



HAL
open science

Influence des modes d'entretien du sol en milieu viticole sur le transfert des pesticides vers les eaux d'infiltration - Impact sur les lombriciens

Eva Schreck

► To cite this version:

Eva Schreck. Influence des modes d'entretien du sol en milieu viticole sur le transfert des pesticides vers les eaux d'infiltration - Impact sur les lombriciens. *Ecologie, Environnement*. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2008. Français. NNT: . tel-00372036

HAL Id: tel-00372036

<https://theses.hal.science/tel-00372036v1>

Submitted on 31 Mar 2009

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

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



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III – Paul Sabatier

Discipline ou Spécialité : *Ecotoxicologie*

Présentée et soutenue par Eva SCHRECK

Le 5 décembre 2008

Titre : Influence des modes d'entretien du sol en milieu viticole sur le transfert des pesticides vers les eaux d'infiltration – Impact sur les lombriciens

JURY

Enrique BARRIUSO

Directeur de recherche à l'INRA de Grignon

Rapporteur

Maria BEBIANNO

Professeur des universités, Algarve - Portugal

Membre du jury

Thierry CAQUET

Directeur de recherche à l'INRA de Rennes

Rapporteur

Sovan LEK

Professeur des universités, Toulouse III

Président

Eric SERRANO

Directeur de la station régionale Midi-Pyrénées, IFV

Membre du jury

Michel TREILHOU

Professeur des universités, Centre Universitaire Champollion, Albi

Directeur de Thèse

Ecole doctorale : SEVAB

Unité de recherche : Chimie et Biochimie des Interactions, CUFR Champollion (USCS)

Directeur de thèse : Michel TREILHOU

Co-encadrement : Florence GERET

REMERCIEMENTS

Ce mémoire de thèse vient finaliser 3 ans de travail. Il marque un terme à cette expérience professionnelle mais aussi personnelle qui n'aurait pas été réalisée sans le savoir et le soutien de nombreuses personnes. Je tiens ainsi à remercier en quelques lignes tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à ce travail, en espérant n'oublier personne.

Mes remerciements vont tout d'abord à **Michel Treilhou** mon directeur de thèse et **Florence Geret**, co-encadrante de cette thèse pour leurs enseignements, leurs conseils avisés, nos discussions enrichissantes, leur disponibilité et leur écoute au cours de ces 3 années.

Mes travaux de thèse ont été financés par l'Institut Français de la Vigne et du Vin. Je tiens ainsi à remercier les représentants de cet Institut, **Laure Gontier** et **Eric Serrano** qui ont participé à ce travail en qualité de professionnels, de conseillers, d'experts du milieu viticole.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres de mon comité de thèse (**Julien Tournebize**, **Yvan Capowiez**, **Bertrand Bourguin** et **Françoise Goulard**) qui ont su me faire profiter lors de nos réunions ou communications de toutes leurs compétences et savoirs dans le but de m'aider au mieux dans la conduite de mes travaux.

Je remercie les membres du jury (**Enrique Barriuso**, **Thierry Caquet**, **Sovan Lek** et **Maria Bebianno**) pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce mémoire.

Je tiens à saluer la contribution des stagiaires à mes travaux : **Jean** pour la qualité du travail accompli et la rapidité avec laquelle il a réussi à s'approprier le sujet et enfin **Anne** pour son aide des derniers instants. Je remercie également **Adrian Pavely** pour la relecture minutieuse et avertie de mes articles.

Mais une thèse est aussi une aventure humaine... C'est pour cela que je souhaite adresser mes vifs remerciements à tous les membres de l'équipe Chimie et Biochimie des Interactions et plus largement du Centre Universitaire JF Champollion ou de l'IFV. Au-delà de nos discussions purement professionnelles, ces personnes ont partagé mon quotidien et souvent contribué à le rendre plus agréable. Mes remerciements vont donc dans le désordre à **Nathan, Elsa, Jean-Claude, Angélique, Pierre, Delphine, Marie-Hélène, Francis, Sylvie, Patrick, Anne-Claire, Odile, Philippe, Flora, Olivier, Liliane, Christophe, Stève...** sans oublier évidemment **Jean-Luc** pour son aide précieuse, sa facilité à trouver rapidement une solution pratique... et bien sûr, les 2 plus adorables Pipette Girls ; **Aline et Bérengère** pour nos fou rires, concours de chant et autres délires des plus farfelus qui ont vraiment transformé le quotidien du labo ! Enfin, je voudrais adresser une pensée toute particulière à **Marie**, partie trop vite pour rejoindre les Anges...

Enfin, mes remerciements vont à **ma famille et tous mes proches** qui m'ont toujours aidée et soutenue dans mes choix, notamment **mes parents**, toujours présents malgré la distance, pour m'avoir offert la possibilité d'arriver jusqu'ici et tellement plus encore, et m'avoir toujours entourée de leur amour ; **ma sœur** pour toute son affection et tout ce que nous partageons, dans les doutes comme dans les joies et enfin, **Anthony et Coyote**, pour leur réconfort, leur présence de tous les instants et tout ce qu'ils m'apportent chaque jour... Je conclurai par un petit mot pour **mes amis** : ceux qui réalisent aussi une thèse et qui, connaissant cette réalité, ont pu me soutenir et ceux qui, ignorant tout du « broyage de lombrics », m'ont permis de m'évader par nos multiples week-ends d'escapade...

AVANT-PROPOS

Cette thèse a fait l'objet de publications dans des revues à diffusion internationale et de communications orales ou sous forme de poster lors de colloques scientifiques.

Publications dans des revues internationales

Schreck E, Geret F, Gontier L, Treilhou M, 2008. Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere*, 71 1832-1839.

Schreck E, Geret F, Gontier L, Treilhou M, 2008. Development and validation of a rapid multiresidue method for pesticide determination using gas chromatography – mass spectrometry: a realistic case in vineyard soils. *Talanta*, 77 298-303.

Schreck E, Geret F, Gontier L, Treilhou M, 2009. ChE, GST, CAT: Evaluation of the efficiency of a combined buffer for protein extraction. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, sous presse.

Communications orales avec actes et comités de lecture

Schreck E, Geret F, Bressolles JC, Carayon JL, Tene N, Gontier L, Treilhou M. Transfert des produits phytosanitaires du sol vers les eaux d'infiltration en milieu viticole, Impact sur la macrofaune du sol. 37^e Congrès du Groupe Français des Pesticides, Bordeaux, mai 2007.

Schreck E, Geret F, Gontier L, Treilhou M. Etude des transferts de produits phytosanitaires du sol vers les eaux de drainage en milieu viticole. Suivi de biomarqueurs sur les populations de lombrics. Colloque FREDEC « Transferts des produits phytosanitaires dans les milieux environnementaux », Toulouse, octobre 2007.

Schreck E, Geret F, Gontier L, Treilhou M. Pesticide transfers from soil to subsurface waters - Impact on earthworms. Colloque international EMEC (8th European Meeting of Environmental Chemistry), Inverness, Scotland, décembre 2007.

Posters

Schreck E, Geret F, Gontier L, Treilhou M. Pesticide transfers to drainage waters in vineyard - Impact on earthworms. Colloque international SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry), Warszawa, Poland, mai 2008.

Schreck E, Geret F, Gontier L, Treilhou M. Impact des pesticides sur les populations de lombriciens. 38^e Congrès du Groupe Français des Pesticides, Brest, mai 2008.

TABLE DES MATIERES

Introduction générale.....	9
Synthese bibliographique.....	13
1 Les pratiques culturales en viticulture.....	13
1.1 Entretien des sols.....	13
1.1.1 <i>Le désherbage chimique</i>	14
1.1.2 <i>Le travail du sol</i>	17
1.1.3 <i>L'enherbement</i>	20
1.1.4 <i>Le désherbage thermique</i>	23
1.1.5 <i>Pratiques les plus répandues en terroir gaillacois</i>	24
1.2 Les molécules phytosanitaires épandues.....	25
1.2.1 <i>Les herbicides</i>	28
1.2.2 <i>Les fongicides</i>	30
1.2.3 <i>Les insecticides</i>	33
1.2.4 <i>Propriétés physico-chimiques des molécules</i>	35
2 Les transferts de produits phytosanitaires en agriculture, et plus particulièrement en viticulture.....	37
2.1 Devenir des pesticides après application.....	38
2.2 Le drainage agricole et ses effets sur les transferts.....	40
2.3 Transferts, viticulture et entretien des sols.....	42
3 Impact écotoxicologique de la pollution des sols.....	42
3.1 Les acteurs de la vie des sols.....	43
3.1.1 <i>La biomasse microbienne</i>	43
3.1.2 <i>La faune du sol</i>	44
3.2 Lombriciens et étude écotoxicologique de la pollution du sol.....	47
3.2.1 <i>Les lombriciens : biologie et place dans l'écosystème sol</i>	47
3.2.2 <i>Les biomarqueurs en écotoxicologie terrestre</i>	51
Influence de la pratique culturale sur le transfert de produits phytosanitaires.....	63
1 Site expérimental.....	63
1.1 Historique et présentation de la parcelle expérimentale.....	63
1.1.1 <i>Problématique et genèse du projet</i>	63
1.1.2 <i>Caractéristiques de la parcelle</i>	64
1.1.3 <i>Mise en place des installations</i>	69
1.1.4 <i>Dispositif de drainage et de collecte des eaux</i>	71
1.2 Itinéraire de protection phytosanitaire de la parcelle.....	75

2	Matériels et méthodes.....	83
2.1	Matériels	83
2.1.1	<i>Collecte des échantillons de sol et d'eau d'infiltration</i>	83
2.1.2	<i>Pesticides, solvants et verrerie spécifique</i>	85
2.1.3	<i>Préparation des standards</i>	86
2.2	Méthode	86
2.2.1	<i>Phase d'extraction</i>	87
2.2.2	<i>Analyse chromatographique</i>	95
2.2.3	<i>Cas du glyphosate, diquat et du fosétyl-aluminium</i>	111
2.2.4	<i>Validation de la méthode d'analyse</i>	117
3	Résultats et discussion	122
3.1	Comportement hydrologique du sol en lien avec son entretien.....	122
3.2	Concentrations en molécules actives dans les sols.....	134
3.2.1	<i>Au niveau des rangs</i>	134
3.2.2	<i>Au niveau des inter-rangs</i>	137
3.2.3	<i>Discussion</i>	142
3.3	Teneurs en molécules actives dans les eaux de drainage.....	145
3.4	Notion de transfert : exportation des pesticides vers les eaux de sub-surface.....	158

Impact des pesticides sur la pollution des sols en relation avec leur entretien : approche écotoxicologique 165

1	Matériels et méthodes	165
1.1	Suivi de la biomasse microbienne	165
1.1.1	<i>Mise en culture des microorganismes aérobies revivifiables</i>	166
1.1.2	<i>Mesure de la biomasse microbienne totale</i>	167
1.2	Echantillonnage de lombriciens dans les sols	168
1.3	Expérimentation en conditions contrôlées	174
1.3.1	<i>Principe et objectifs</i>	174
1.3.2	<i>Matériels et méthodes</i>	175
1.4	Suivi écotoxicologique : dosages des activités enzymatiques	179
1.4.1	<i>Mise au point du protocole d'extraction protéique</i>	179
1.4.2	<i>Dosage des activités enzymatiques</i>	191
1.4.3	<i>Calcul de l'activité volumique et de l'activité spécifique de chaque enzyme</i>	202
1.5	Extraction et dosage des molécules actives potentiellement bioaccumulées dans les lombrics	203
1.5.1	<i>Broyage et extraction à l'homogénéiseur</i>	203
1.5.2	<i>Extraction Liquide Pressurisée</i>	204
1.6	Traitement des données.....	204
2	Résultats et discussion	205
2.1	Etude de la biomasse microbienne	205
2.1.1	<i>Quantification du nombre de microorganismes revivifiables</i>	205
2.1.2	<i>Biomasse microbienne totale</i>	206
2.2	Expérimentation en conditions contrôlées ; suivi écotoxicologique.....	208
2.3	Ecologie des lombrics sur la parcelle	221
2.3.1	<i>Identification des genres en présence</i>	221
2.3.2	<i>Répartition et variabilité des lombriciens sur la parcelle expérimentale</i>	222
2.4	Etude écotoxicologique sur les lombriciens et lien avec l'entretien des sols	230

Conclusion	237
Références bibliographiques.....	245
Annexes.....	273
Liste des figures	283
Liste des tableaux	291
Liste des abréviations	293
Lexique	297
Abstract	299

INTRODUCTION GENERALE

La filière viticole française se trouve aujourd'hui plus que jamais confrontée à de nombreux enjeux, dont celui de renforcer sa compétitivité face à une concurrence internationale toujours plus forte et d'assurer les débouchés nécessaires à ses productions.

Cette compétitivité passe dès lors par une recherche constante de qualité et une maîtrise des coûts de production pour atteindre un niveau conforme aux attentes des marchés et acceptable pour le consommateur. En viticulture, production de quantité et de qualité rime bien souvent avec **utilisation d'intrants** et notamment de **produits phytosanitaires**. En effet, les pesticides sont utilisés en grande quantité dans le domaine viticole pour lutter contre les organismes nuisibles (champignons, insectes, bactéries) ou pour contrôler les adventices. Leur utilisation répond donc à des **impératifs agronomiques et économiques**.

Ainsi, de la naissance de l'agriculture intensive lors de l'après-guerre jusqu'en 1985, la consommation de pesticides a doublé tous les dix ans. La France, premier producteur agricole européen, se classe aujourd'hui au premier rang des consommateurs de pesticides en Europe et au troisième rang mondial après les Etats-Unis et le Japon (**ESCo, 2005**). Cependant, si l'utilisation de ces substances actives apporte des bénéfices pour les systèmes de production agricole, elle est également à l'origine d'**effets négatifs pour l'environnement** ainsi que pour la santé humaine et peut engendrer des coûts pour la société.

Cette contamination environnementale par les pesticides concerne l'ensemble du territoire. La pollution touche préférentiellement les sols mais aussi les eaux superficielles ou souterraines dans des zones anthropisées par l'urbanisation et l'agriculture. Or, comme cela a été suggéré lors des journées d'échanges et de perspectives sur le programme GESSOL en novembre 2006 à Paris, le sol est une ressource naturelle précieuse, mais surtout non ou peu renouvelable que nous nous devons de protéger puisqu'elle nourrit l'ensemble de la planète. Par ailleurs, le dernier bilan annuel publié par l'Institut Français de l'Environnement (**IFEN, 2004**) fait apparaître une contamination généralisée des eaux par les pesticides : ceux-ci sont

présents dans 80 % des stations suivies pour les eaux de surface et 57 % pour les eaux souterraines. **Préserver la qualité des sols et de l'eau** apparaît désormais comme une priorité, évoquée notamment lors du Grenelle de l'Environnement.

Dans ce contexte, les autorités françaises considèrent que depuis plusieurs années, l'utilisation de ces produits est arrivée à un point critique, en particulier en matière d'acceptabilité sociale. Aussi, avec la mise en place de la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (**DCE, 2000**) et suite aux conclusions apportées par l'Expertise Scientifique Collective (**ESCo, 2005**) menée par l'INRA et le CEMAGREF, la France affiche clairement son objectif d'aboutir à une utilisation des pesticides adaptée au contexte phytosanitaire. En 2006, à travers son Plan de Réduction des Risques liés aux pesticides, le gouvernement a souhaité inciter les acteurs des filières utilisatrices de ces produits (parmi lesquelles la filière viticole) à prendre des mesures de gestion appropriées.

Dès lors, cette prise de conscience du monde agricole s'est traduite par la mise en place d'une **agriculture « raisonnée »**, à la fois compétitive et plus respectueuse de l'environnement. Un retour à des techniques alternatives au désherbage chimique intégral des parcelles est envisagé : **travail du sol et enherbement**.

Bien qu'elles réduisent considérablement l'utilisation d'herbicides, ces techniques ne dispensent pas pour autant de l'application d'insecticides et de fongicides protégeant la culture des ravageurs et des maladies. Toutefois, ces pratiques agricoles peuvent influencer la **pollution des sols** et modifier les **processus d'infiltration et de contamination des eaux**.

