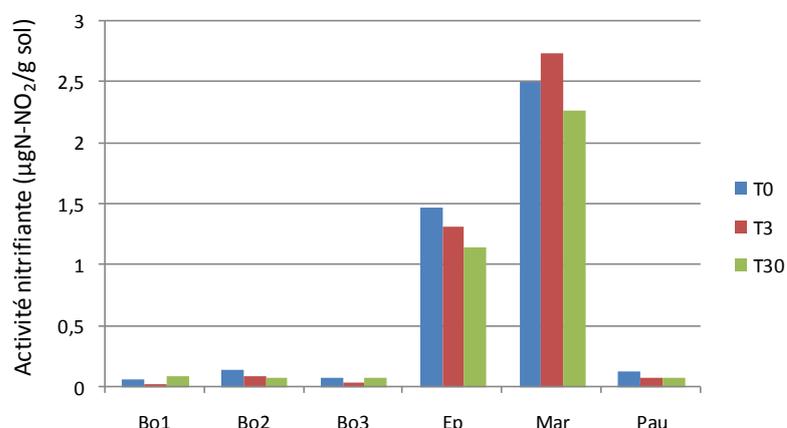


Figure 27 : Analyse de l'activité nitrifiante mesurée dans les sols de Bordeaux [Bo1 désherbage mécanique; Bo2 enherbement; Bo3 désherbage chimique], Epoisses [Ep], Martincourt [Mar] et Pau [Pau] à t0 (avant l'ajout du cocktail), T3 et T30 suite à l'apport du cocktail de pesticides constitué de Teldor, Decis et Acryptan.

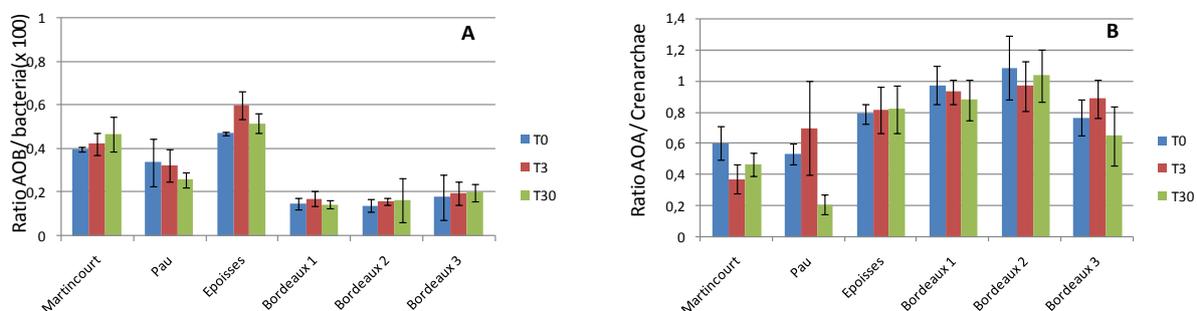


Figure 28 : *Panel A*. Analyse de l'abondance relative de la communauté *amoA* bactérienne observée dans les sols de Martincourt, Pau, Epoisses et Bordeaux (désherbage mécanique (bordeaux 1) enherbement (bordeaux 2), et désherbage chimique (bordeaux3)) à t0 (avant l'ajout du cocktail), T3 et T30 suite à l'apport du cocktail de pesticides constitué de Teldor, Decis et Acryptan. *Panel B*. Analyse de l'abondance relative de la communauté *amoA* crenarchaeae bactérienne observée dans les sols de Martincourt, Pau, Epoisses et Bordeaux.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

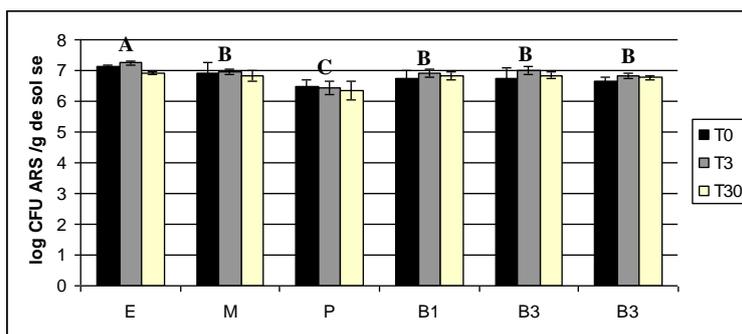


Figure 29: Taille de la communauté bactérienne cultivable fonctionnelle suivant les différents sols et traitement et au cours du temps

(E : Epoisses, M : Martincourt, P : Pau, B1 : Bordeaux - désherbage mécanique, B2 : Bordeaux - enherbement, B3 : Bordeaux - désherbage chimique)

Les valeurs d'histogramme avec la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keuls). Les lettres ne concernent que la taille qui est différente uniquement entre les différents sols ; il n'y a pas de différence de taille entre les différents temps pour chaque sol.

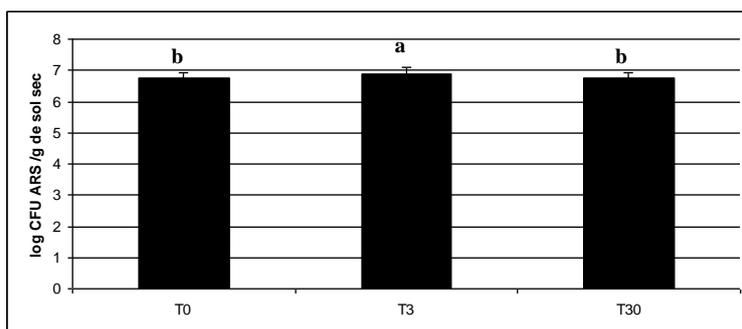


Figure 30 : Taille de la communauté bactérienne cultivable fonctionnelle au cours du temps, tous sols confondus

Les valeurs d'histogramme avec la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keuls)

Tableau 3 : Bilan des amplifications de gènes impliqués dans la dégradation de xénobiotiques dans le sol de Bordeaux.

Cible	PCR directe	PCR nichée	Conformité
<i>AtzA</i>	-	+	+
<i>AtzB</i>	-	+	Non éprouvée
<i>mpd</i>	-	-	/
<i>Cat</i>	-	+ (multibandes)	-
<i>TfdA</i> (Go et Ho)	-	-	/
<i>ndoB</i>	-	+	+

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

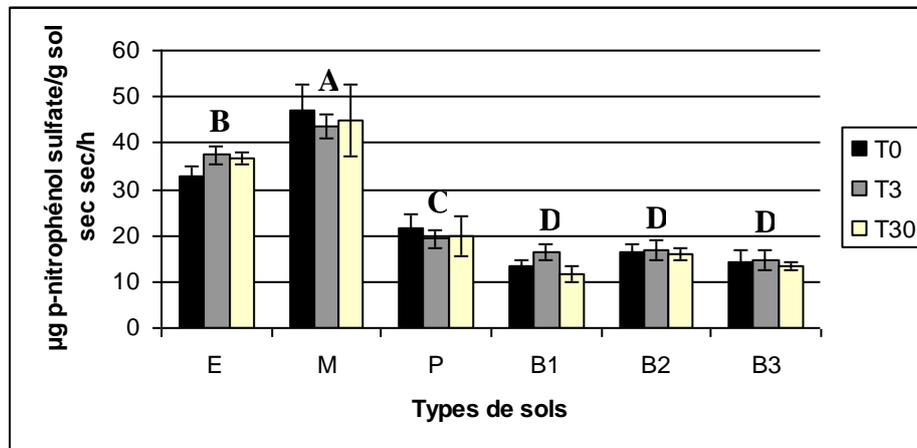


Figure 31 : Activité ARS suivant les différents sols et traitement et en fonction du temps