Par ailleurs, le sol est un milieu vivant. Il semble alors possible qu'une pratique agricole et/ou l'utilisation de pesticides puissent avoir **un effet sur les populations présentes**. Parmi les principaux acteurs biologiques des sols, deux indicateurs sont retenus de part leurs rôles majeurs : **les microorganismes et les lombriciens** correspondant au groupe de macroorganismes du sol le plus important en termes de biomasse et d'activité.

L'objectif principal de cette thèse est de mettre en évidence une influence du mode d'entretien du sol sur le transfert des produits phytosanitaires vers les eaux souterraines et d'évaluer l'impact de ces techniques et des produits phytosanitaires sur les populations de lombriciens dans le sol.

Pour tenter de répondre à cette double problématique, ce mémoire de thèse s'ouvrira sur un **chapitre de présentation générale et de synthèse bibliographique** nous permettant d'introduire le sujet.

Après une **présentation de la parcelle viticole expérimentale**, cette étude s'articulera autour des **deux grands axes d'investigation** dans lesquels seront détaillés les **protocoles** mis en œuvre pour mener à bien ces études avant de présenter les **résultats obtenus et discutés**.

Le premier axe présentera un **suivi analytique** des teneurs en pesticides dans le sol et les eaux de drainage (peu documentées jusqu'à présent) afin de rendre compte de l'influence de la pratique culturale sur la qualité de ces deux ressources. L'impact de l'itinéraire cultural sur le comportement hydrologique du sol sera également envisagé.

Le second axe traitera de l'impact des pesticides sur la biomasse microbienne et les populations de lombriciens. Une **démarche écotoxicologique** fondée sur un couplage d'expérimentations en laboratoire et de mesures sur le terrain sera proposée. Les effets des pesticides sur les vers de terre seront appréhendés via le suivi de biomarqueurs enzymatiques de neurotoxicité et de biotransformation des toxiques.

Enfin, une **synthèse des travaux** sous forme de conclusion générale viendra clore ce mémoire pour apporter des éléments de réponse à cette problématique de l'influence de la pratique culturale en milieu viticole sur les transferts de pesticides vers les eaux d'infiltration. Des pistes de réflexion seront apportées aussi quant à l'effet des produits phytosanitaires sur la faune du sol, à la fois potentiellement victime de la pollution mais aussi actrice d'une possible détoxification du milieu. Nous évoquerons également des **perspectives d'études** ouvrant ainsi la réflexion sur d'éventuels travaux complémentaires.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Les pratiques culturales en viticulture

1.1 *Entretien des sols*

L'entretien du sol est une pratique à ne pas négliger en agriculture. Quelle que soit la culture envisagée, un sol bien entretenu est le gage d'une culture réussie et d'une production optimale.

En effet, une fois la culture en place, le sol fait l'objet de multiples pratiques dont :

- la fertilisation qui consiste en un apport d'engrais et d'amendements pour subvenir aux besoins nutritifs des plantes cultivées (minéraux et organiques),
- l'irrigation augmentant la quantité d'eau à disposition de la culture ou le drainage favorisant artificiellement l'évacuation de l'eau gravitaire présente dans la macroporosité du sol à la suite de précipitations,
- l'ameublissement et l'aération du sol pour favoriser le développement des végétaux et de la microfaune,
- le désherbage ayant pour objectif de limiter au maximum la prolifération des adventices.

En viticulture, les adventices ou « mauvaises herbes » sont responsables d'un phénomène de concurrence pour la vigne à l'égard de l'eau, de l'ensoleillement (**Celette, 2007**) ou des substances nutritives. Par ailleurs, elles créent sous le rang un microclimat frais et humide qui accentue les risques de gelées printanières et favorise aussi le développement de maladies (infections fongiques). Elles constituent également une zone refuge pour les ravageurs.

La lutte contre les adventices reste ainsi la principale action à mener concernant l'entretien du sol en agriculture. Ceci s'avère d'autant plus important en cultures pérennes comme la viticulture. L'entretien du sol en milieu viticole est indispensable à une bonne conduite de la culture et de la production qui en découle. Le sol est un des principaux éléments du terroir. En interaction avec le cep, il influe sur sa longévité, ainsi que sur la quantité et la qualité des raisins. Il est donc important

d'entretenir ses propriétés intrinsèques, et de contrôler les adventices qui pourraient s'y développer aux dépens de la vigne.

Ainsi, par l'intermédiaire de la pratique culturale et de l'itinéraire phytosanitaire choisis, le viticulteur souhaite maîtriser ces « mauvaises herbes ». Plusieurs modes d'entretien du sol se présentent alors à lui (**recommandations du Ministère de l'agriculture et de Vitisphère**).

L'entretien du rang (entre les ceps) se fait le plus souvent par désherbage chimique ou par travail du sol.

Au niveau des inter-rangs, les techniques les plus utilisées sont : l'épandage d'herbicides, le travail du sol (inter-cep), l'enherbement semé ou naturel maîtrisé par la tonte ou par girobroyage et le désherbage thermique qui reste toutefois une technique marginale car trop onéreuse.

Mais des méthodes combinées existent aussi, on peut citer par exemple :

- alternance des inter-rangs travaillés et des inter-rangs désherbés chimiquement sur une même parcelle,
- alternance des inter-rangs travaillés et des inter-rangs enherbés maîtrisés.

1.1.1 Le désherbage chimique

1.1.1.1 *Principe*

Le désherbage chimique du sol permet par l'application de produits phytosanitaires herbicides de se débarrasser des adventices.

Ce désherbage peut être total (sous le rang et sur l'inter-rang, Figure 1.1) avec plusieurs passages afin de supprimer les plantes annuelles et les vivaces. Il peut également être combiné à d'autres pratiques comme le travail du sol ou le maintien d'un enherbement sur l'inter-rang.



Figure 1.1 : Désherbage intégral sous le rang et sur l'inter-rang (photographie personnelle de la parcelle expérimentale de notre étude)

Un désherbant n'agit en général que sur une partie de la flore adventice très diversifiée de la vigne (**Gago, 2008**). Pour la maîtriser, plusieurs herbicides peuvent être utilisés. Ils diffèrent par leur mode d'action ou par leur cible :

- Herbicides de contact ou défanants : qui agissent par contact direct avec la plante. Ils ne migrent pas dans le végétal et n'atteignent donc pas les racines.
- Herbicides systémiques : véhiculés par la sève, ils migrent dans la plante. Ils peuvent être persistants et de ce fait entraîner des risques de phytotoxicité pour la vigne.

Des plantes résistantes aux produits appliqués, ou se développant après leur application, peuvent proliférer du fait de l'élimination des adventices concurrentes. On risque ainsi des inversions de flore, ou le développement d'espèces "nouvelles", provenant en fait des bordures de la culture ou de la végétation avoisinante. De même, l'application répétée de la même matière active peut aussi entraîner des phénomènes de résistance (**Dastgheib et Frampton, 2000 ; Gago et al., 2007**). Pour prévenir ce type de phénomène, il est utile d'alterner sur plusieurs années les substances actives utilisées. Plusieurs stratégies « herbicides » peuvent être utilisées :

- stratégie « herbicide de pré-levée » appliqué avant le débourrement de la vigne : action sur les plantes annuelles ou bisannuelles, par inhibition de la levée de la plantule ou destruction des jeunes racines,
- stratégie « herbicide de post-levée » : pour contrôler le développement des plantes vivaces ou pluriannuelles,

- stratégie « mixte », combinant l'application d'un herbicide post-levée dans un premier temps pour détruire à la sortie de l'hiver le couvert végétal en place, puis l'application d'un herbicide de pré-levée empêchant ainsi la germination des mauvaises herbes qui n'avaient pas encore germé lors du passage du traitement de post-levée.

On remarque toutefois que dès la fin de l'été, on peut tolérer voire rechercher le développement d'un enherbement spontané, destiné à assurer une couverture hivernale (Figure 1.2). Celle-ci offre une bonne protection du sol contre l'érosion et la perte de matières nutritives et elle favorise une bonne portance.



Figure 1.2 : Couvert hivernal sur la parcelle de l'étude (photographie personnelle)

1.1.1.2 *Avantages et inconvénients agronomiques*

Le désherbage chimique est une technique simple d'utilisation, aujourd'hui peu coûteuse... Elle permet aussi d'intervenir là où le labour est impossible (pente, sol trop humide...). Cette technique présente cependant de nombreux désavantages, qui la rendent de plus en plus impopulaire notamment en termes de protection de l'environnement et de la santé humaine. Elle est notamment responsable de pollutions diffuses dues aux phénomènes de dérive au moment de l'application des molécules et de pertes ultérieures par des processus tels que la volatilisation post-application ou l'entraînement par drainage et/ou ruissellement.

Soumis à un désherbage chimique intégral, le sol se tasse (**Lagacherie et al., 2006**). Par ailleurs, un effet négatif sur la vie de la microflore et de la microfaune du sol est très notable. Les risques de pollution d'une part des nappes souterraines par

infiltration des molécules dans le sol et d'autre part des cours d'eau par ruissellements de surface (pluies, érosion) ne sont pas négligeables (**Zhang et al., 1997 ; Landry et al., 2005**). Enfin, l'utilisation de ces molécules actives n'est pas sans danger pour la culture (risques de phytotoxicité, **Magné et al., 2006**), les opérateurs agricoles (risques pour la santé) et l'environnement en général.

Bien que le désherbage chimique soit aujourd'hui très controversé, il reste encore très employé pour maintenir le rang « propre », car il évite les effets néfastes du couvert végétal et les travaux spécifiques de chaussage, déchaussage et décavaillonnage très contraignants. Toutefois, des pratiques alternatives doivent être envisagées, au moins pour l'inter-rang.

1.1.2 Le travail du sol

1.1.2.1 *Principe*

Le labour est une pratique ancestrale et encore souvent fastidieuse.

Même si le labour traditionnel et profond existe encore (notamment avant la plantation de la vigne) dans certains vignobles, il est le plus souvent remplacé par un labour superficiel (à une profondeur limitée à 15 cm) appelé **pseudo-labour**. Un premier passage peut avoir lieu à l'automne, après les vendanges pour décompacter le sol suite au passage de la machine à vendanger. Les façons suivantes s'effectuent de février à août avec généralement environ 5 passages dans l'année en Midi-Pyrénées.

Bien que le travail du sol soit possible sur les rangs de vigne grâce à des outils interceps, ce sont des solutions mixtes qui sont le plus souvent mises en œuvre, comme le labour de l'inter-rang et le désherbage chimique sous le rang.

Il existe différents outils pour réaliser ce pseudo-labour : des houes rotatives et des outils à dents. Les houes rotatives agissent par choc et projections pour un enfouissement superficiel (5 à 10 cm). Les outils à dents sont constitués d'un châssis ou cadre sur lequel sont montés des étançons comportant des pièces d'usure (à forme variable en fonction de l'entretien voulu) appelées les socs. Les ensembles

formés par les étançons et les socs constituent les dents qui peuvent être rigides, semi-rigides ou vibrantes.

Le plus connu et couramment utilisé des appareils à dents rigides est l'**actisol**. La partie active de la dent possède une partie centrale constituée d'un carolet et de 2 larges ailerons. L'actisol possède un bon pouvoir pénétrant. Il permet de « gratter » les sols superficiellement pour les décompacter et les aérer tout en se débarrassant des mauvaises herbes sur l'inter-rang (Figure 1.3).



Figure 1.3 : Travail du sol (actisol) sur l'inter-rang d'une des modalités de la parcelle de l'étude

1.1.2.2 Avantages et inconvénients agronomiques

Le travail du sol présente plusieurs intérêts.

Il constitue une solution alternative au désherbage chimique en termes de lutte contre la pollution de l'environnement par les produits chimiques. De plus, il ne provoque pas d'inversion de flore.

Il permet par ailleurs un ameublissement de la terre. S'il est pratiqué en surface, le labour améliore la structure physique du sol et facilite les échanges à la surface du sol (air, eau et engrais apportés) comme le montrent les travaux de **Coulouma et al. (2006)**. Toutefois, un labour trop profond entraîne l'apparition d'une couche dure par l'action du tassement naturel et du passage des engins pour les traitements, les vendanges, etc. (**Richard et al., 1999 ; Boizard et al., 2002**). Ce phénomène de compaction est accentué dans le cas d'un labour sur sol humide (**Lagacherie et al., 2006**).

Le travail du sol favorise une meilleure gestion de l'eau : captation de l'eau de pluie, limitation de l'évaporation empêchant l'établissement de circuits capillaires vers la surface, maintien d'humidité en profondeur, cassure de la croûte de battance, limitation de la compétition par rapport aux adventices.

Il permet aussi une aération de la terre favorisant la multiplication des microorganismes azotobactères fixateurs de l'azote de l'air transformant ainsi l'azote organique en azote nitrique.

Les labours facilitent le développement des racines des jeunes plants grâce à cette aération. Ils ont par contre peu d'effets sur l'appareil racinaire des plantes adultes, si ce n'est la destruction de leur partie superficielle.

Mais, le labour possède aussi ses inconvénients... D'après l'encyclopédie de **Vitisphère**, le labour est néfaste au moment des gelées de printemps car l'évaporation de l'eau contenue dans le sol entraîne une baisse de la température de l'air au niveau des ceps. Pour la même raison, on ne laboure pas pendant la floraison, la baisse de température pouvant favoriser la coulure (chute des fleurs non fécondées). En été, la sécheresse et, dans certains cas, l'étalement de la vigne, limitent la pousse des mauvaises herbes.

L'ameublissement dû au travail du sol peut entraîner des phénomènes de ruissellement et d'érosion par la formation de boues en période de fortes pluies (**Gago et al., 2007**). Le labour entraîne aussi une diminution de la portance par enlèvement de la terre.

Les pertes de matières organiques ne sont pas négligeables, il y a moins de microorganismes en surface, les organismes de la macrofaune du sol sont perturbés (bisection des vers de terre, destruction de leur habitat écologique...).

Enfin, le travail du sol a un coût plutôt élevé. Il nécessite un investissement de départ important auquel s'ajoute l'entretien du matériel et le coût en main-d'œuvre des nombreuses interventions sur la parcelle.

1.1.3 L'enherbement

1.1.3.1 *Principe*

Dans le contexte actuel de raisonnement des pratiques et de protection de l'environnement, l'enherbement est une technique d'entretien du sol de plus en plus appréciée en milieu viticole. Il s'agit d'une pratique culturale visant à laisser se développer de façon maîtrisée un couvert végétal sur les inter-rangs (ou un inter-rang sur deux en cas de sol pauvre) d'une parcelle viticole, l'espace sous le rang étant le plus généralement désherbé chimiquement ou mécaniquement. On parle alors de bandes enherbées entre deux rangs de vigne.

L'enherbement peut être **permanent** : la couverture végétale est maintenue en place toute l'année, ou **temporaire** : enherbement éliminé du printemps à la fin de l'été.

La gestion de l'enherbement dépend des conditions climatiques et du développement de la végétation. Il est entretenu de préférence mécaniquement (tonte avec au minimum deux coupes par an) ou chimiquement.

Le couvert végétal peut provenir d'un semis : **enherbement semé** (Figure 1.4) ou de l'entretien des espèces naturellement présentes sur la parcelle : **enherbement naturel maîtrisé** (ENM), généralement moins concurrentiel pour la vigne.

Pour un enherbement semé, le choix des espèces doit se faire en fonction des caractéristiques de la parcelle (nature du sol, climat) et de la vigne (âge, vigueur). Certaines graminées ont été sélectionnées pour leur croissance lente et limitée comme certaines fétuques (fétuque rouge, fétuque ovine), certains pâturins (pâturin des prés) et autres variétés de ray grass anglais. Une légumineuse (le trèfle souterrain) peut aussi être employée dans les vignobles méditerranéens et atlantiques. Par ailleurs, les agriculteurs choisissent de plus en plus d'implanter des bandes enherbées fleuries à base de dicotylédones. Outre l'aspect esthétique, ces bandes enherbées fleuries ont une croissance rapide, et permettent aussi d'accroître la biodiversité du milieu.