(E : Epoisses, M : Martincourt, P : Pau, B1 : Bordeaux - désherbage mécanique, B2 : Bordeaux - enherbement, B3 : Bordeaux - désherbage chimique)

Les valeurs d'histogramme avec la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keuls)

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

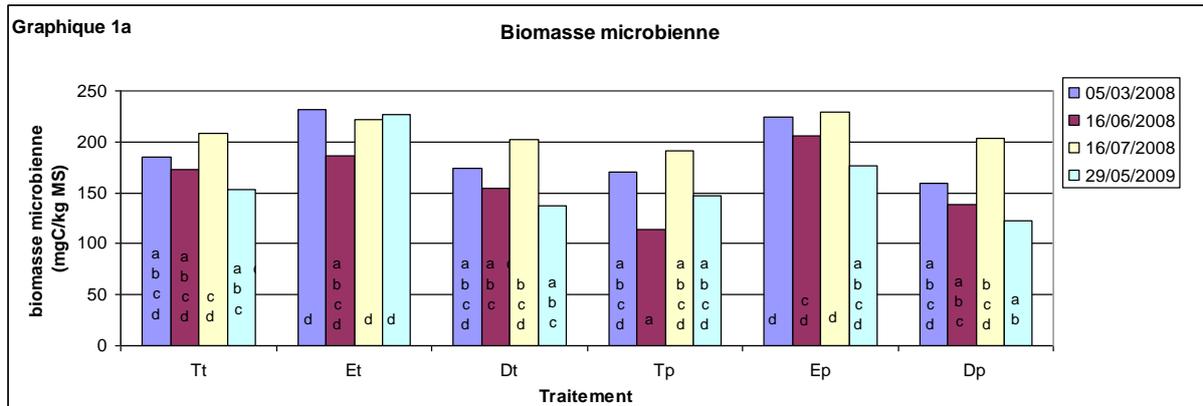


Figure 32 : Quantité de biomasse microbienne présente à chaque temps de prélèvement dans le sol de la parcelle viticole de Montagne Saint Emilion, en fonction des différentes modalités d'entretien des sols (T : travaillé, E : enherbé, D : désherbé) et du traitement appliqué (t : témoin sans pesticides, p : mélange de pesticides).

Les valeurs d'histogramme avec la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman et Keuls).

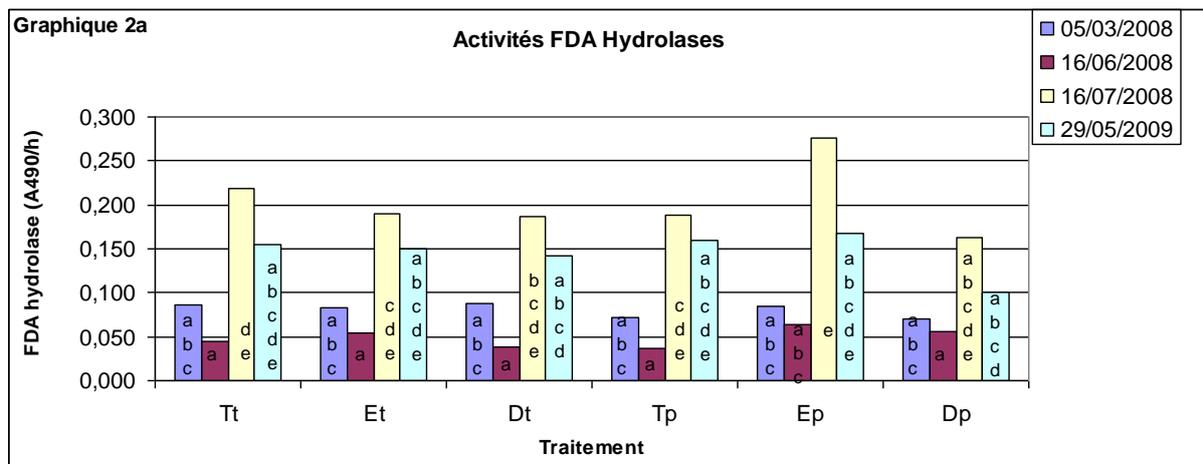


Figure 33 : Mesure des activités FDA Hydrolases des prélèvements de sol de la parcelle viticole de Montagne Saint Emilion, à chaque temps et en fonction des différentes modalités d'entretien des sols (T : travaillé, E : enherbé, D : désherbé) et du traitement appliqué (t : témoin sans pesticides, p : mélange de pesticides).

Les valeurs d'histogramme avec la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman et Keuls).

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

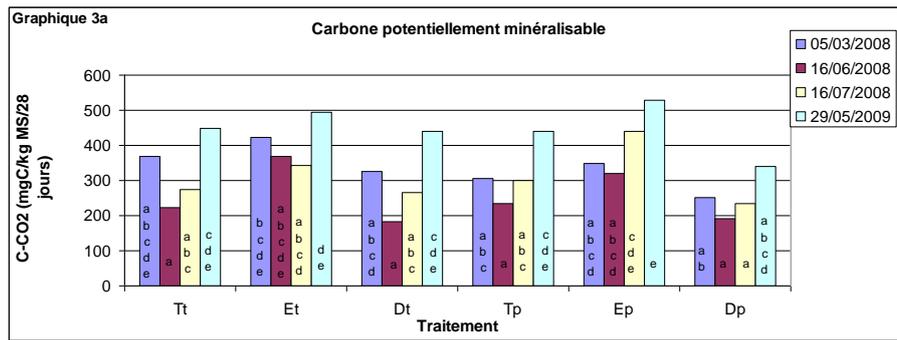


Figure 34 : Mesure des activités respiratoires des prélèvements de sol de la parcelle viticole de Montagne Saint Emilion, à chaque temps et en fonction des différentes modalités d'entretien des sols (T : travaillé, E : enherbé, D : désherbé) et du traitement appliqué (t : témoin sans pesticides, p : mélange de pesticides).

Les valeurs d'histogramme avec la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman et Keuls).