Figure 1.4 : Enherbement semé sur l'inter-rang

De façon générale, on recherche pour le couvert végétal :

- une installation rapide et dense pour prendre le dessus sur les mauvaises herbes,
- une pousse lente par la suite pour limiter les interventions de tonte,
- une bonne résistance au passage des hommes et des engins.

L'enherbement est entretenu par la tonte et l'application ponctuelle d'un herbicide foliaire post-levée ou le passage d'un girobroyeur laissant les résidus d'herbes sur place pour restituer la matière organique au sol.

1.1.3.2 Avantages et inconvénients agronomiques

L'enherbement des inter-rangs présente de nombreux avantages pour le sol. Il permet de limiter l'utilisation de désherbants : l'enherbement (semé) prend le dessus sur les mauvaises herbes. Il améliore la structure du sol, il permet de lutter contre les effets néfastes de l'érosion, le ruissellement, protégeant ainsi les terroirs. L'enherbement pourrait également favoriser la capacité d'infiltration et de rétention des sols (**Tournebize, 2001 ; Celette, 2007**). Il protège le sol contre le phénomène de compaction qui se produit souvent suite aux passages répétitifs des engins sur la parcelle (**Cofie et al., 2000 ; Lagacherie et al., 2006**). L'enherbement améliore la portance des sols, il est source de matière organique (**Steenwerth et Belina, 2008**). Par ailleurs, il favorise le développement de la microflore et de la microfaune du sol. Les vignes enherbées pourraient également produire des vins aux qualités changées

(Le Golf-Guillou et al., 2000 ; David et al., 2001). De plus, des études suggèrent que l'enherbement permettrait une avancée de la maturité des raisins couplée à une amélioration des caractéristiques des vins qui deviennent plus aromatiques, plus riches en polyphénols **(Morlat, 2007)**.

Le couvert végétal concurrence la vigne dans le prélèvement de l'eau, de l'azote et des éléments minéraux. D'après l'encyclopédie de Vitisphère, l'enherbement peut être bénéfique ou néfaste pour la vigne.

En cas d'excès de vigueur, l'enherbement entraîne une amélioration de l'état sanitaire, une baisse du rendement et un meilleur déroulement de la maturation des raisins **(Aguilhon, 1996 ; Geoffrion, 1999)**. La concurrence, si elle n'est pas trop brutale, peut également induire le développement de l'appareil racinaire en profondeur, rendant la vigne plus résistante aux périodes de sécheresse.

L'enherbement a par contre des effets négatifs sur sols pauvres, en zone ou en période de sécheresse, ou lorsque la structure du sol ne permet par un enracinement profond de la vigne. Il peut également entraîner une concurrence azotée entre la vigne et le couvert végétal ou au contraire, un apport trop élevé en azote si les légumineuses sont très majoritaires dans le couvert en place **(Maigre et Aerny, 2001)**.

Une vigne enherbée est plus froide : les plantes créent un microclimat frais et humide qui multiplie les risques de gelée.

Le couvert végétal est donc à proscrire sur les plantiers : il entraîne un affaiblissement des réserves. Il est donc préférable de le mettre en place progressivement pour permettre à la plante de s'adapter à ces nouvelles conditions de culture.

Enfin, son utilisation n'est pas toujours très économique si l'on tient compte des contraintes de sa mise en place et des coûts en main-d'œuvre qu'il engendre du fait des nombreuses tontes, ou de son entretien mécanique ou chimique.

1.1.4 Le désherbage thermique

1.1.4.1 *Principe*

Cette technique récemment mise au point en viticulture se développe de plus en plus ces dernières années, notamment grâce à son aspect « écologique » bien que le bilan carbone ne soit pas très positif (CO₂, gaz brûleur...). Elle consiste à détruire la partie aérienne des adventices par le passage de brûleurs alimentés par du gaz combustible (**Phyt'Eauvergne, 2003**). Le choc thermique entraîne alors une coagulation des protéines et la vaporisation de l'eau dans les cellules végétales, ce qui provoque l'éclatement de leurs parois (**Dartygoeyte, 2006**).

Il existe plusieurs technologies de brûleurs :

- le brûleur phase liquide à évaporateur qui comporte un serpentin permettant au gaz (propane) de passer de la phase liquide à la phase gazeuse (température de flamme de 1400 °C).
- le brûleur phase gazeuse à double aspiration qui comporte un dispositif de pré-mélange du gaz (température de flamme de 1400 °C).

1.1.4.2 *Avantages et inconvénients*

Cette pratique a une action immédiate : l'adventice stoppe instantanément son développement ; elle est également assez respectueuse de l'environnement (limitation des intrants).

Cependant, toutes les adventices ne sont pas également détruites par ce traitement thermique : les dicotylédones et les plantes annuelles étant plus sensibles que les graminées et plantes vivaces.

Cette technique n'est pas utilisable partout, elle est soumise aux arrêtés relatifs à l'écobuage. Par ailleurs, la montée en température (jusqu'à 700 ou 1000 °C) peut provoquer des phénomènes d'« échaudage » sur grappes ou sur feuilles.

De plus, pour que cette technique de désherbage soit réellement efficace, il faut un nombre important de passages du fait de la persistance des parties souterraines. Même en restant raisonnable et sans chercher un couvert complètement nu, il faut compter un minimum de 4 passages par an (**Dartygoeyte, 2006**), ce qui représente

une forte exigence en termes de temps, de coût et de main d'œuvre. D'un point de vue écologique, cette technique limite l'utilisation des intrants chimiques mais implique une consommation accrue de carburants, un recours au combustible gaz et une utilisation accrue du matériel agricole, les temps de travaux étant multipliés (Figure 1.5). Par ailleurs, se pose également le problème de l'incidence de cette forte température sur la vie microbienne.

Enfin, cette technique culturale s'avère très onéreuse.



d'après www.deltamecanisation.com

Figure 1.5 : Désherbage thermique de la vigne

1.1.5 Pratiques les plus répandues en terroir gaillacois

Une enquête réalisée par **Serrano et al. (2001)** sur trois vignobles de la région Midi-Pyrénées (Fronton, Gaillac et Madiran) a montré que l'enherbement permanent sur les inter-rangs ou alterné un inter-rang sur deux avec un travail du sol était pratiqué dans 51% des parcelles. Très développé en Madiran, il est en extension dans les autres vignobles. En comparaison, le désherbage chimique total était employé sur 41% de la surface étudiée. Cette étude a révélé qu'une plus grande diversité des herbicides et leur alternance est désormais souhaitable tant pour le respect de l'environnement que pour prévenir les inversions de flore et les phénomènes de résistances. Le travail mécanique du sol correspond à 8% des parcelles de l'étude. Cependant, en 2001, le désherbage chimique était la seule pratique utilisée sous le rang. Aujourd'hui encore, il est prépondérant.

Cette constatation faite, il sera alors intéressant de comparer ces différentes pratiques culturales vis-à-vis du comportement des molécules phytosanitaires appliquées sur la vigne.

1.2 Les molécules phytosanitaires épandues

Après la seconde guerre mondiale, l'intensification de l'agriculture a initié puis généralisé l'utilisation de produits phytosanitaires (**Guimont, 2005**). Le milieu viticole n'échappe pas à cette utilisation de pesticides qui répond depuis plusieurs années à un besoin de productivité et de qualité des cultures. Ils permettent en effet la lutte contre les adventices (herbicides), contre les insectes ravageurs (insecticides) ou les maladies fongiques (fongicides).

Cependant, le monde agricole, poussé par la recherche scientifique, a pris conscience des effets néfastes de ces pesticides pour l'environnement et a quelque peu modifié ses pratiques culturales. L'épandage intensif de produits phytosanitaires est désormais banni : les doses appliquées ont été revues à la baisse depuis plusieurs années et les molécules jugées trop nocives ont été retirées du marché. Toutefois, même si l'agriculture est plus raisonnée de nos jours, l'usage de pesticides reste courant et nécessaire dans bien des cas pour rester compétitif.

La consultation des données et des relevés viticoles d'une grande cave coopérative du sud-ouest a permis de dresser une liste des pesticides les plus couramment utilisés en terroir gaillacois. Les molécules les plus épandues dans cette région s'avèrent être très généralement utilisées en viticulture dans la France entière.

Les molécules suivies dans le cadre de notre étude ont été choisies en fonction de leur fréquence d'application en terroir gaillacois. Le tableau 1.1 présente les insecticides les plus couramment utilisés par les vignerons coopérateurs de cette grande cave en 2005.

Tableau 1.1 : Molécules actives insecticides et formulations utilisées par les vignerons du gaillacois (en pourcentage de viticulteurs de la coopérative) en 2005

Formulation	Utilisation en gaillacois (en % de viticulteurs)	Molécules actives de la préparation
Karaté Zéon	20,71	lambda-cyhalothrine
Crésus	10,00	delta-méthrine + chlorpyrifos-méthyl
Géotion tx	7,86	cyperméthrine + chlorpyrifos-éthyl
Magéos MD	7,14	alpha-méthrine
Cyperméthrine	6,43	cyperméthrine
Pilier	6,43	beta-cyfluthrine + fénitrothion
Vitis	6,43	cyperméthrine + fénitrothion
Talstar	5,71	bifenthrine
Dursban	5,00	chlorpyrifos-éthyl
Pyrinex ME	4,29	chlorpyrifos-éthyl
Décis	2,86	delta-méthrine
Karaté express	2,86	lambda-cyhalothrine
Acarifas	2,14	tébufenpyrad + bifenthrine
Cyperfort	2,14	cyperméthrine
Klartan	2,14	tau-fluvalinate
Nelpon	2,14	chlorpyrifos-éthyl
Brigade	1,43	bifenthrine
Torant CL	1,43	bifenthrine + clofentézine
Bistar	0,71	bifenthrine
Cajun	0,71	beta-cyfluthrine
Cyperfos	0,71	cyperméthrine
Lannate	0,71	méthomyl

Nous remarquons ainsi que la lambda-cyhalothrine et le chlorpyrifos sont les 2 insecticides les plus utilisés par les viticulteurs de la cave coopérative, avec respectivement 23,57 % et 19,29 % d'utilisateurs. L'analyse plus détaillée des itinéraires phytosanitaires suivis par les viticulteurs sur leur vignoble met en évidence une utilisation alternée des 2 molécules sur une même campagne de traitement pour un respect des bonnes pratiques agricoles.

Les tableaux 1.2 et 1.3 présentent les fongicides les plus couramment utilisés en terroir gaillacois dans la lutte contre l'oïdium et le mildiou.

Tableau 1.2 : Molécules actives fongicides et formulations utilisées en 2005 par les vignerons du gaillacois (en pourcentage de viticulteurs de la coopérative) pour la lutte contre l'oïdium

Oïdium		
Formulation	Utilisation en gaillacois (en % de viticulteurs)	Molécules actives de la préparation
Soufre	22,27	Soufre
Microthiol	13,36	Soufre micronisé
Anvil	11,34	Hexaconazole
Systhane	10,53	Myclobutanil
Cabrio top	6,48	Pyraclostrobine + Métirame-Zinc
Héliosoufre	6,48	Soufre micronisé
Thiovit	6,07	Soufre micronisé
Score	5,26	Difénoconazole
Karathane	4,86	Dinocap
Mycloss	4,45	Myclobutanil
Corail	3,64	Tébuconazole
Indar	2,43	Fenbuconazole
Kumulus	1,21	Soufre micronisé
Fluidosoufre	0,81	Soufre pour poudrage
Trilog	0,81	Soufre micronisé

Tableau 1.3 : Molécules actives fongicides et formulations utilisées en 2005 par les vignerons du gaillacois (en pourcentage de viticulteurs de la coopérative) pour la lutte contre le mildiou

Mildiou		
Formulation	Utilisation en gaillacois (en % de viticulteurs)	Molécules actives de la préparation
Mikal Flash	22,22	Fosétyl-Al + Folpel
Epylog Flash	12,3	Fosétyl-Al + Folpel
Antéor	7,54	Cymoxanil + Folpel + Cuivre
Rhodax	7,14	Fosétyl-Al + Mancozèbe
Slogan	7,14	Fosétyl-Al + Métirame-Zinc
Cabrio top	6,75	Pyraclostrobine + Métirame-zinc
Roxam Combi	5,16	Zoxamide + Mancozèbe
Foltane	3,97	Folpel
Bouillie bordelaise	3,57	Sulfate de cuivre
Cuprofix	3,57	Cuivre + Folpel
Artimon	2,38	Fosétyl-Al + Mancozèbe
Panthéos	2,38	Diméthomorphe + Folpel
Valiant Flash	2,38	Fosétyl-Al + Folpel + Cymoxanil
Manconyl	1,98	Mancozèbe
Rémiltine	1,59	Cymoxanil + Mancozèbe + Folpel
Sillage	1,59	Fosétyl-Al + Métirame-Zinc
Almanach Flash	1,19	Fosétyl-Al + Mancozèbe + Cymoxanil
Champ DP	1,19	Hydroxyde de cuivre
Polyram DF	1,19	Métirame + Zinc
Eperon Pepite	0,79	Métalaxyl + Mancozèbe
Forum	0,79	Diméthomorphe
Ocarina	0,79	Iprovalicarbe + Cuivre
Option Flash	0,79	Fosétyl-Al + Folpel
Quadris Max	0,79	Azoxystrobine + Folpel
Myco 500	0,4	Folpel
Sygan S	0,4	Cymoxanil + Folpel

Les 3 fongicides les plus utilisés en 2005 sont le folpel, le fosétyl-Al et le myclobutanil (Tableaux 1.2 et 1.3).

Ainsi, ces molécules, couramment utilisées par les vignerons du terroir gaillacois, ont été sélectionnées pour le traitement phytosanitaire de la parcelle de l'étude. Leurs caractéristiques et leurs propriétés sont présentées d'après les données de l'Acta (Acta, 2006) et des Fiches Agritox (Agritox, 2008).

1.2.1 Les herbicides

Les herbicides sont destinés à éliminer les « mauvaises herbes » en viticulture pour prévenir ainsi les phénomènes de concurrence vis-à-vis de la vigne et limiter le développement des ravageurs et des maladies par le microclimat créé.

- **Le glyphosate** est un herbicide de post-levé des adventices de la famille des amino-phosphonates (acides aminés) (Figure 1.6).

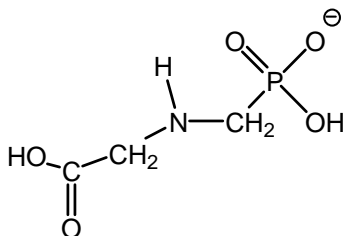


Figure 1.6 : Formule développée du glyphosate (C₃ H₈ N O₅ P), M = 169,1 g mol⁻¹

Cet herbicide de post-levée agit de façon systémique : absorbé par les feuilles puis véhiculé par la sève dans les végétaux jusqu'aux points de croissance (apex, méristèmes), il bloque la synthèse des acides aminés aromatiques perturbant ainsi la croissance et le développement des adventices, jusqu'à leur mort. Sur une parcelle viticole, son action touche essentiellement les graminées annuelles et vivaces, les dicotylédones annuelles et bisannuelles.

Son principal produit de dégradation est l'AMPA (acide aminométhylphosphonique).

- **La flumioxazine** est un herbicide de pré-levée des adventices de la famille des N-phénylphthalimides (Figure 1.7).

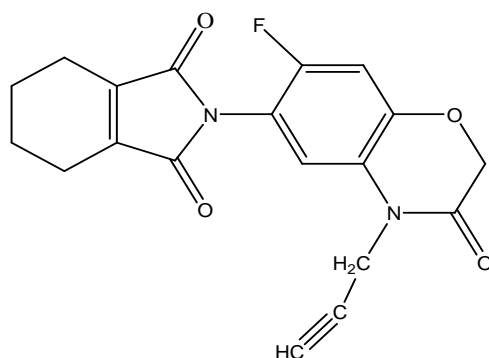


Figure 1.7 : Formule développée de la flumioxazine ($C_{19}H_{15}FN_2O_4$), $M = 354,3 \text{ g mol}^{-1}$

Cet herbicide de pré-levée agit par contact formant des nécroses au niveau des tissus souterrains, empêchant par la suite la synthèse des chlorophylles. En effet, cet herbicide est un inhibiteur de l'enzyme « ppo » (protoporphyrène oxydase) conduisant à la synthèse des chlorophylles. Ce produit est actif sur les dicotylédones et les graminées en viticulture, il est très peu mobile dans le sol.

- **Le flazasulfuron** est un herbicide de pré-levée de la famille des sulfonilurées (Figure 1.8).

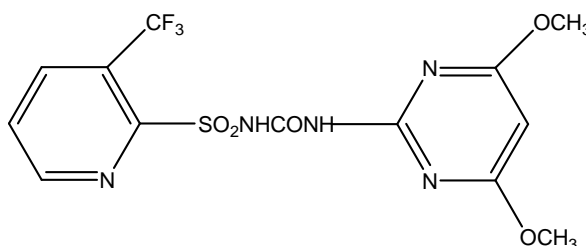


Figure 1.8 : Formule développée du flazasulfuron ($C_{13}H_{12}F_3N_5O_5S$), $M = 407,4 \text{ g mol}^{-1}$

Le flazasulfuron est une molécule thermosensible (**Galletti et al., 1995 ; Ayano et al., 2004**).

Il pénètre dans les plantes par voie foliaire et racinaire. Il migre par voie ascendante et descendante. Il agit sur les méristèmes des adventices en inhibant l'ALS (acétolactate synthase). La croissance des plantes est d'abord stoppée puis elles meurent en quelques semaines. Ainsi, des levées de mauvaises herbes peuvent se

produire mais elles seront bloquées dans leur croissance. Il est utilisé sur de nombreuses dicotylédones annuelles et bisannuelles et graminées annuelles.

Ces deux herbicides de pré-levée (flumioxazine et flazasulfuron) sont généralement utilisés en alternance d'une année sur l'autre en viticulture. Cette stratégie sera appliquée pour la parcelle expérimentale.

- **Le diquat dibromide** est un herbicide utilisé comme épamprant sur la vigne : il permet la destruction chimique des rejets (jeunes pampres de 10 à 20 cm non lignifiés) qui poussent sur le cep. Il appartient à la famille chimique des ammoniums quaternaires (Figure 1.9).

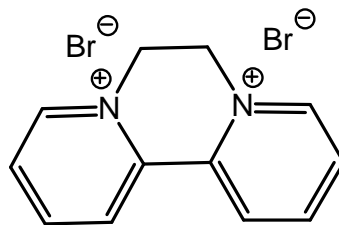


Figure 1.9 : Formule développée du diquat dibromide (C₁₂ H₁₂ N₂ Br₂), M = 344,1 g mol⁻¹

Cet épamprant détruit par contact les parties vertes touchées par la pulvérisation sans pénétrer dans le cep de vigne. Il possède une action dessiccante responsable du défanage. L'eau et l'oxygène des cellules se transforment alors en eau oxygénée selon une réaction catalysée par le cation provenant du sel ; celle-ci va détruire très rapidement les cellules des parties vertes touchées (stress oxydant bloquant les processus de photosynthèse).

1.2.2 Les fongicides

Les fongicides sont des agents phytosanitaires destinés à combattre les champignons pathogènes des plantes cultivées. En effet, ces champignons, en s'attaquant aux tissus des plantes, causent des pertes de rendement très importantes et abîment les cultures. Les fongicides permettent alors de s'inscrire dans une stratégie de lutte contre les champignons les plus nocifs : *Plasmopora*

viticola, agent du mildiou de la vigne ; *Uncinula necator*, responsable de l'oïdium ; *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise ; *Phomopsis viticola*, à l'origine de l'excoriose ou encore *Guignardia bidwelli*, agent du black-rot, pour ne citer que les plus connus.

- **Le folpel** est un fongicide anti-mildiou et excoriose, très utilisé dans le vignoble gaillacois. Il appartient à la famille chimique des dicarboximides (phtalimides) (figure 1.10).

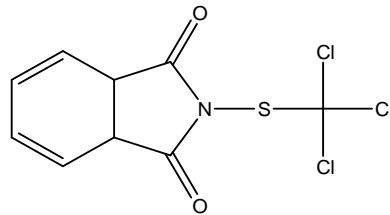


Figure 1.10 : Formule développée du folpel ($C_9H_4Cl_3NO_2S$), $M = 296,6 \text{ g mol}^{-1}$

Le folpel est une matière active de contact qui agit sur de nombreux champignons pathogènes en inhibant la germination des spores.

- Tout comme le folpel, **le métalaxyl-M** est un anti-mildiou, utilisé le plus souvent couplé à ce dernier. Il appartient à la famille chimique des amines (phénylamides) (Figure 1.11).

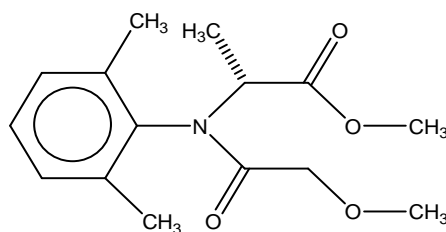


Figure 1.11 : Formule développée du métalaxyl-M ou méfenoxam ($C_{15}H_{21}NO_4$), $M = 279,3 \text{ g mol}^{-1}$

Le métalaxyl-M est une molécule active pénétrante (systémique) à diffusion par voie ascendante progressive et continue, qui possède une action spécifique sur la synthèse de l'ARN ribosomique des oomycètes (*Phytophthora*, *Plasmopora*).

- **Le fosétyl-Al** est un fongicide anti-mildiou, excorioso et black-rot. Ce sel appartient à la famille des phosphonates (Figure 1.12).

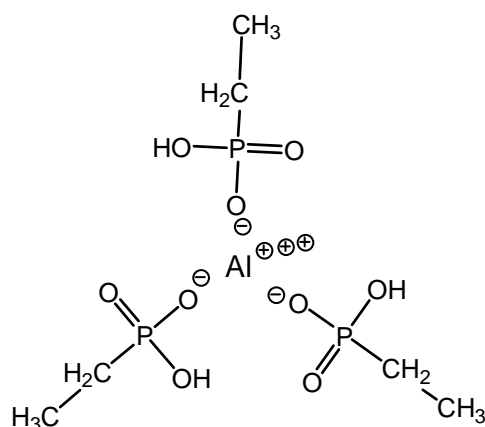


Figure 1.12 : Formule développée du fosétyl-aluminium ($C_6 H_{18} Al O_9 P_3$), $M = 354,1 \text{ g mol}^{-1}$

Ce fongicide est un stimulateur des défenses naturelles de la plante lui permettant de lutter contre les pathogènes (activité fongicide indirecte), il agit aussi de manière plus directe sur le champignon responsable du mildiou : *Plasmopora viticola*.

- **Le myclobutanil** est un fongicide permettant la lutte contre l'oïdium tout particulièrement et plus accessoirement contre le black-rot. Il appartient à la famille chimique des triazoles (Figure 1.13).

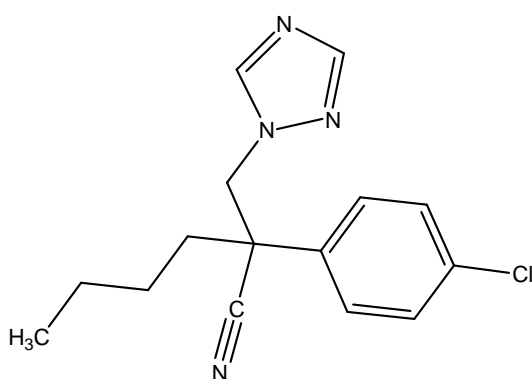


Figure 1.13 : Formule développée du myclobutanil ($C_{15} H_{17} Cl N_4$), $M = 288,8 \text{ g mol}^{-1}$

Le myclobutanil est un fongicide systémique, préventif et curatif de multiples maladies (oïdium, black-rot mais aussi rouille). Il agit par inhibition de la

déméthylation des stérols, entraînant ainsi un blocage de la synthèse de l'ergostérol nécessaire au bon développement des champignons.

1.2.3 Les insecticides

Afin de s'affranchir des insectes nuisibles et ravageurs de la vigne, la stratégie « insecticide » choisie pour la parcelle obéit aux techniques les plus utilisées actuellement en protection du vignoble. Il s'agit d'un épandage alternatif d'un insecticide organophosphoré (le chlorpyrifos) et d'un pyréthrianoïde de synthèse (la λ -cyhalothrine).

La lutte contre les ravageurs s'avère indispensable. Les insectes nuisibles sont en effet responsables des pertes de rendement et d'une baisse de qualité de la production viticole (**Kreiter et al., 2008**).

Les **tordeuses de la grappe** : Eudémis (*Lobesia botrana*) et Cochylis (*Eupoecillia ambiguella*) diminuent la production par attaque des grappes, favorisant la pénétration de champignons et le développement de pourritures.

Les **chenilles des pyrales de la vigne** (*Sparganothis pilleriana*) s'attaquent aux feuilles, dont elles se nourrissent, et les dégâts causés peuvent ainsi être très importants (destruction complète de certaines feuilles à l'extrémité des rameaux).

Les **cicadelles de la flavescence dorée** (*Empoasca flavescens*) sont vectrices de la maladie de la flavescence dorée. Les **cicadelles vertes** sont responsables de blessures sur la plante par leurs piqûres d'alimentation qui entraînent des effets sur la physiologie de la vigne : réduction de la surface foliaire efficace, retard de veraison, retard et diminution de la maturation des raisins, mauvais aoûtement des bois.

Les **thrips** (*Drepanothrips reuteri*) sont à l'origine de piqûres de nutrition ou de ponte, et des phénomènes de coulure sur grappes conduisant à une perte de rendement.

Les **cochenilles floconneuses de la vigne** (*Pulvinaria vitis*) sont des insectes piqueurs et suceurs, qui absorbent la sève du végétal. Par suite de leur pullulation, les feuilles et rameaux atteints sont peu à peu recouverts d'une croûte, et finissent par se dessécher; le cep s'épuise rapidement et la fructification devient défectueuse. La vigne est alors en proie au développement des maladies fongiques.

- **Le chlorpyrifos** est un insecticide ayant en viticulture une action sur les ravageurs de la vigne que sont les tordeuses, les cicadelles, les thrips et les cochenilles. Le chlorpyrifos-éthyl appartient à la famille chimique des organophosphorés (Figure 1.14).

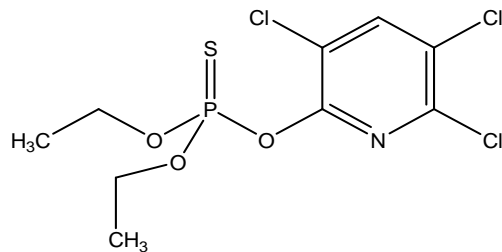


Figure 1.14 : Formule développée du chlorpyrifos-éthyl (C₉ H₁₁ Cl₃ N O₃ P S), M = 350,6 g mol⁻¹

Le chlorpyrifos-éthyl agit par contact, ingestion et inhalation sur un grand nombre d'insectes néfastes en viticulture. Il inhibe l'activité catalytique des cholinestérases (ChE), enzymes qui régulent la transmission de l'influx nerveux entre cellules nerveuses au niveau de la synapse. En effet, l'acétylcholine est un neurotransmetteur aux niveaux des communications nerveuses ou neuro-musculaires. La cholinestérase a pour fonction de catalyser l'hydrolyse de ce neuromédiateur de façon à ce que la stimulation du récepteur cesse, ce qui libère la synapse pour une transmission ultérieure. Le chlorpyrifos-éthyl, en tant qu'inhibiteur se fixe de manière irréversible sur la ChE à la place de l'acétylcholine et empêche ainsi l'arrêt de la transmission de l'influx nerveux ; l'insecte est alors victime d'une tétanie neuro-musculaire entraînant sa mort (**Charpentier et al., 2000**).

- **La λ-cyhalothrine** est un insecticide permettant la lutte contre différents ravageurs du vignoble notamment les pyrales, les tordeuses, les cicadelles et les thrips. Elle appartient à la famille chimique des pyréthriinoïdes de synthèse (Figure 1.15).

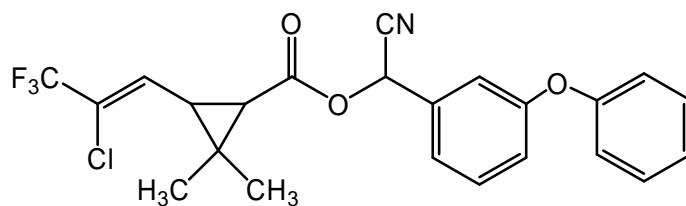


Figure 1.15 : Formule développée de la λ -cyhalothrine ($C_{23} H_{19} Cl F_3 N O_3$), $M = 449,9 \text{ g mol}^{-1}$

La λ -cyhalothrine agit à faibles doses par contact et ingestion sur un grand nombre d'insectes ravageurs en viticulture. Elle possède une action frénatrice sur les acariens et ovicide sur les lépidoptères. Il s'agit d'un modulateur des canaux sodium. En effet, ce pyréthriinoïde provoque chez les arthropodes ravageurs un effet « *Knock down* » (Kd). L'organisme cible présente des mouvements non coordonnés et entre ensuite en ataxie plus ou moins réversible suivant l'insecticide et la dose utilisée. D'un point de vue moléculaire, l'effet Kd est dû à la fixation du pyréthriinoïde sur le canal sodium «voltage-dépendant», situé sur la membrane plasmique des cellules nerveuses.

1.2.4 Propriétés physico-chimiques des molécules

Les molécules chimiques appliquées sur la parcelle pour une protection phytosanitaire du vignoble appartiennent toutes à des familles chimiques différentes. De ce fait, leurs propriétés physico-chimiques sont spécifiques. Celles-ci sont résumées dans le tableau 1.4.

Tableau 1.4 : Caractéristiques des molécules de l'étude

	Solubilité dans l'eau (mg L ⁻¹)	DT 50 au champ à 20°C (jours)	Koc moyen (cm ³ g ⁻¹)	Log P (pH 7 ; 20°C)	CL 50 (<i>Eisenia</i>) 14 j d'exposition (mg kg ⁻¹ de sol)
Flazasulfuron	2100	10	80,9	- 0,06	> 15,75
Métalaxyl	26000	43	50	1,71	830
Chlorpyrifos	1,05	11	16893	4,7	129
Folpel	0,8	2	21866	3,11	> 1000
Myclobutanil	142	35	225,7	2,94	> 1000
λ-cyhalothrine	0,004	25	157000	7	> 1000
Flumioxazine	1,79	20	889	2,55	> 982
Glyphosate	10500	30	3404	-3,2	> 480
Diquat	712000	5500	2184750	-4,6	130
Fosétyl-Al	111300	0,04	1703	-2,11	> 1000

Sources :

Agritox, 2006 ; University of Hertfordshire, 2008

La **solubilité dans l'eau** d'une molécule traduit sa facilité de dissolution après application. Les molécules les plus hydrosolubles seront les plus facilement entraînées vers la solution du sol.

Le paramètre **DT 50** au champ est le temps nécessaire à la dissipation de 50 % d'une substance dans des conditions aérobies. Il reflète ainsi la vitesse de dégradation d'une molécule dans l'environnement. D'après **Barriuso (2004 a)**, une molécule se dégrade rapidement si son DT50 est inférieur à 21 jours. Elle sera persistante dans le sol si le DT 50 est supérieur à 60 jours.

Le **Koc** est le coefficient de partage carbone organique/eau qui traduit l'adsorption des substances sur les matières organiques du sol : c'est un coefficient d'adsorption standardisé par rapport à la teneur en carbone organique du sol. Il caractérise l'affinité des molécules non ioniques pour les sols. Un produit ayant un Koc élevé (arbitrairement supérieur à 500) est fortement adsorbé sur les colloïdes du sol et possède ainsi une mobilité réduite dans le sol sous forme soluble. Il reste toutefois mobilisable sous forme de molécules adsorbées à la surface des particules de sol,

pouvant être entraînées vers les milieux aquatiques où elles forment des matières en suspension : MES (**Voltz et Louchart, 2001**).

Le **log P** (log K_{ow}) est le logarithme du coefficient de partage n-octanol / eau ; il est déterminé à partir de la mesure de la solubilité différentielle de composés chimiques dans deux solvants, le n-octanol et l'eau. Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule. En effet, si Log P est positif et très élevé, cela exprime le fait que la molécule considérée est bien plus soluble dans le n-octanol que dans l'eau, ce qui reflète son caractère lipophile, et inversement.