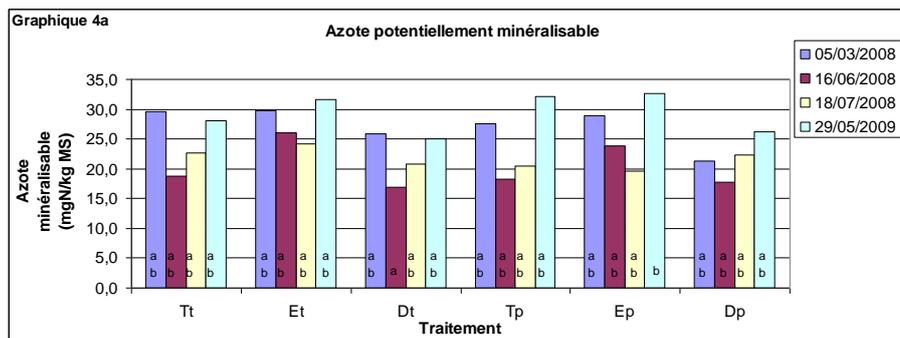


Figure 35 : Mesure des activités de minéralisation de l'azote des prélèvements de sol de la parcelle viticole de Montagne Saint Emilion, à chaque temps et en fonction des différentes modalités d'entretien des sols (T : travaillé, E : enherbé, D : désherbé) et du traitement appliqué (t : témoin sans pesticides, p : mélange de pesticides).

Les valeurs d'histogramme avec la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman et Keuls).

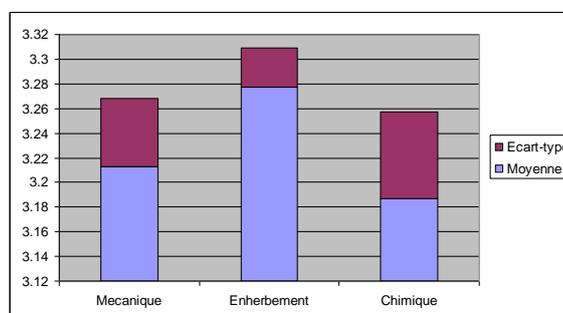


Figure 36 : Indices de Shannon pour les parcelles du dispositif de Montagne correspondant aux trois techniques de conduite de désherbage. Avant traitement.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

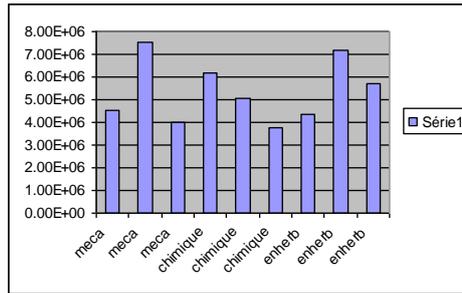


Figure 37: Taille de la communauté bactérienne vivante des sols des parcelles du dispositif de Montagne correspondant aux trois techniques de conduite de désherbage. Avant traitement.

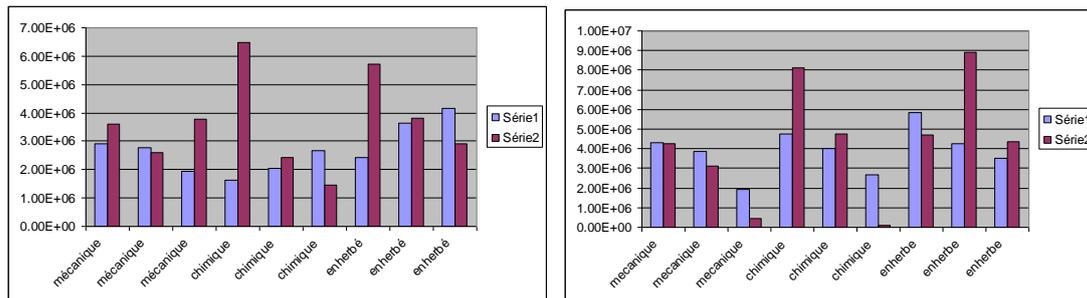


Figure 38 : Taille de la communauté bactérienne vivante des sols des parcelles du dispositif de Montagne correspondant aux trois techniques de conduite de désherbage avec (bleu) ou sans (violet) 3 jours (gauche) et 30 jours (droite) après apport des pesticides

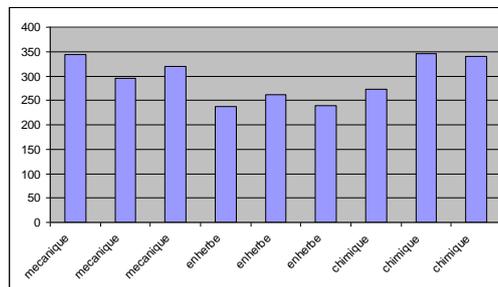


Figure 39 : Détermination de l'activité déshydrogénase déduite des temps critiques obtenus avec les échantillons de sol prélevés avant apport des pesticides sur les parcelles du dispositif de plein champ de Montagne

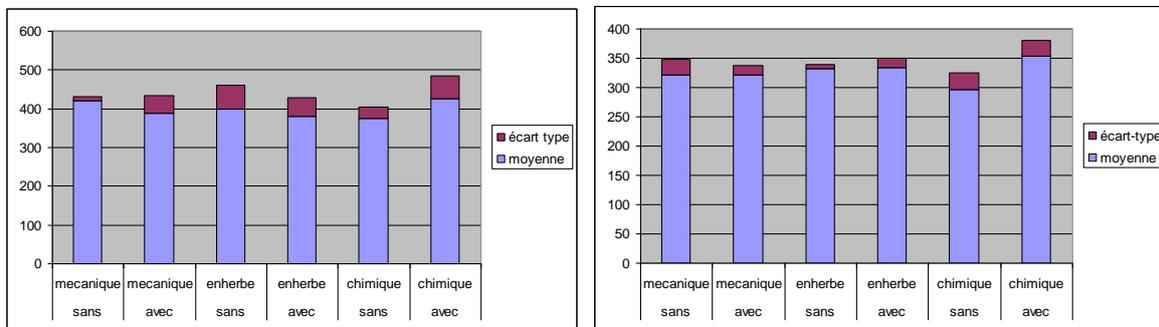


Figure 40 : Comparaison des activités déshydrogénase déduites des temps critiques obtenus avec les échantillons de sol prélevés 3 jours (diagramme de gauche) ou 30 jours (diagramme de droite) après apport des pesticides sur les parcelles traitées et non traitées du dispositif de plein champ de Montagne

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

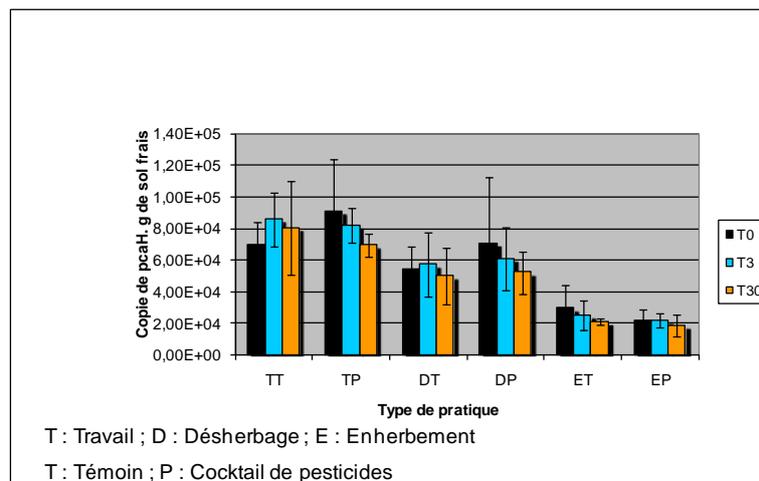


Figure 41 Quantification de l'abondance de la communauté *pca* dans les sols viticoles soumis à différentes pratiques culturales (désherbage mécanique T, désherbage chimique D et enherbement E) et traités avec un cocktail de pesticides (P) ou non (T).

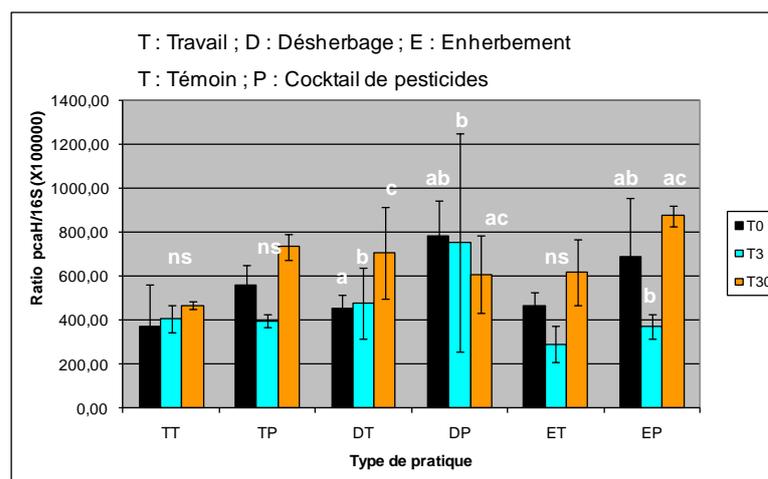


Figure 42 Quantification de l'abondance spécifique de la communauté *pca* (ratio *pcaH*/ADNr 16S x 100 000) dans les sols viticoles soumis à différentes pratiques culturales (désherbage mécanique T, désherbage chimique D et enherbement E) et traités avec un cocktail de différents pesticides

Bibliographie

- ABD-ALLA MH, Omar SH, Karanxha S., 2000. The impact of pesticides on arbuscular mycorrhizal and nitrogen-fixing symbioses in legumes. *Applied Soil Ecology*, 14, 191-200.
- ANDERSON C., BRUMHARD B., DITGENS K., REINER H. (1999) Métabolisme du fenhexamid (KBR 2738) dans les plantes, les animaux et l'environnement. Document Bayer CropScience
- ANDERSON T.-H. 2003. "Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality." *Agriculture, Ecosystems & Environment* 98(1-3): 285-293.
- AVANISS-AGHAJANI E., JONES K., CHAPMAN D. ET BRUNK C., (1994) A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences. *BioTechniques*, 17, 144-149.
- BANDICK A.K., DICK R.P. (1999) Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology & Biochemistry*. 31:1471-1479.
- BANERJEE M.R. ET CHAPMAN S.J. (1996) The significance of microbial biomass sulphur in soil. *Biol Fertil Soils* 22: 116-125.
- BENDING, G.D., M.K. TURNER, F. RAYNS, M.-C. MARX, AND M. WOOD. 2004. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1785-1792.
- BETTANY J.R., STEWART J.W.B. (1983) Sulphur cycling in soils. *In: Proceedings International Sulphur's 82 Conference*. Ed A. More, 767-785. British Corporation, London.
- BORDENAVE, S., GOÑI-URRIZA, M., VILETTE, C., BLANCHARD, S., CAUMETTE, P., AND DURAN, R. (2008). Diversity of ring-hydroxylating dioxygenases in pristine and oil contaminated microbial mats at genomic and transcriptomic levels. *Environ. Microbiol.* 10, 3201-3211.
- BROMILOW R. H., EVANS A. A., NICHOLLS P. H., TODD A. D., AND BRIGGS G. G., (1996) The effect on soil fertility of repeated applications of pesticides over 20 years. *Pestic. Sci.* 48:63-72.
- CAMPAGNAC E, FONTAINE J, LOUNES-HADJ SAHRAOUI A, LARUELLE F, DURAND R, GRANDMOUGIN-FERJANI A, 2008, Differential effects of fenpropimorph and fenhexamid, two sterol biosynthesis inhibitor fungicides, on arbuscular mycorrhizal development and sterol metabolism in carrot roots. *Phytochemistry*, 69, 2912-2919.
- CATROUX, G., CHAUSSOD R. ET NICOLARDOT B. – 1987 – Appréciation de la fourniture d'azote par le sol – C.R. Acad. Agric. Fr. – 73(3) : 71-79
- CAUX P. Y., KENT R. A., FAN G. T., AND GRANDE C., (1998) Canadian water quality guideline for linuron. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13:1-41.
- CHAUSSOD R., BREUIL M.C., NOUAIM R., LEVEQUE J., ANDREUX F. – 1999 – La fertilité des sols viticoles : les indicateurs microbiologiques – In 12^{ème} colloque Viticole et Œnologique, Cahier Technique 1999, ITV France, Paris, p 15-22
- CRECCHIO, C., A. GELSOMINO, R. AMBROSOLI, J.L. MINATI, AND P. RUGGIERO. 2004. Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1873-1883.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

CREGUT M., PIUTTI S., SLEZACK-DESCHAUMES S., VONG P.C., CROVISIER I., BENIZRI E. (2009) Density, structure and diversity of the arylsulfatase bacterial community in the rhizosphere of field-grown rape and barley. *Soil Biology & Biochemistry*: 41, 704-710.

CUI, Z., LI, S., AND FU, G. (2001). Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methylparathion hydrolase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4922-4925.

CULLINGTON, J.E., AND WALKER, A. (1999). Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 677-686.

DAVET P. (1996). Vie microbienne des sols et production végétale. INRA Editions, 383 pp.

DE LA PAZ JIMENEZ M., DE LA HORA A.M., PRUZZO L., PALMA R.M. (2002) Soil quality : a new index based on microbiological and biochemical parameters. *Biology Fertility Soils.* 35 :302-306.

DEBOURGE O. (2003) Impact de l'effet rhizosphère du colza et de l'orge sur la dynamique du soufre dans le sol. Doctorat INPL.

DE SOUZA, M., WACKETT, L., BOUNDY-MILLS, K., MANDELBAUM, R., AND SADOWSKY, M. (1995). Cloning, characterization, and expression of a gene region from *Pseudomonas* sp. strain ADP involved in the dechlorination of atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3373-3378.

DE SOUZA, M.L., SEFFERNICK, J., MARTINEZ, B., SADOWSKY, M.J., AND WACKETT, L.P. (1998). The Atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *J. Bacteriol.* 180, 1951-1954.

DENG S.P. ET TABATABAI M.A., (1997) Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils :III : phosphatases and arylsulfatase. *Biology Fertility of Soils* 24: 141-146.

DEVERS, M., SOULAS, G., AND MARTIN-LAURENT, F. (2004). Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *J. Microbiol. Methods* 56, 3-15.

DICK R. P., (1994) Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In "Defining Soil Quality for a Sustainable Environment". Doran J. W., Coleman D. C., Bezdicek D. F., Stewart B. A. eds; pp 107-124. Soil Scienc Society of America special publication, N° 35; American Society of Agronomy, Inc; Madison, Wisconsin USA.

DOMSCH K. H., JAGNOV G., ANDERSON K. H., (1983) An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganismes. *Residue Review* 86, 65-105.