Enfin, la **CL 50** (concentration létale entraînant la mort de 50 % des individus) est un indicateur quantitatif de la toxicité d'une substance. La CL50 est exprimée ici chez les lombrics du genre *Eisenia* après 14 jours d'exposition.

Ainsi, la prise en compte de l'ensemble de ces paramètres permet de déterminer *a priori* le comportement d'une molécule dans le sol et de ce fait, le risque de pollution environnementale. Toutefois, ces constantes et le devenir des molécules sont modulés par les caractéristiques du sol, le climat de la région concernée et les conditions d'usage de ces produits phytosanitaires.

2 Les transferts de produits phytosanitaires en agriculture, et plus particulièrement en viticulture

La contamination de l'air, des sols et des eaux par les pesticides largement utilisés en **agriculture** est aujourd'hui plus que jamais au centre de tous les débats relatifs à une protection de l'environnement. Il s'agit d'un problème chronique et généralisé à de nombreuses régions en France mais aussi à l'étranger (**Louchart, 1999**).

En effet, l'application d'une molécule en traitement phytosanitaire d'une culture peut souvent être à l'origine d'une contamination environnementale. Outre les contaminations ponctuelles possibles au cours de la préparation de la bouillie ou du rinçage du matériel, les flux de pollution peuvent être d'origines diverses : la dérive de pulvérisation pendant l'application, le ruissellement de surface, les écoulements de sub-surface naturels (liés à une rupture de perméabilité), ou artificiels (liés au

drainage artificiel des sols) ou encore, les échanges entre une nappe contaminée (nappe superficielle notamment) et le cours d'eau (**Gouy et al., 2007**).

2.1 Devenir des pesticides après application

L'évolution des pesticides dans l'environnement dépend de leurs propriétés physico-chimiques (solubilité, Koc, DT 50...) ainsi que des caractéristiques pédo-climatiques et topographiques du terroir (structure, texture du sol, MO, biodiversité, microorganismes...).

Outre les phénomènes de dérive lors de l'application, les molécules peuvent se volatiliser entraînant ainsi une pollution atmosphérique (Figure 1.16). Elles sont également potentiellement photodégradées par la lumière du soleil.

Toutefois, ces molécules peuvent également être entraînées par l'eau de pluie et être alors à l'origine d'une pollution des eaux de surface mais également des eaux d'infiltration et du sol.

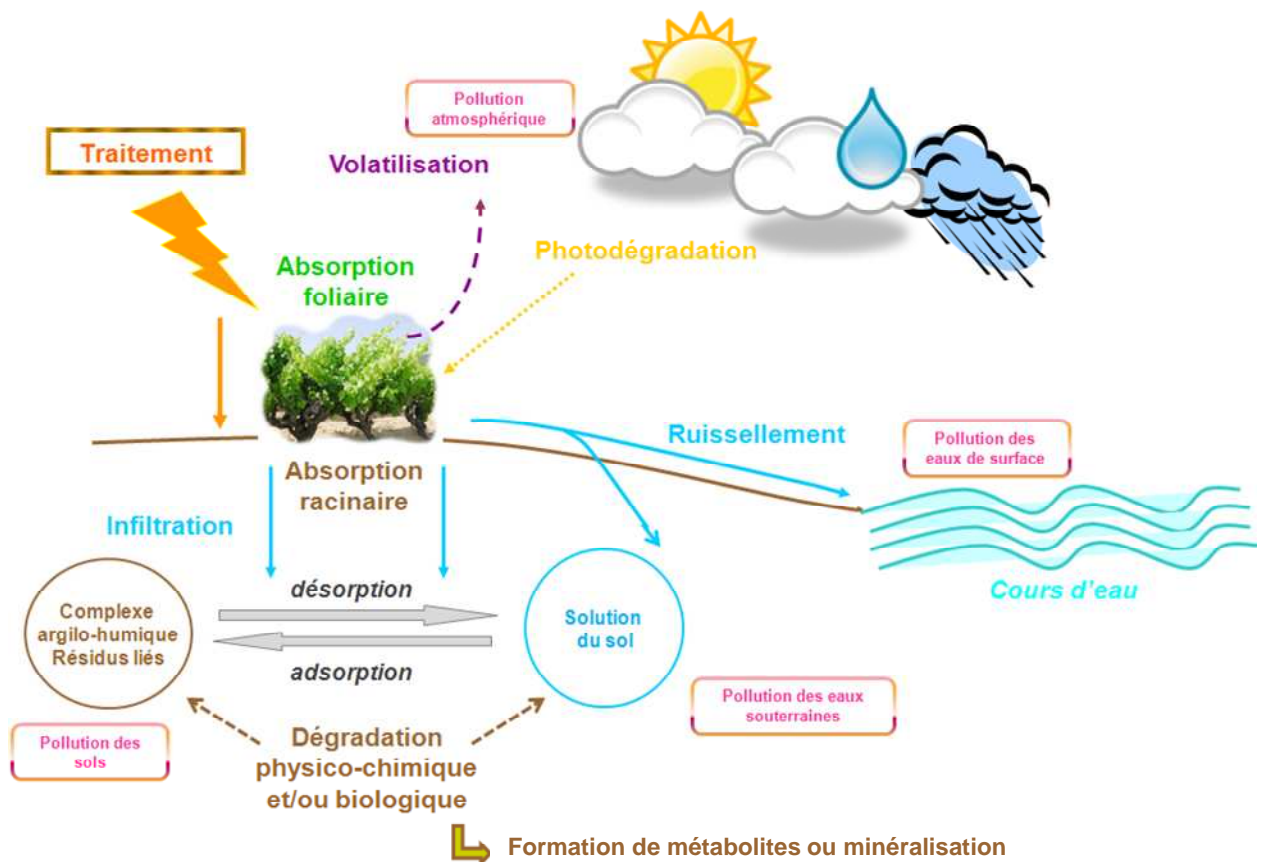


Figure 1.16 : Devenir des pesticides dans l'environnement après application en vignoble

La qualité des eaux de surface et d'infiltration est alors très suivie au regard d'une possible contamination par les pesticides.

Le **transfert des pesticides vers les eaux souterraines** concerne les molécules en solution et celles mobilisées par la désorption et la dissolution (Figure 1.16). Ce transfert correspond au passage des produits phytosanitaires de la zone non saturée comprenant les couches superficielles du sol vers la zone saturée ou aquifère (**Colin, 2000**). Il se fait par divers processus : par convection dans la phase liquide essentiellement, dans la phase gazeuse également si le produit est volatil et par diffusion dans le sol. La percolation de l'eau dans le sol entraîne ainsi la lixiviation des molécules phytosanitaires en fonction des caractéristiques de ces produits, des propriétés du sol, de la vitesse d'infiltration et de l'épaisseur de la zone non saturée (**Van der Werf, 1996**). Certains processus comme la rétention (paramètre Koc) ou la dégradation d'une molécule dans le sol (DT50) limitent cependant ce transfert.

En effet, une fois qu'un pesticide est appliqué, il subit des **transformations d'ordre biologique ou physico-chimique**, en fonction des conditions biotiques et abiotiques des sols et de ses caractéristiques intrinsèques (Figure 1.16). Les **dégradations chimiques** sont essentiellement des photodécompositions, ou des dégradations au contact des matières organiques ou des argiles du fait d'un effet combiné des conditions acides et des phénomènes d'adsorption (**Armstrong et al., 1987 ; Yaron, 1989**). La majeure partie des dégradations ayant lieu au niveau de la zone racinaire sont d'origine bactérienne (**dégradations biologiques**). Les microorganismes du sol ont un pouvoir détoxifiant des plus puissants (**Guimont, 2005**). Ces **biodégradations** conduisent alors à la formation de métabolites ou à une minéralisation totale de la molécule-mère. Il est important de noter que la matière organique d'un sol favorise la biodégradation en maintenant une population active de microorganismes mais qu'elle peut être aussi responsable d'une accélération des processus d'adsorption (**Barriuso et al., 2004 b**). Cependant, les pesticides qui tombent et s'infiltrant dans le sol peuvent également être soumis à des processus de rétention. Certaines molécules peuvent former avec le sol des liaisons irréversibles conduisant à la formation de « **résidus liés** (aux acides fulviques, humiques et à l'humine) **non extractibles** » par les solvants organiques (**Bertin et Schiavon, 1989**). Toutefois, bien que les résidus liés soient stabilisés, il n'est pas exclu de penser qu'il puissent être remobilisés dans les sols (**Barriuso et al., 2004 b**).

De part leurs propriétés physico-chimiques, les molécules phytosanitaires, notamment les herbicides, sont souvent hydrosolubles et aisément exportée par les eaux d'infiltration ou de ruissellement. **Le transfert vers les eaux superficielles** est modulé par des processus d'érosion et d'entraînement des particules du sol sur lesquelles sont retenues les molécules les plus hydrophobes (**Léonard, 1990**). De la même façon, le transfert vers les eaux d'infiltration dépend des processus de pénétration et d'infiltrabilité de l'eau dans un sol.

2.2 Le drainage agricole et ses effets sur les transferts

Le drainage agricole artificiel est un dispositif, composé de tuyaux perforés enterrés, qui récolte l'eau excédentaire des sols et l'évacue vers des fossés puis dans la rivière (Figure 1.17). En évitant que l'eau stagne et n'engorge les sols, le drainage permet une meilleure valorisation des terres agricoles.

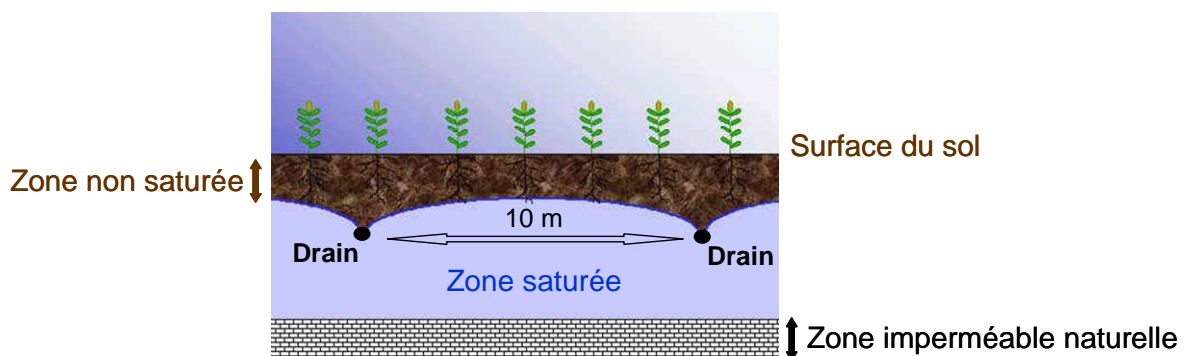


Figure 1.17 : Schéma d'un dispositif de drainage agricole

Les arguments agronomiques et économiques en faveur du drainage en agriculture sont nombreux : diversification des cultures, obtention de meilleurs rendements, mécanisation du travail et pâture possible plus longtemps dans l'année (**DRAF-SRPV Lorraine, 2005**).

Mais le drainage agricole, en modifiant les conditions de l'écoulement de l'eau, agit sur les transferts de produits phytosanitaires. En effet, les drains interceptent une partie des écoulements verticaux pour les amener vers le réseau hydrographique de surface (**Schiavon et al., 1996**) ; ils génèrent également des circulations

préférentielles rapides favorables aux transports des pesticides appliqués en surface (**Evans et al., 1995 ; Mercier, 1998**).

Ainsi le drainage, en favorisant l'écoulement vertical, limite le ruissellement de surface (**Zimmer, 1995**). En diminuant considérablement les phénomènes de ruissellement (diminution pouvant aller jusqu'à 90% ; **Nedelec, 1999**), le drainage permet de limiter les pertes de sol ainsi que le transfert du phosphore et de certains produits phytosanitaires (molécules à faible solubilité) au milieu aquatique (**Lesaffre et Arlot, 1991**). **Bengtson et al. (1990)** rapportent par exemple une diminution des pertes en atrazine de 55 % à l'échelle d'une parcelle agricole.

Toutefois, la présence de réseaux de drainage accentue la quantité de produits phytosanitaires susceptibles d'atteindre les milieux aquatiques souterrains en favorisant une circulation rapide de l'eau, ce qui soustrait les molécules aux phénomènes de dégradation dans les sols et constitue un risque non négligeable de transfert vers des zones plus profondes (**Gouy et al., 2007**).

L'impact du drainage sur le transfert des produits phytosanitaires apparaît donc variable selon les situations, en fonction des types de sols et des caractéristiques pédoclimatiques de la parcelle et de la période considérée (**Colin, 2000**). Les impacts ne sont pas encore bien évalués et encore moins quantifiés (**Nedelec, 2005**).

Cependant, à partir de situations drainantes expérimentales, des modèles de transferts ont pu être réalisés. Ces modèles ont ainsi permis de mieux connaître mais aussi limiter au maximum ce phénomène de pollution récurrent des eaux. Parmi les études les plus récentes, nous pouvons citer celles de **Gao et al. (2008)** suivant le devenir des pesticides organochlorés dans les eaux de surface en Chine. Les travaux de **Siimes et al. (2006)** mettent en évidence le transfert d'herbicides dans des sols agricoles (culture de betteraves sucrières) en Finlande. De même, **Kalita et al. (2008)** font état d'une pollution des eaux de drainage par des pesticides en culture de maïs et de soja. Ces dernières années ont également vu le développement de modèles ayant pour objectif de simuler les transferts de pesticides dans le sol en fonction des doses et des dates d'application dans le but de connaître et prévoir les risques écologiques associés (**Holman et al., 2004 ; Whelan et al., 2007 ; Renaud et Brown, 2008**).

2.3 Transferts, viticulture et entretien des sols

Le sixième bilan publié en 2004 par l'Institut Français de l'Environnement fait apparaître une contamination généralisée des eaux par les pesticides agricoles : ceux-ci sont présents dans 80 % des stations concernées pour les eaux de surface et 57 % pour les eaux souterraines.

La **viticulture** utilisant 20 % des quantités de produits phytosanitaires épandus sur toute la France, les vignobles français sont très touchés par cette pollution environnementale. Aussi, la contamination diffuse de l'environnement en viticulture et le suivi des transferts ont fait l'objet de multiples études (**Louchart et al., 2000 ; Louchart et al., 2001 ; Louchart et al., 2004 ; Hildebrandt et al., 2008**).

Par ailleurs, la culture de la vigne offre un taux d'occupation des sols assez réduit et les transferts de molécules actives vers les eaux sont accélérés (**Andrieux et al., 1996**). Différents modes d'**entretien des sols** existant en agriculture, il semble alors évident d'essayer de caractériser l'influence d'une pratique culturale sur le ruissellement ou l'infiltration de l'eau. Les travaux de **Van Dijck et Van Asch (2001)** s'intéressent par exemple aux effets du passage répétitif du tracteur dans les vignobles sur l'infiltration de l'eau. L'objectif est de dégager les avantages ou contraintes de chacune de ces pratiques en relation avec la contamination des eaux de surface et souterraines. Par exemple, **Landry et al. (2005)** ont modélisé l'influence de l'enherbement et du labour sur le transfert de l'herbicide glyphosate et de son principal métabolite, l'AMPA.

La majorité des études répertoriées à l'heure actuelle qui abordent l'influence de la pratique culturale sur les transferts de pesticides en milieu viticole concernent essentiellement le ruissellement (**Lacas et al., 2005**).

3 Impact écotoxicologique de la pollution des sols

Le sol représente la couche superficielle, meuble, de la croûte terrestre, résultant de la transformation de la roche mère enrichie par des apports organiques. On différencie le sol de la croûte terrestre par la **présence de vie**.

Autrefois considéré comme un facteur abiotique, nous savons aujourd'hui qu'un sol n'existe que lorsque des organismes vivants et des matières organiques s'ajoutent aux minéraux issus de la décomposition de la roche (**Fiche ITAB, Activité biologique des sols, 2003**).

Le sol est une ressource naturelle, non ou lentement renouvelable constituée d'une fraction organique et d'une fraction minérale, qui représente l'ensemble des produits de la dégradation physique puis chimique de la roche mère. La fraction organique se répartit en 4 groupes :

- la matière organique vivante, animale et végétale
- les débris d'origine végétale (résidus végétaux, exsudats) et animale (déjections, cadavres) qui constituent la matière organique fraîche
- des composés organiques intermédiaires, appelés matière organique transitoire (issue de l'évolution de la matière organique fraîche)
- des composés organiques stabilisés, les matières humiques, provenant de l'évolution des matières précédentes.

Les caractéristiques physiques, chimiques et biologiques du sol (porosité, pH, disponibilité des minéraux et de la matière organique...) conditionnent donc le fonctionnement de tout l'écosystème (**Deprince, 2003**). Mais, à l'inverse, les facteurs climatiques, le type de végétation, la présence ou l'absence de faune, la nature de la roche mère, influent également sur la formation et l'évolution des sols.

La plupart des transformations d'intérêt agronomique qui ont lieu dans un sol sont d'origine biochimique. Leur déroulement est conditionné par la présence des êtres vivants et de leurs enzymes. Ainsi, afin d'évaluer la qualité d'un sol, il sera nécessaire de se référer à son fonctionnement biologique.

3.1 Les acteurs de la vie des sols

3.1.1 La biomasse microbienne

Depuis de nombreuses années, les travaux de l'INRA et particulièrement ceux de l'unité de Microbiologie du Sol de Dijon se sont portés sur la mesure de l'activité biologique du sol (**Chaussod, 1996**) à travers l'étude de la biomasse microbienne. La notion de biomasse microbienne recouvre l'ensemble des microorganismes du

sol : bactéries, champignons, protozoaires, etc. Ceux-ci participent en effet à de nombreuses biotransformations, à des dégradations dans les sols. Ils sont également responsables des caractéristiques d'agrégation des sols (**Chantigny et al., 1997**). Ainsi, la biomasse microbienne change dès que son environnement change. Donc, dans un sol agricole, chaque changement dans la gestion agronomique des parcelles aura un impact sur la biomasse microbienne. En d'autres termes, mesurer la biomasse microbienne des sols permet de vérifier l'influence des pratiques agricoles sur les caractéristiques des sols.

Des études ont montré des changements dans la biomasse du sol suite :

- à des changements de systèmes culturaux, apports de produits organiques, travail du sol, mise en place d'un couvert végétal (**Hoffmann et al., 1997 ; Hu et al., 1997 ; Ritz et al., 1997 ; Salinas-Garcia et al., 1997**),
- à des fertilisations (**McCarty et Meisinger, 1997 ; Salinas-Garcia et al., 1997**),
- à des changements de pH (**Baath et Anderson, 2003**),
- à des pollutions (métaux lourds, hydrocarbures, produits phytosanitaires par exemple...) (**Harden et al., 1993**),
- à des stress (sécheresse, etc.) (**Hoffmann et al., 1997**).

Par ailleurs, il existe un lien étroit entre la biomasse microbienne, la fertilité du sol, le taux de décomposition et la minéralisation azotée (**Carter et al., 1999; OECD, 2004; Smith et Paul, 1990**).

La biomasse microbienne totale apparaît alors comme un paramètre clef de l'écosystème (**Epelde et al., 2008**), même si ce n'est pas l'indicateur écologique le plus sensible de la qualité du sol (**Wedding et al., 2005**).

3.1.2 La faune du sol

D'autres indicateurs peuvent être suivis pour apprécier la qualité d'un sol. En effet, le sol abrite un grand nombre d'organismes. La faune du sol ne représente que 0,08 % de sa masse, pourtant on ne compte pas moins de 260 millions d'individus par m² sur un sol de prairie. Il s'agit majoritairement d'invertébrés. Cette pédofaune est extrêmement diversifiée (**Deprince, 2003**) et classiquement divisée en trois catégories en fonction de la taille des organismes (**Bachelier, 1979**).

La **microfaune** est constituée des espèces de diamètre (ou de longueur) inférieur à 0,2 mm : des protozoaires, quelques espèces de rotifères terrestres, des tardigrades et des nématodes. Ces organismes vivent dans l'eau interstitielle du sol ; ils sont résistants à la sécheresse. Les protozoaires dans le sol se comptent en centaines de millions par mètre carré.

La **mésafaune** rassemble les invertébrés entre 0,2 et 4 mm : il s'agit d'acariens, de collemboles, de pseudoscorpions, de protoures, de diploures, de petits myriapodes (ces groupes se rassemblant sous le terme " micro-arthropodes "), de nématodes de plus grande taille et d'enchytréides.

Enfin, la **macrofaune** est composée des animaux entre 4 et 80 mm. Ce sont des lombriciens, des larves d'insectes (en majorité des larves de diptères et de coléoptères, mais aussi d'hémiptères et de lépidoptères), des cloportes, des myriapodes chilopodes et diplopodes, des mollusques gastéropodes (limaces et escargots), des chélicérates (araignées et opilions), et des hexapodes divers (hyménoptères formicidés, coléoptères, orthoptères, etc.). Lombriciens exceptés, la macrofaune occupe principalement la litière.

À ces trois catégories, on se doit d'ajouter la **mégafaune**, réunissant essentiellement les mammifères du sol de plus de 10 cm. Certains sauriens et ophidiens se terrent également parfois sous la litière.

On distingue également les habitants du sol selon la façon dont ils l'occupent : certains n'y vivent que de façon temporaire, soit qu'ils n'y réalisent qu'une partie de leur cycle de développement, comme de nombreuses espèces d'insectes, soit qu'ils s'y abritent de façon journalière ou saisonnière. D'autres animaux ont un mode de vie édaphique permanent : ils ne quittent jamais le sol, mais ils peuvent n'y être actifs que périodiquement.

Toute cette biocénose interagit avec le milieu qu'elle occupe : les animaux creusent, grattent, retournent la terre, mangent, éjectent leurs excréments, se reproduisent... Ces activités ont un impact sur la structure et la composition du sol. Les galeries et les chemins creusés aèrent le sol et augmentent le drainage de l'eau ; ce travail de bioturbation (action mécanique qui remue le sol) favorise également la dispersion des éléments minéraux et organiques dans les différentes couches du sol.

La vigne abrite une pédofaune diversifiée bien que ce ne soit pas la culture la plus riche. Toutefois, c'est une monoculture pérenne : elle constitue donc un terrain idéal pour les habitants du sol et de l'air (notamment pour les insectes ravageurs),

puisqu'elle offre de la nourriture à volonté et peu d'ennemis naturels, au contraire d'un écosystème naturel où beaucoup d'organismes coexistent.

Ainsi, en complément de la biomasse microbienne, l'étude de la macrofaune du sol en viticulture s'inscrit dans une démarche globale de suivi du fonctionnement biologique d'un sol. L'itinéraire technique agronomique (labour, enherbement...) et les épandages de produits phytosanitaires sont autant de facteurs qui peuvent agir sur cette faune du sol et moduler dès lors le fonctionnement biologique du sol.

Ainsi, plusieurs organismes ont été suivis comme espèces bioindicatrices de la qualité des sols, comme le grillon provençal *Gryllus bimaculatus* (Yoshimura *et al.*, 2005), mais surtout les oligochètes en sols agricoles (Pattison *et al.*, 2008 ; Suthar *et al.*, 2008) et plus précisément viticoles (Paoletti *et al.*, 1998).

Un bioindicateur est un indicateur constitué par une espèce végétale, fongique ou animale ou par un groupe d'espèces (groupe éco-sociologique) ou groupement végétal dont la présence (ou l'état) renseigne sur certaines caractéristiques écologiques (c'est à dire physico-chimiques, microclimatique, biologiques et fonctionnelle) de l'environnement, ou sur l'incidence de certaines pratiques (Garrec *et Van Haluwyn*, 2002).

Ainsi, les lombriciens possédant un grand nombre d'activités directement en relation avec l'état écologique d'un sol (Römbke *et al.*, 2005), sont souvent considérés comme de bons bioindicateurs de la pollution des sols.

Par ailleurs, ils remplissent de nombreuses conditions nécessaires à une étude approfondie d'un sol en tant qu'espèces sentinelles (Rivière, 1993) :

- ils sont faciles à « capturer », à élever en terraria, à observer,
- leur densité de population est suffisante, permettant des prélèvements qui ne modifient pas la structure ou l'importance numérique des populations,
- ils ont une aire de dispersion connue,
- ce sont des animaux de taille suffisante, permettant de pratiquer facilement des mesures de concentrations en polluants ou des analyses biochimiques,
- leurs voies d'exposition sont connues : nourriture, respiration, tégument,
- il est possible de disposer d'animaux témoins, non contaminés,
- enfin, il existe d'autres études écotoxicologiques et des références sur les mêmes espèces.

3.2 Lombriciens et étude écotoxicologique de la pollution du sol

Les vers de terre sont « ...*les intestins du sol* » – **Aristote (environ 330 av. J.-C.)**.

«Qu'il est merveilleux de penser que toute cette vaste étendue a déjà passé par le corps des vers de terre et y aura repassé encore après quelques années. La charrue est l'une des inventions les plus anciennes et les plus précieuses de l'homme, mais la terre a été et continue d'être labourée régulièrement par les vers de terre depuis bien longtemps. On peut douter qu'aucun autre animal n'ait jamais joué un rôle aussi important dans l'histoire du monde que ces créatures rudimentaires. » – **Darwin (1881)**.

3.2.1 Les lombriciens : biologie et place dans l'écosystème sol

Les lombrics sont des Eumétazoaires, Bilatériens, Protostomiens, Lophotrochozoaires, Eutrochozoaires, Spiraliens, Annelides, Oligochètes.

D'un point de vue écologique, les lombriciens correspondent au groupe de la macrofaune du sol le plus important en termes de biomasse et d'activité. Ils possèdent un grand nombre d'activités directement en relation avec l'état écologique d'un sol (**Römbke et al., 2005**) ; ils sont capables par leurs activités de changer leur habitat (Figure 1.18) ou même d'en créer de nouveaux pour les autres organismes (**Brown, 1995 ; Maraun et al., 1999**).

Détritivores, les vers de terre se nourrissent de la matière organique présente dans le sol qu'ils ingèrent. Le lombric participe alors au brassage des horizons organiques et minéraux, à l'aération et au drainage du sol.

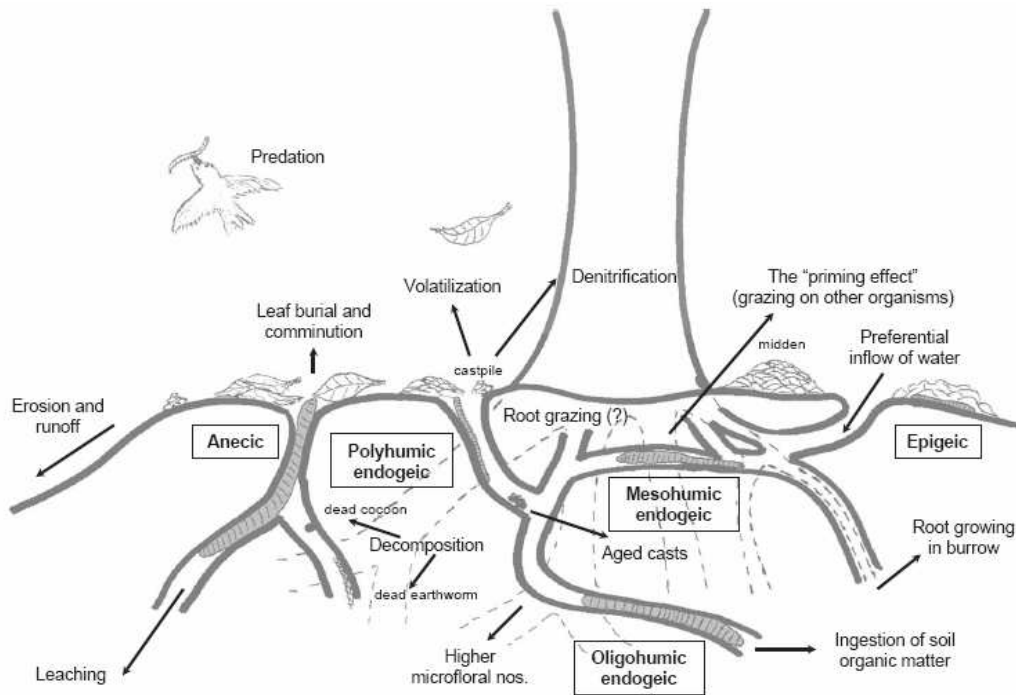


Figure 1.18 : Représentation schématique des relations fonctionnelles entre les vers de terre et leur environnement externe (Doube et Brown, 1998, Fig. 1, p. 180)

Ainsi, les lombrics sont de bons indicateurs de l'état de vie d'un sol pour différentes raisons (**Römbke et al., 2005**) :

- ils participent au fonctionnement de l'écosystème sol (décomposition et structure),
- grâce à leur comportement et leur morphologie, ils sont en contact à la fois avec la phase solide du sol et avec la phase aqueuse (directement en lien avec le cheminement des pesticides),
- la plupart des espèces de lombriciens sont très sensibles à de faibles niveaux de pollution,
- leurs réactions aux stress sont mesurables et reproductibles en champ mais surtout en laboratoire,
- à l'heure actuelle beaucoup de choses concernant leur biologie, leur écologie sont connues.

Selon **Bouché (1977)**, **Lee (1985)**, et **Edwards et Lofty (1977)**, on distingue 3 grands groupes écologiques de lombriciens (il existe en réalité de nombreux intermédiaires entre ces extrêmes).

Les épigés présentent des cycles de vie courts (1 à 2 ans) et sont soumis à une forte prédation. Ils sont typiques des sols de litière et de forêts, petits, grêles et rougeâtres. Ils se nourrissent de litière (en surface du sol) et de microflore mais ingèrent peu de sol.

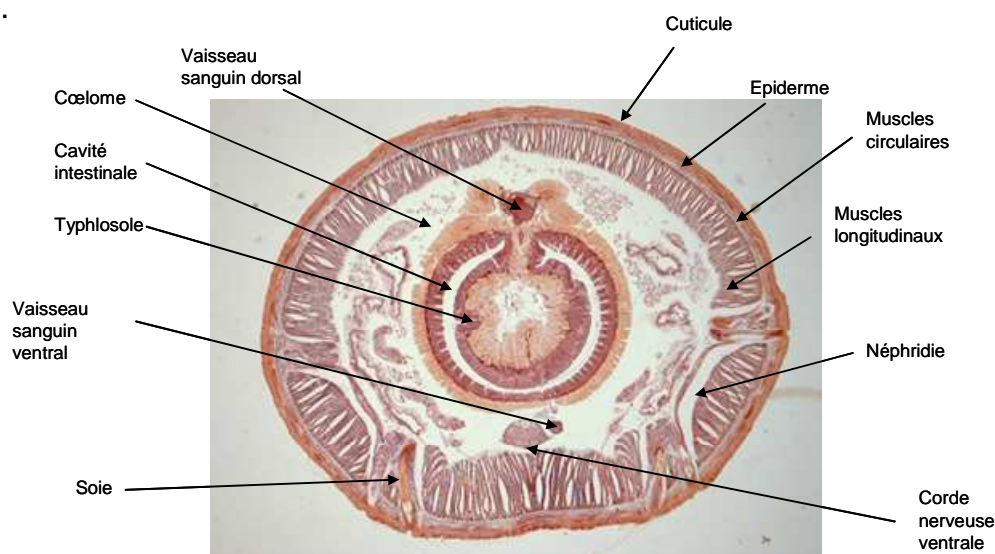
Les endogés creusent des galeries profondes et horizontales dans le sol. Ils sont de taille variable, dépigmentés, pourvus d'une musculature développée. De durée de vie moyenne, ils rentrent en diapause en cas de sécheresse. Ils se nourrissent essentiellement de feuilles en décomposition à la surface du sol et de sol.

Les anéciques ont un mode de vie mixte, ils creusent des galeries verticales. Ils sont longs et de couleur foncée, à vie longue (jusqu'à 10 ans), protégés dans leurs galeries. Ils se nourrissent de microflore et de sol plus ou moins enrichi de matière organique. Par ces mouvements verticaux, ils agissent fortement sur la structure du sol.