EL AZHARI N., CHABAUD S., BRU D. AND MARTIN-LAURENT F. (2007) *pcaH* a molecular marker for estimating the diversity of the protocatechuate-degrading bacterial community in soil environment. *Pest Management Science.*63: 459-467.

EL AZHARI, N; BRU, D; SARR, A, MARTIN-LAURENT F. 2008l. Estimation of the density of the protocatechuate-degrading bacterial community in soil by real-time PCR. *European Journal of Soil Science* 59: 665-673

EL FANTROUSSI, S., L. VERSCHUERE, W. VERSTRAETE, AND E.M. TOP. 1999. Effect of Phenylurea Herbicides on Soil Microbial Communities Estimated by Analysis of 16S rRNA Gene Fingerprints and Community-Level Physiological Profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:982-988.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

ELLIS R.J., MORGAN P., WEIGHTMAN A. AND FRY J.C., (2003) Cultivation-dependent and independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3223 - 3230.

FITZGERALD J.W., MIZALLO, F.H. (1970) Arylsulfatase multiplicity in *Proteus rettgeri*. *Canadian Journal of Microbiology*: 16, 1109-1115.

GARLAND, J.L., AND A.L. MILLS. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57:2351-2359.

GIANINAZZI S., PLUMEY-JACQUOT E., GIANINAZZI-PEARSON V., LEYVAL C., 2005. Contribution of arbuscular mycorrhiza to soil quality and terrestrial ecotoxicology. In: *Microbiological Methodes for Assessing Soil Quality* Bloem J., Hopkins D.W., Benedetti A. (eds). CABI Publishing, Wallingford, UK, 248-256.

GRIFFITHS, B., S. CAUL, J. THOMPSON, C. HACKETT, J. CORTET, C. PERNIN, AND P. KROGH. 2008. Soil microbial and faunal responses to herbicide tolerant maize and herbicide in two soils. *Plant and Soil* 308:93-103.

HOGAN, D.A., BUCKLEY, D.H., NAKATSU, C.H., AND SCHMIDT, T.M. (1997). Distribution of the *tfdA* gene in soil bacteria that do not degrade 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Microb. Ecol.* 34, 90-96. KAPUTSKA L. A., (1999) Microbial endpoints: the rationale for their exclusion as ecological assessment endpoints. *Human and Ecological Risk Assessment*, 5, 4, 691-696.

KAUFMANN, K., S.J. CHAPMAN, C.D. CAMPBELL, H. HARMS, AND P. HÖHENER. 2006. Miniaturized test system for soil respiration induced by volatile pollutants. *Environmental Pollution* 140:269-278.

KLOSE S., M.A. TABATABAI (1999) Arylsulfatase Activity of Microbial Biomass in Soils. In: *Soil Society American Journal*, 63: 569-574.

KLOSE S., MOORE J.M. ET TABATABAI M.A. (1999) Arylsulfatase activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. *Biology Fertility of Soils*. 29: 46-54.

LANE, D.J. (1991). rDNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, E. Stachenbrady, ed (Chichester: Wiley), pp. 115-175.

LENSI R., MAZURIER S., GOURBIÈRE F. AND JOSSERAND A. 1986. Rapid determination of the nitrification potential of an acid forest soil and assessment of its variability. *Soil Biology and Biochemistry* 2: 239-240.

LEYVAL C, SINGH B R, JONER E J. (1995). Occurrence and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in some Norwegian soils influenced by heavy metals and soil properties. *Water, Air, & Soil Pollution* 84, 203-216.

LI X., SARAH P. (2003) Arylsulfatase activity of soil microbial biomass along a Mediterranean-arid transect. *Soil Biology & Biochemistry*. 35: 925-934

LORS, C., B. LAGACHERIE, C. CHABANET, AND G. SOULAS. 2005. DNOC, a model pollutant, adversely affects the potential of soil microbial communities to mineralise the herbicide 2,4-D: an investigation using micro-sampling procedures. *Soil Biology and Biochemistry* 37:1023-1032.

MC GILL W.B. ET COLE C.V. (1981) Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma* 26: 267-286.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

- MARTIN-LAURENT F, PHILIPPOT L, HALLET S, CHAUSSOD R., GERMON J. C., SOULAS G. AND CATROUX G., (2001) DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied Environmental Microbiology* 67(5) : 2354-2359
- MOYER C. L., DOBBS F. C. AND KARL D. M., (1994) Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active hydrothermal vent system, Loihi Seamount Hawai. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2501-2507.
- MUYZER G., WAAL E. C., AND UITTERLINDEN A. G., (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695-700.
- NDIAYE E.L., SANDENO J.M., MCGRATH D., DICK R.P. (2000) Integrative biological indicators for detecting change in soil quality. *American Journal Altern Agric.* 15: 26-36.
- NORTCLIFF S., (2002). "Standardisation of soil quality attributes." *Agriculture, Ecosystems & Environment* 88(2): 161-168.
- OKANO Y., HRISTOVA H. R., LEUTENEGGER C. M., JACKSON L. E., DENISON R. F., GEBREYESUS B., LEBAUER D. AND SCOW K. M., (2004) Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1008-1016.
- PASCAUD, A., S. AMELLAL, M.-L. SOULAS, AND G. SOULAS. 2009. A fluorescence-based assay for measuring the viable cell concentration of mixed microbial communities in soil. *Journal of Microbiological Methods* 76:81-87.
- ROPER M.M., OPHEL-KELLER K.M., (1997) Soil Microflora as bioindicators of soil health. In : *Biological Indicators of Soil Health* (eds CE Pankhurst, BM Doube and VVSR Gupta), pp : 157-177.
- ROSSEL D. AND TARRADELLAS J., (1991) Significance of soil deshydrogenase activity in ecotoxicological studies. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 6, 17.
- ROUARD, N., M.-C. DICTOR, R. CHAUSSOD, AND G. SOULAS. 1996. Side-effects of herbicides on the size and activity of the soil microflora: DNOC as a test case. *European Journal of Soil Science* 47:557-566.
- SCHNÜRER J. AND T. ROSWALL - 1982 - Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter - *Appl. Env. Microb.* - 43: 1256-1261
- SCHWEIGER P, JAKOBSEN I, 1998, Dose-response relationships between four pesticides and phosphorus uptake by hyphae of arbuscular mycorrhizae. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 1415-1422.
- SHEPPARD S. C., (1999) Soil microbial bioassays: quick and relevant but are they useful ? *Human and Ecological Risk Assessment*, 5, 4, 697-705.
- SIEVERDING E. (1991). Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems. (Eschborn: Deutsch Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)).
- SMITH, C.J., DANILOWICZ, B.S., CLEAR, A.K., COSTELLO, F.J., WILSON, B., AND MEIJER, W.G. (2005). T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 375-380.
- STREBER, W.R., TIMMIS, K.N., AND ZENK, M.H. (1987). Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *J. Bacteriol.* 169, 2950-2955.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

SUN, J.-Q., HUANG, X., CHEN, Q.-L., LIANG, B., QIU, J.-G., ALI, S., AND LI, S.-P. (2009). Isolation and characterization of three *Sphingobium* sp. strains capable of degrading isoproturon and cloning of the catechol 1,2-dioxygenase gene from these strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 259-268.