Les prédateurs des lombrics sont pour la majorité des oiseaux, des petits mammifères (taupes, musaraignes, hérissons, renards...), des sauriens, des ophidiens ou bien encore des amphibiens.

Au niveau morphologique, le corps des lombriciens se présente sous la forme d'un tube cylindrique annelé. En effet, les vers de terre ont une architecture métamérisée : ils ont une série d'unités répétées qui contiennent chacune une cavité interne remplie de fluide : le coelome.

Au niveau anatomique, chaque segment est organisé de la même façon (Figure 1.19).



D'après www.salinella.bio.uottawa.ca

Figure 1.19 : Coupe transversale d'un métamère de lombric

Ainsi, chaque segment est presque indépendant (muscles, système respiratoire et circulatoire, osmorégulation et gonades sont métamérisés). Les structures dérivées de l'endoderme ne sont pas métamériques, c'est le cas du tube digestif.

Tous les segments ont une organisation semblable sauf les 2 premiers (prostomium et péristomium, porteur de la bouche) et le dernier (pygidium).

Ce sont les critères morphologiques (parfois couplés à des caractères anatomiques) qui permettent la détermination des genres et des espèces de lombriciens.

La physiologie des lombriciens a été largement décrite par **Edwards et Lofty, 1977 ; Laverack, 1963 et Tomlin, 1980**. Les lombriciens possèdent un « squelette » hydrostatique dû à la présence du coelome, ce qui leur permet de se déplacer par des mouvements péristaltiques du corps. L'extension-rétraction des soies dans le substrat vient compléter la contraction des muscles pour un enfouissement dans le sol.

La respiration se fait grâce à un phénomène de diffusion des gaz à travers la cuticule perméable et constamment humidifiée par le mucus produit par les glandes épidermiques. Ainsi dissous dans le mucus, l'oxygène diffuse à travers la surface du corps du lombric puis dans les capillaires très ramifiés de l'animal où il est transporté par un pigment en solution dans le sang : l'hémoglobine. Le lombricien s'asphyxie quand sa peau s'assèche ou s'il est prisonnier de l'eau.

Le système circulatoire fermé est constitué de capillaires entourant le tube digestif, de 2 gros vaisseaux sanguins longitudinaux (le dorsal qui transporte le sang vers l'avant du corps, et le ventral), ainsi que des « cœurs » latéraux jouant le rôle de pompes.

Leur pharynx musculieux leur permet d'avaler la terre qui est par la suite broyée dans le gésier. Le bol alimentaire transite dans le tube digestif par péristaltisme. Le typhlosole, repli dorsal du tube digestif, augmente la surface de contact entre la lumière du tube digestif contenant les aliments en cours de digestion et les capillaires sanguins. Les excréments des lombriciens (turricules) sont souvent visibles à la surface du sol.

Les métanéphridies sont les organes de l'excrétion et de l'osmorégulation.

Le système nerveux des annélides présente une concentration de ganglions dans la partie antérieure de l'organisme (début de céphalisation), et une chaîne nerveuse ventrale. Les structures sensorielles sont assez réduites, mais les vers de terre

possèdent toutefois des organes photorécepteurs et des soies jouant le rôle d'organes tactiles.

La reproduction est variable selon l'habitat naturel du lombric. A maturité sexuelle du ver, un renflement, appelé clitellum, se développe par multiplications cellulaires. Hermaphrodites, les lombriciens s'accouplent tête-bêche, le clitellum de chaque ver secrète alors du mucus. La fécondation est externe. Le tube muqueux se détache du ver avec le cocon. Pendant la croissance embryonnaire, le cocon protège les œufs et contient les réserves nutritives. Quand les embryons ont consommé toute la matière nutritive, ils occupent la totalité du cocon et sont prêts à en sortir par une des extrémités.

Les lombriciens ont fait l'objet de nombreuses études tant sur un plan écologique (dénombrement, reproduction, taux de survie...) (**Bauer et Römbke, 1997 ; Ismail et al., 1997 ; Capowiez et al., 2003 ; Mosleh et al., 2003 ; Ammer et al., 2006**) qu'en tant que bioindicateurs de la qualité d'un sol (**Paoletti et al., 1998 ; Pattison et al., 2008 ; Suthar et al., 2008**).

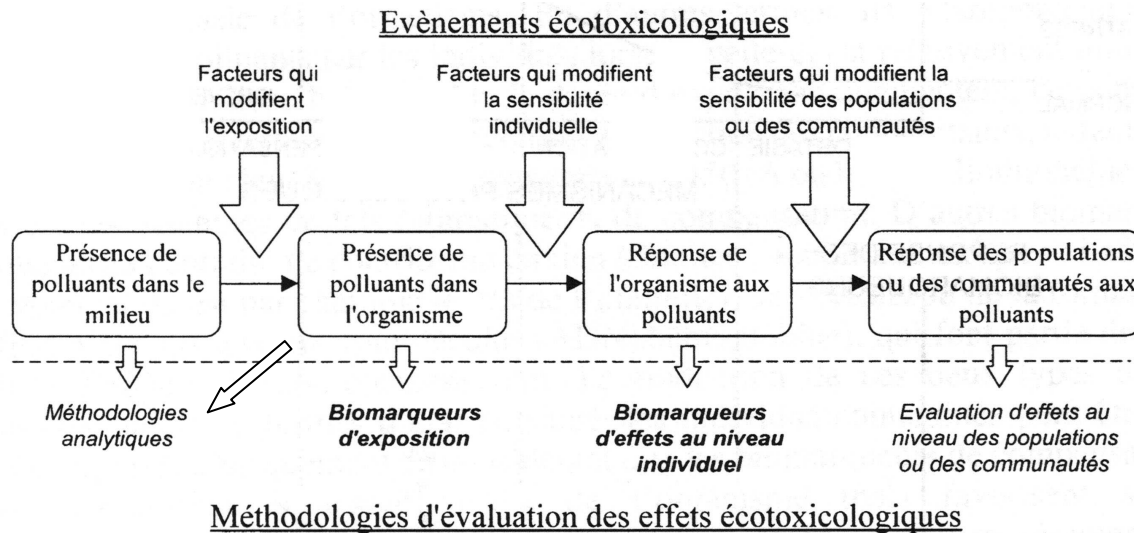
Enfin, les oligochètes terrestres s'avèrent être également un groupe largement utilisée pour le suivi écotoxicologique de la pollution d'un sol par l'analyse de biomarqueurs enzymatiques témoins des perturbations de leur état physiologique (**Saint-Denis et al., 2001 ; Brown et al., 2004 ; Lukkari et al., 2004 ; Xiao et al., 2006 ; Gambi et al., 2007 ; Reinecke et al., 2007**).

3.2.2 Les biomarqueurs en écotoxicologie terrestre

Dans le contexte de l'exposition des invertébrés aux pesticides en viticulture, il semble intéressant d'essayer de caractériser les perturbations des organismes par des approches biochimiques à travers le suivi de biomarqueurs.

Un **biomarqueur** est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (**Lagadic et al., 1997**).

Un biomarqueur mesuré au niveau de l'individu n'a de signification écotoxicologique que s'il permet de décrire, expliquer et même parfois prédire les effets des polluants sur les populations évoluant dans cet environnement contaminé (Figure 1.20).



Source : Lagadic et al., 1997

Figure 1.20 : Représentation des méthodologies faisant appel à l'utilisation des biomarqueurs dans l'évaluation des risques écotoxicologiques

On distingue généralement 3 types de biomarqueurs (**Lagadic et al., 1997**):

- les **biomarqueurs d'exposition** qui indiquent que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme. Généralement, ces biomarqueurs sont le résultat de l'interaction du polluant avec des molécules biologiques.
- les **biomarqueurs d'effet** qui permettent de montrer que le polluant a pénétré dans l'organisme et a exercé un effet toxique ou non sur une cible. Ils peuvent être spécifiques ou non.
- les **biomarqueurs traduisant une variation de la sensibilité** qui peuvent mettre en évidence des phénomènes de résistance.

Ainsi, chez les Invertébrés, sont mesurés des biomarqueurs mettant en évidence :

- des réponses génotoxiques (tests micronoyaux, adduits à l'ADN)
- des réponses neurotoxiques (activité cholinestérase)
- la capacité des individus à mobiliser des systèmes de défense en présence de toxiques : biotransformation, métabolisation ou détoxification enzymatique (métallothionéines, Glutathion-S-transférase : GST,

éthoxyrésorufine O-déséthylase : EROD, etc.) ; réaction du système antioxydant (superoxyde dismutase, catalase, etc.) ; réactions immunitaires...

Nous nous focaliserons dans cette étude sur certains des biomarqueurs les plus utilisés actuellement sur les organismes aquatiques et terrestres et notamment les lombriciens (**Saint-Denis et al., 2001 ; Brown et al., 2004 ; Lukkari et al., 2004 ; Xiao et al., 2006 ; Gambi et al., 2007 ; Reinecke et al., 2007**). Ces biomarqueurs sont décrits ci-dessous.

3.2.2.1 Activité cholinestérase (ChE)

➤ **Rôle de l'enzyme dans l'organisme**

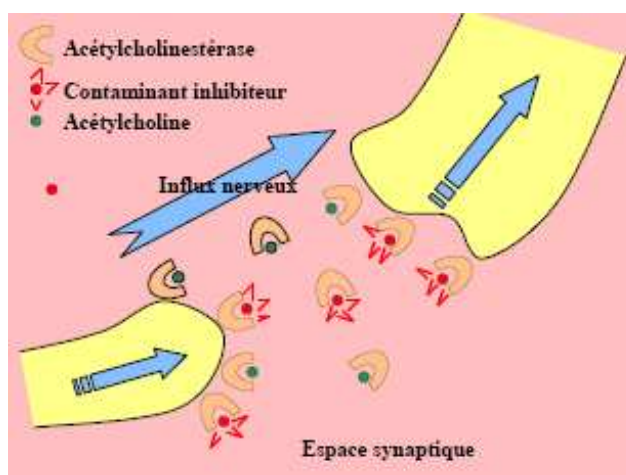
Dans les jonctions inter-neuronales ou neuro-musculaires, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, qui permet la transmission de l'influx nerveux. Libéré dans l'espace synaptique, ce neurotransmetteur se fixe sur les récepteurs cholinergiques au niveau de la membrane post-synaptique. L'interaction de l'acétylcholine avec le récepteur entraîne une dépolarisation membranaire à l'origine du potentiel d'action.

L'acétylcholinestérase est l'enzyme qui dégrade par hydrolyse ce médiateur chimique afin de stopper rapidement la stimulation du récepteur (**Bocquené et Galgani, 1998**).

A partir du gène qui les code, les cholinestérases sont exprimées sous plusieurs formes moléculaires dont les proportions sont spécifiques de chaque tissu, de chaque espèce et du stade de développement de l'individu. On distingue ainsi des formes solubles intracellulaires, des formes sécrétées extracellulaires et des formes membranaires ancrées, majoritaires. Selon **Rault et al. (2007)**, l'activité cholinestérase est caractérisée en utilisant différents substrats et inhibiteurs. Les principales cholinestérases sont des acétylcholinestérases dans la majorité des espèces de lombriciens. Leur caractérisation s'effectue par une hydrolyse préférentielle de l'acétylthiocholine et une inhibition par l'esérine. La butyrylthiocholinestérase (BuChE) et la propionylthiocholinestérase (PrChE) sont des isoformes également présentes mais en proportion plus limitées chez les lombriciens. Ainsi, le terme cholinestérase (ChE) est plus génériquement employé.

➤ **Action des produits phytosanitaires sur l'activité ChE**

Les insecticides organophosphorés et les carbamates sont les principaux contaminants de l'environnement qui inhibent l'activité acétylcholinestérase (**Reinecke et al., 2007**). Cette inhibition entraîne une accumulation d'acétylcholine dans l'espace synaptique (Figure 1.21), l'influx nerveux est alors transmis de manière permanente, la membrane reste dépolarisée et la synapse se trouve bloquée. Le blocage de toutes les synapses du système nerveux central entraîne la mort de l'individu. Le blocage des synapses neuro-musculaires conduit à la tétanie de l'animal, celui-ci est asphyxié et finit par mourir...



Source : www.suivi-erika.info

Figure 1.21 : Inhibition de l'activité acétylcholinestérase par un contaminant

L'inhibition de l'acétylcholine par les organophosphorés est irréversible, elle est liée à la phosphorylation du site estérasique : les organophosphorés sont des « substrats suicides ». Ils sont parfois responsables d'une neuropathie retardée chez les insectes : la paralysie apparaît quelques temps après l'exposition à des doses sublétales (**Bocquené et al., 1997**).

Les carbamates, eux, forment un complexe Enzyme-Inhibiteur avec carbamylation du groupement hydroxyle de la sérine impliquant l'inhibition. Cette inhibition est réversible, il y a régénération spontanée de l'enzyme carbamylée.

D'autres familles d'insecticides inhibent aussi cette activité enzymatique bien que leur principale toxicité soit dirigée vers d'autres voies : c'est le cas des pyréthrinoides (action préférentielle sur le canal sodium mais inhibition des ChE constatée chez des

vertébrés et invertébrés ; **Singh et Agarwal, 1987 ; Reddy et Philip, 1994**), des triazines (mode d'action principal : herbicide par inhibition de la photosynthèse) et de plusieurs métaux lourds. Le paraquat, ammonium quaternaire proche du diquat utilisé comme herbicide, exercerait également des effets inhibiteurs de la ChE chez la carpe (**Nemcsok et al., 1984**).

De nombreuses études portent sur la perturbation de l'activité enzymatique induite par la présence d'une molécule toxique inhibitrice (**Gambi et al., 2007 ; Reinecke et al., 2007**).

Les effets d'association d'organophosphorés, de carbamates et de métaux sont souvent de type synergique : l'effet inhibiteur de l'association est plus fort que la simple addition des effets de chacun des composés. La synergie la plus forte correspond à l'association organophosphoré-carbamate (**Bocquené et al., 1997**).

Il existe une relation dose-réponse. En effet, une inhibition de l'activité supérieure à 70% entraîne souvent la mort de l'individu. 30 à 70% d'inhibition provoquent des effets sublétaux physiologiques et des troubles du comportement ainsi que des effets létaux (**Bocquené et al., 1997**).

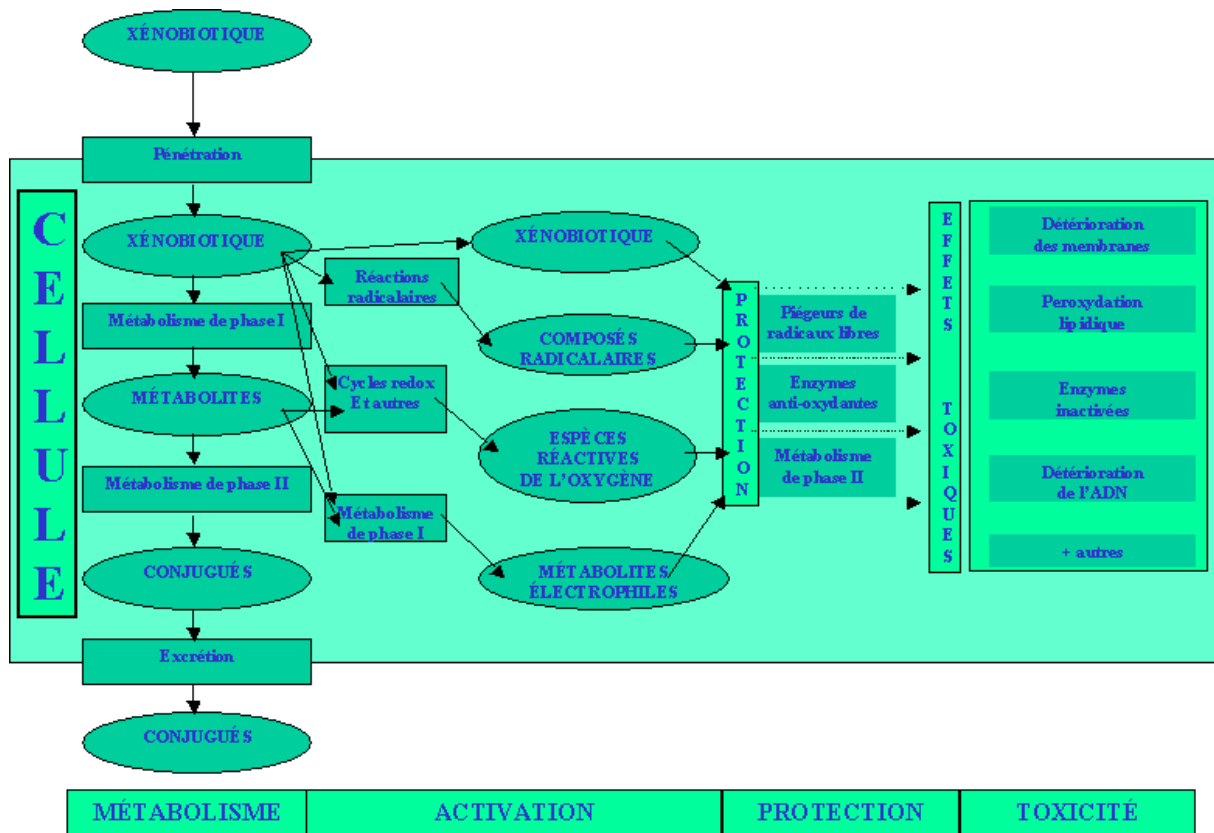
3.2.2.2 Activités enzymatiques du système de biotransformation des toxiques

Contrairement à l'activité acétylcholinestérase, les biomarqueurs du système de biotransformation ne mettent pas en évidence l'effet perturbateur d'un toxique sur une activité enzymatique mais la prise en charge de ce xénobiotique dans une voie de **métabolisation** (**Lagadic et al., 1997**) souvent à la base de la **détoxication** (Figure 1.22).