SLEZACK-DESCHAUMES S., PIUTTI S., CROVISIER I., VONG P.C., BENIZRI E. (2009) Dynamics of cultivable arylsulfatase-producing bacterial and fungal communities along the phenology of field-grown rape. *Soil Biology & Biochemistry*, submitted.

TABATABAÏ M.A. (1984) Importance of sulphur in crop production. *Biogeochemistry* 1: 45-62

TABATABAÏ M.A., (1984) IMPORTANCE OF SULPHUR IN CROP PRODUCTION. *BIOGEOCHEMISTRY*. 1: 45-62

TABATABAI M.A., BREMNER J.M. (1970) Arylsulfatase activity in soils. *In: Soil Soc.Amer. Proc.* 34: 225-229.

TOPP, E., MULBRY, W.M., ZHU, H., NOUR, S.M., AND CUPPELS, D. (2000). Characterization of S-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioide* sp. isolated from agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3134-3141.

TORSVIK, V., DAAE, F.L., SANDAA, R.A., AND OVREAS, L. (1998). Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* 64, 53-62.

VIEUBLE-GONOD, L., MARTIN-LAURENT, F., AND CHENU, C. (2006). 2,4-D impact on bacterial communities, and the activity and genetic potential of 2,4-D degrading communities in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 529–537.

VON ALTEN H., LINDERMAN A, SCHONBECK F,1993, Stimulation of arbuscular mycorrhizae by fungicide or rhizosphere bacteria, *Mycorrhiza*, 2, 167-173.

VONG P.C., PIUTTI S., BENIZRI E., SLEZACK-DESCHAUMES S., ROBIN C., GUCKERT A. (2007) Water-soluble carbon in roots of rape and barley: impacts on labile soil organic carbon, arylsulfatase activity and sulphur mineralization. *Plant and Soil* 294: 19-29.

WEISSEHORN I, LEYVAL C. (1996). Spore germination of arbuscular mycorrhizal fungi in soils differing in heavy metal content and other parameters. *Eur. J. Soil Biol.* 32, 165-172.

ZOCCO D., FONTAINE J, LOZANOVA E., RENARD L., BIVORT C., DURAND R., GRANDMOUGIN-FERJANI A.,DECLERCK S., 2008, Effects of two sterol biosynthesis inhibitor fungicides (fenpropimorph and fenhexamid) on the development of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycological Research*, 112, 592-601.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Annexe 1 : Propriétés physicochimiques des sols utilisés

	Bordeaux 1	Bordeaux 2	Bordeaux 3	Epoisses	Martincourt	Pau
Argile (%)				43,2	43,2	
Limons (%)				50,3	23,7	
Sables (%)				6,5	33,1	
Humidité équivalente (g/100g)	16	15,4	15,1	27,7	31,7	28,2
Matières volatiles à 550°C (g/100g)	4,54	4,21	4,51	8,31	13,1	9,05
Carbone organique (g/kg)	14,5	13,5	13,9	23,1	31,5	30,9
Azote total (g/kg)	1,24	1,16	1,21	1,97	3,44	2,09
C/N	11,7	11,7	11,5	11,7	9,15	14,8
Matières organiques (g/kg)	25,1	23,4	24,1	39,9	54,4	53,4
pH	6,41	6,48	6,33	7,9	7,83	6,34
CEC Metson (cmol+/kg)	8,09	7,79	7,63	21,5	24,2	13,6
P ₂ O ₅ Olsen (g/kg)	0,093	0,084	0,073	0,193	0,265	0,147
Deltametrine (mg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fenhexamide (mg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Folpel (mg/kg)	0,05	0,07	0,07	0,21	0,14	0,20

Annexe2 : Dispositif de terrain de Montagne Saint Emilion

Bloc 1	Mécanique Témoin	Enherbt Cocktail	Chimique Témoin	Mécanique Cocktail	Chimique Cocktail	Enherbt Témoin
	101	102	103	104	105	106
Bloc 2	Mécanique Témoin	Enherbt Témoin	Chimique Cocktail	Enherbt Cocktail	Chimique Témoin	Mécanique Cocktail
	201	202	203	204	205	206
Bloc 3	Mécanique Cocktail	Chimique Cocktail	Enherbt Témoin	Mécanique Témoin	Enherbt Cocktail	Chimique Témoin
	301	302	303	304	305	306
"micro-placette" :	1	2	3	4	5	6

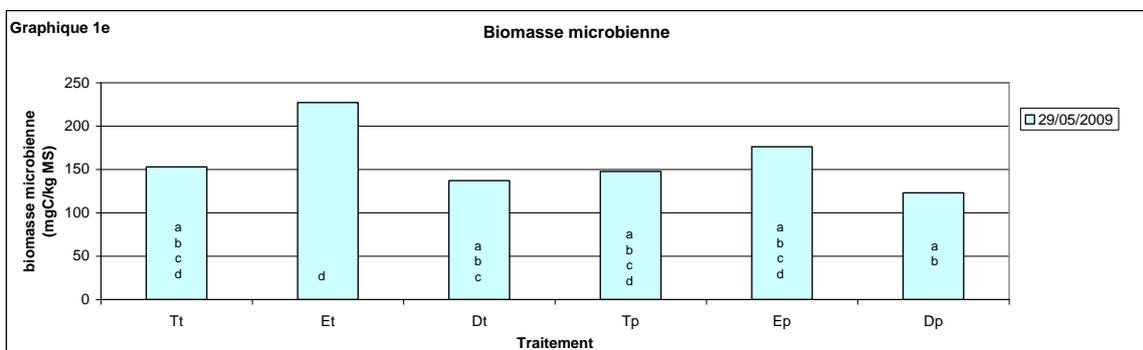
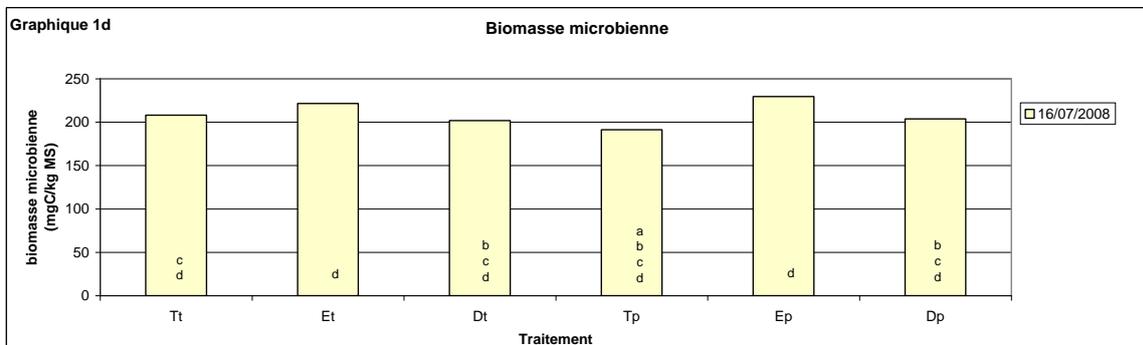
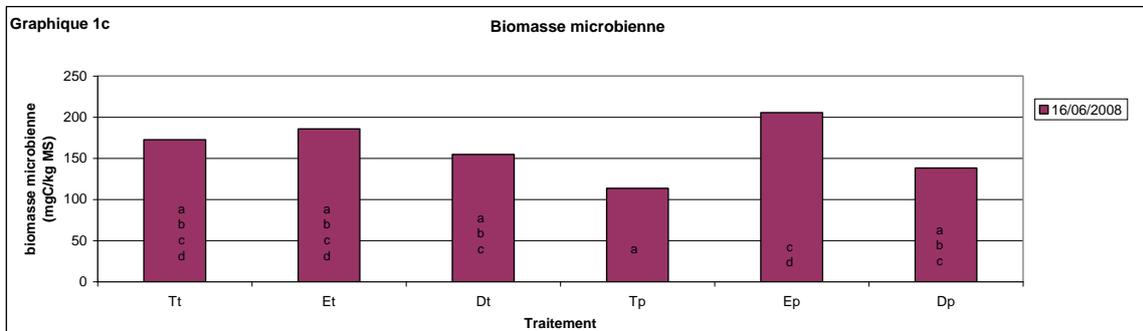
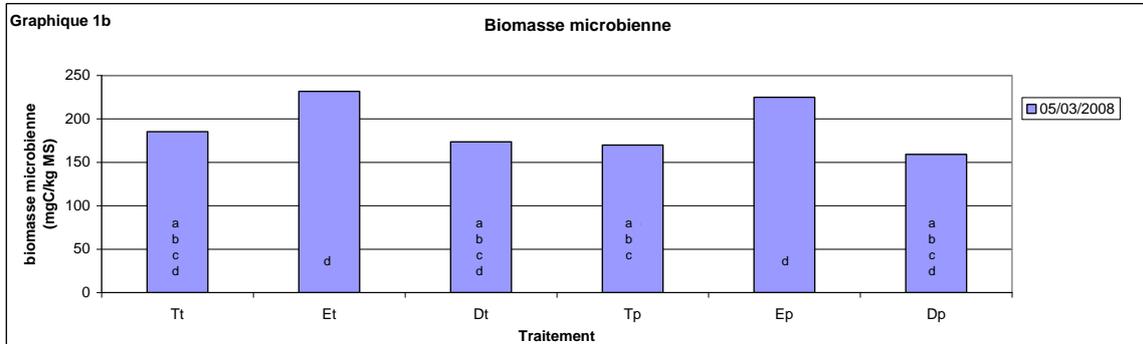
La parcelle de Montagne Saint Emilion est de texture moyenne, Limono-sablo-argileuse, de pH neutre, proche de 7,0 assez bien pourvue en matière organique (moyenne générale 2,2%), avec un rapport C/N moyen de 11, satisfaisant.

Globalement, cette parcelle nous paraît assez homogène. En première observation, nous n'observons pas d'effet bloc pour les paramètres physico-chimiques comme l'humidité du sol, le pH et la teneur en carbone. Les coefficients de variation du pHeau à chaque série de prélèvements sont inférieurs à 3%, et pour la teneur en carbone, inférieur à 11%.

Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Annexe 3 : Effets du cocktail de pesticides sur la quantité de biomasse microbienne. Résultats par date de prélèvement.

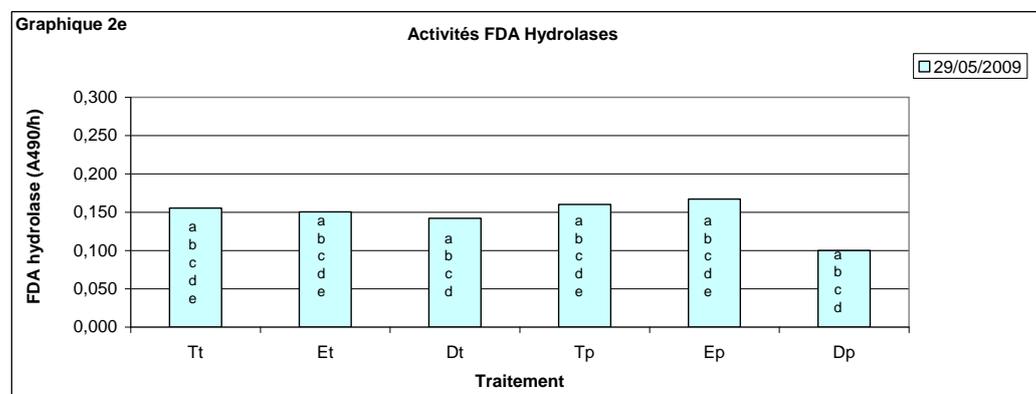
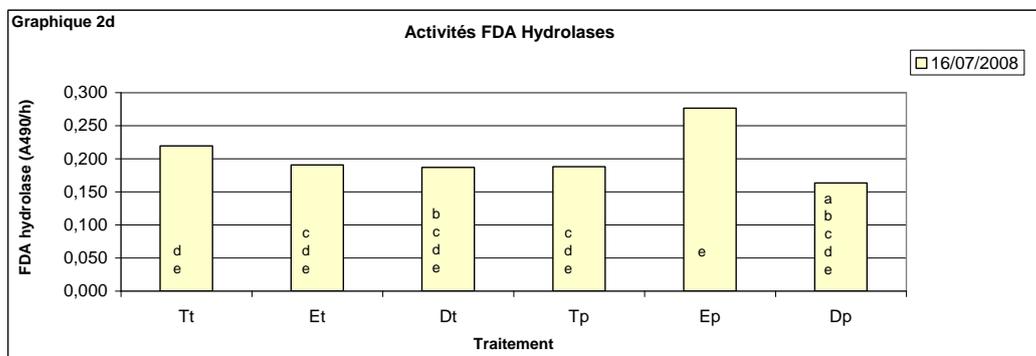
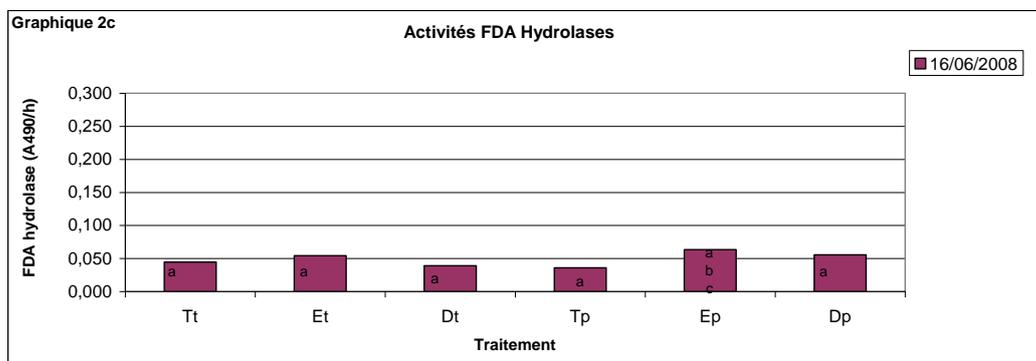
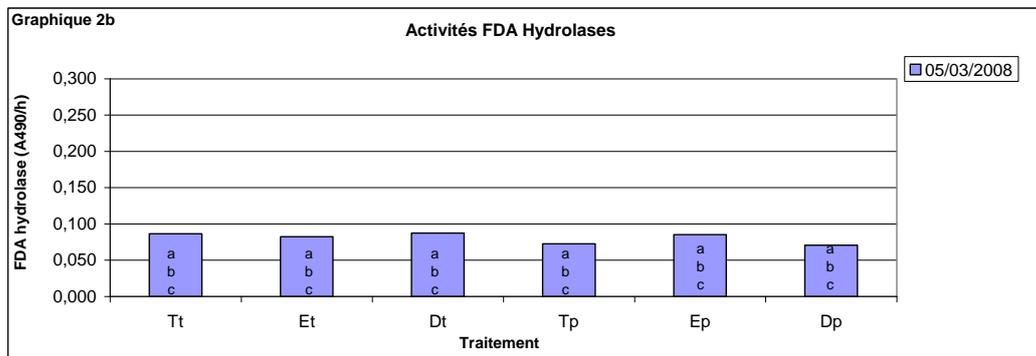
Les valeurs d'histogramme avec la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman et Keuls).



Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Annexe 4 : Effets du cocktail de pesticides sur les activités FDA hydrolases. Résultats par date de prélèvement.

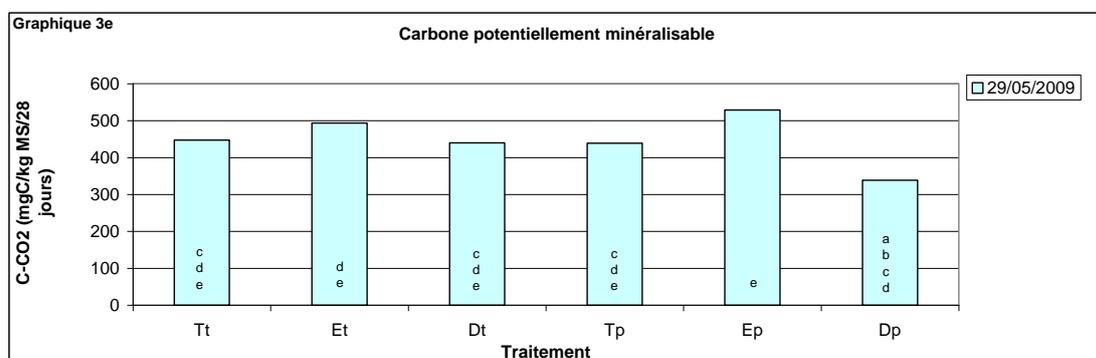
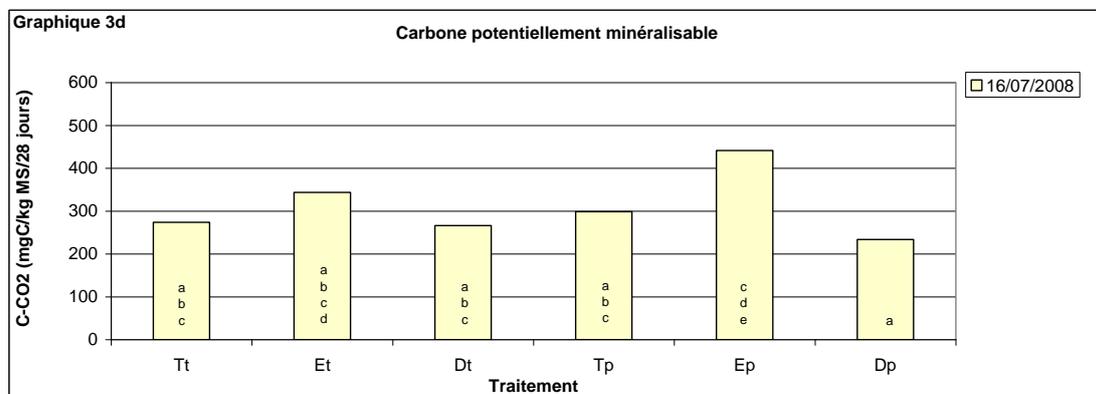
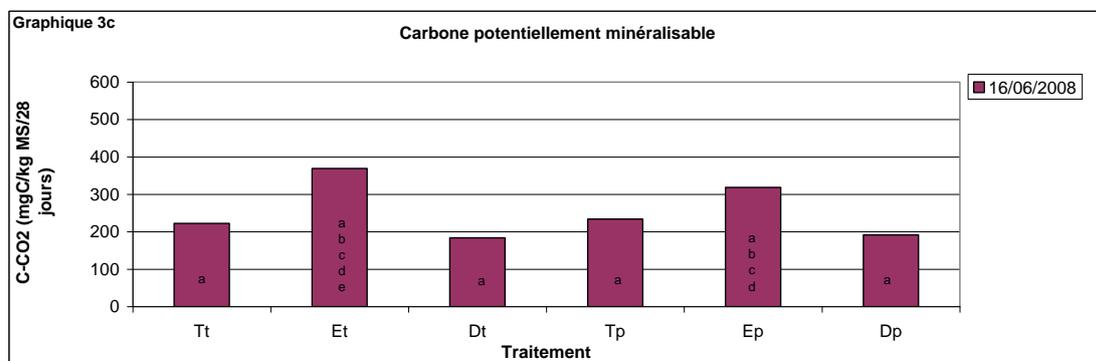
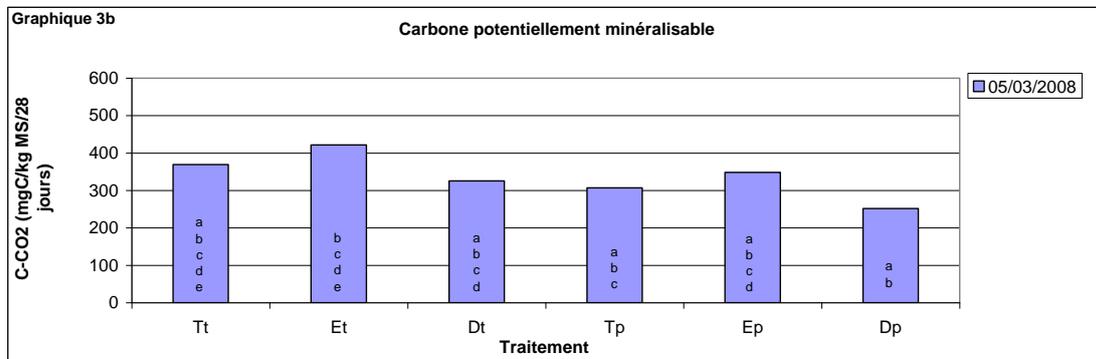
Les valeurs d'histogramme avec la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman et Keuls).



Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Annexe 5 : Effets du cocktail de pesticides sur l'activité respiratoire du sol. Résultats par date de prélèvement.

Les valeurs d'histogramme avec la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman et Keuls).



Indicateurs pour l'évaluation de l'impact des produits phytosanitaires sur la composante microbienne de la qualité des sols

Annexe 6 : Effet du cocktail de pesticides sur l'activité potentielle de minéralisation de l'azote. Résultats par date de prélèvement.

Les valeurs d'histogramme avec la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman et Keuls).