En effet, un bon nombre de composés organiques présentent un caractère lipophile qui leur permet de s'accumuler au sein des réserves lipidiques des organismes et dans les membranes cellulaires (essentiellement constituées de phospholipides). La présence de telles molécules entraîne rapidement la mise en route des systèmes biochimiques de détoxication dont le rôle est de rendre hydrosolubles ces composés dangereux, afin de faciliter leur excrétion.

Certains organes du corps contiennent donc des enzymes chargées de catalyser une série de réactions permettant de détoxiquer l'organisme des composés nocifs

présents. Ces réactions peuvent également conduire à une toxication de la molécule, devenant alors encore plus nocive pour l'organisme.



Source : Narbonne and Michel, 1997.

Figure 1.22 : Schéma des voies majeures de la biotransformation conduisant à la détoxification ou à la toxication des xénobiotiques organiques chez les animaux

Chez les Eucaryotes, la **métabolisation** d'une substance toxique est un processus qui se déroule en 1 et/ou 2 phases (Brown *et al.*, 2004) présentées sur la Figure 1.23.

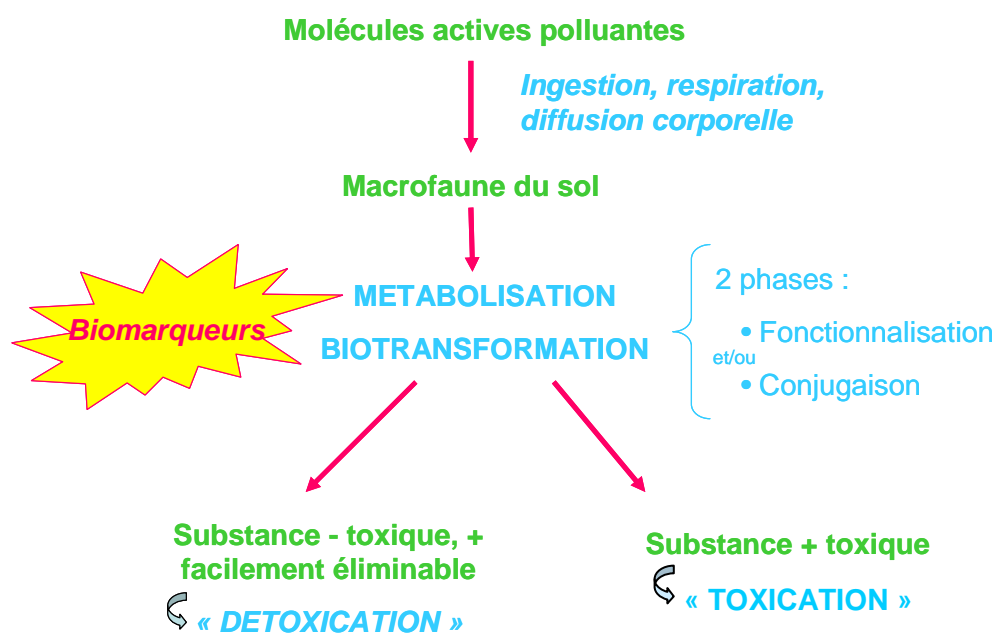


Figure 1.23 : Le processus de métabolisation des molécules actives polluantes

- **La phase 1, phase de fonctionnalisation** au cours de laquelle les enzymes de type hydrolases, oxydases, réductases et monooxygénases catalysent une réaction permettant de rendre la molécule active plus polaire en greffant des groupements polaires (-OH notamment) pour une meilleure élimination.

- **La phase 2, phase de conjugaison** au cours de laquelle les enzymes catalysent des réactions de conjugaison entre la molécule réactive et des substrats endogènes ayant des sites électrophiles comme le glutathion réduit (ou encore l'acétyl-CoA, l'acide glucuronique...) pour faciliter là-aussi le processus d'élimination.

Dans le cas où la métabolisation de la substance par un organisme conduit à une molécule moins toxique, plus facilement éliminable et de ce fait moins néfaste pour les autres organismes du même écosystème, on parle alors de **détoxication**.

Au cours de cette biotransformation des toxiques, les cycles d'oxydoréduction s'accroissent et sont souvent à l'origine de la production de radicaux libres. Dangereux pour l'organisme, ceux-ci sont pris en charge par les **enzymes antioxydantes** lors de la biotransformation.

Ainsi certaines activités enzymatiques peuvent être utilisées comme biomarqueurs de métabolisation, voire de détoxication. Les produits métaboliques sont alors étudiés comme biomarqueurs d'exposition.

3.2.2.2.1 Activité Ethoxyrésorufine-O-deséthylase (EROD)

L'EROD est une enzyme dépendante du cytochrome P450 (système CYP4501A), un système protéique multienzymatique (formé de 2 flavoprotéines et 2 hémoprotéines) localisé dans la membrane cellulaire (**Monod, 1997**). Ce système est appelé P450 car sa longueur d'onde maximale d'absorption après réduction avec le monoxyde de carbone est de 450 nm. Il est capable de métaboliser des contaminants exogènes mais aussi des composés endogènes (stéroïdes, acides gras...). Ce cytochrome P450 appartient aux enzymes de phase 1 qui catalysent l'insertion d'un atome d'oxygène sur un xénobiotique pour le transformer en un composé plus soluble dans l'eau et plus facilement éliminable que la molécule initiale (**Peters et al., 1994**).

Les enzymes à cytochrome P450 sont généralement localisées dans le réticulum endoplasmique lisse (chez les animaux et végétaux) mais elles se trouvent aussi dans les membranes internes des mitochondries (Mammifères et Arthropodes) ou dans l'enveloppe nucléaire (animaux seulement). On connaît même des formes solubles chez les bactéries. Les enzymes à P450 des animaux se répartissent essentiellement au niveau du foie, des poumons, des reins et des glandes surrénales.

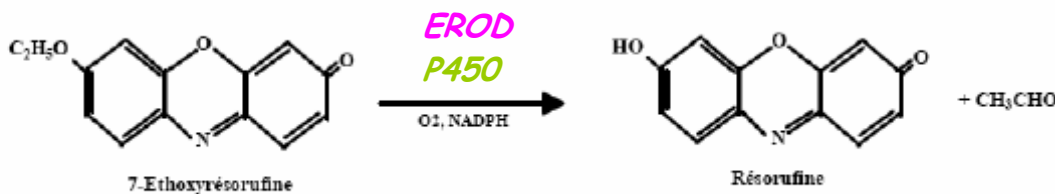
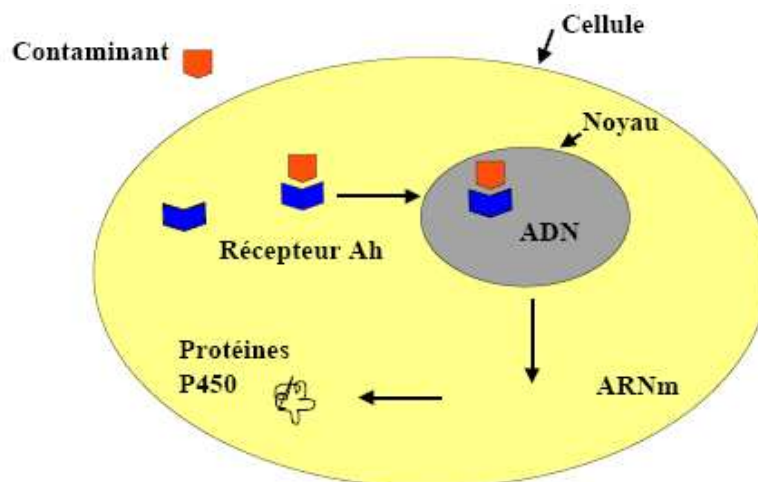


Figure 1.24 : Réaction catalysée par l'EROD

L'enzyme EROD catalyse l'insertion d'un atome d'oxygène sur un substrat par réduction d'une molécule d'oxygène moléculaire dissous (Figure 1.24).

La pénétration de certains polluants organiques dans l'organisme entraîne une induction de la synthèse des cytochromes P450 (Figure 1.25). En effet, les molécules de contaminant pénètrent dans la cellule, où elles forment alors un complexe avec les récepteurs cytosoliques Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR). Ce complexe atteint alors le noyau où il se fixe à l'ADN. Ceci induit l'altération de l'homéostasie cellulaire et la synthèse de protéines du système P450 impliquées dans le mécanisme de métabolisme puis détoxification (**Stegeman et Hahn, 1994**).



D'après Stegeman et Hahn, 1994

Figure 1.25 : Mécanisme de production de la protéine P450 après pénétration d'un polluant dans la cellule

La mesure de l'activité enzymatique EROD constitue alors un indicateur indirect de la présence de substances toxiques actives du ligand AhR. En effet, l'activité de l'enzyme est dépendante du cytochrome P450, lui-même synthétisé en fonction de la concentration en pesticides dans l'organisme.

Ainsi, la présence de molécules actives peut induire l'activité enzymatique EROD (**Burgeot et Galgani, 2000**). La géométrie des molécules et leurs propriétés physico-chimiques (hydrophobicité, capacité à accepter des électrons, polarité...) sont des critères déterminants de la capacité d'une molécule à former un complexe avec les récepteurs AhR. La majorité des pesticides en est capable, mais les principaux inducteurs restent les polychlorobiphényles (PCB) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Cependant, certains composés inducteurs peuvent se révéler inhibiteurs à fortes doses et avoir des effets agonistes.

Par ailleurs, des facteurs biotiques et biologiques (espèce, individu, tissu, cycle sexuel, alimentation, stress...) et abiotiques (température, âge, sexe...) influencent directement l'activité EROD (**Anderson et Förlin, 1992**).

L'activité EROD constitue donc une méthode de mesure de l'induction du cytochrome P450 suite à l'exposition à des polluants de l'environnement. L'étude de cette cinétique enzymatique entraîne une réponse biochimique qui donne à l'activité EROD un statut de biomarqueur.

3.2.2.2 Activité Glutathion S-Transférase (GST)

Les glutathion S-transférases représentent une famille d'enzymes multifonctionnelles essentiellement cytosoliques, impliquées dans des opérations diverses de transports et de biosynthèses intracellulaires (**George, 1990**).

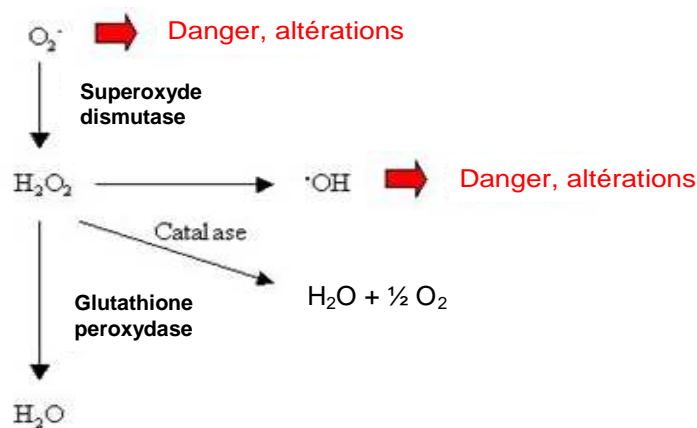
Leur fonction la plus étudiée est le rôle d'enzymes de détoxification de la phase 2. En effet, les glutathion-S-transférases sont impliquées dans des phénomènes de conjugaison entre un tripeptide ubiquiste dans les cellules, le glutathion, et des métabolites issus de la phase 1. Les molécules susceptibles d'être directement attaquées (car portant un site électrophile) et capables de réagir dangereusement avec des macromolécules comme les acides nucléiques peuvent également participer à cette conjugaison (**Huggett et al., 1992**). Le produit final de la conjugaison est un complexe hydrosoluble, généralement moins toxique et plus rapidement éliminé par l'organisme (**Chatterjee et Bhattacharya, 1984**).

Un organisme exposé à des molécules toxiques comme les pesticides présente une activation de l'activité enzymatique GST et une forte consommation de glutathion réduit. **Xiao et al. (2006)** ont montré une augmentation de 5 à 10 % de l'activité GST chez le ver de terre *Eisenia fetida* exposé à l'herbicide acétochlore. Les travaux de **Contardo-Jara et Wiegand (2008)** suggèrent également l'utilisation de la variation de l'activité GST chez le ver de terre *Lumbriculus variegatus* comme un biomarqueur sensible de l'exposition à un polluant organique, l'atrazine. De la même façon, **Ferrari et al. (2007)** ont montré que les pesticides organophosphorés et les carbamates induisent des variations d'activité GST chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). L'herbicide oxyfluorfen a également un effet sur l'activité GST comme en témoigne les investigations de **Peixoto et al. (2006)** sur un autre poisson, *Oreochromis niloticus*.

Ce biomarqueur rend compte ainsi d'une métabolisation des contaminants, à l'origine peut-être d'une détoxification.

3.2.2.2.3 Activité Catalase (CAT)

La formation d'espèces hautement réactives de l'oxygène (ROSs : Reactive Oxygen Species) à l'origine du stress oxydant est une conséquence normale de réactions biochimiques essentielles à la vie modulées par les conditions environnementales (systèmes de transport des électrons, phagocytoses, cycles d'oxydoréduction accélérés par la présence de xénobiotiques...). Toutefois, ces radicaux libres sont très instables et peuvent potentiellement endommager les cellules et les tissus (**Saint-Denis et al., 1998**). Cependant tous les organismes sont dotés de systèmes antioxydants qui se mettent en activité lors d'un stress oxydant. Lorsque l'induction des enzymes antioxydantes est suffisante, elle permet l'adaptation des individus et le retour à la normale alors que leur inhibition est souvent associée à des effets de toxicité (**Cossu et al., 1997**). Il existe en effet de petites molécules enzymatiques (dont la catalase) ayant des fonctions antioxydantes, protégeant ainsi les cellules contre les effets néfastes de ces ROSs. Cependant, les radicaux libres participent aussi à des événements cellulaires « normaux » comme la transduction du signal ou les défenses antibactériennes : il est donc nécessaire de maintenir une balance correcte entre oxydants et antioxydants afin de garantir l'homéostasie cellulaire. La catalase, hémoprotéine tétramérique ayant un atome de fer par sous-unité, joue ainsi un rôle très important dans le système antioxydant. Elle prend en charge les peroxydes d'hydrogène pour les transformer en eau : $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \frac{1}{2} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ protégeant ainsi les organismes des espèces réactives de l'oxygène, responsables des réactions du stress oxydant (Figure 1.26).



d'après www.enzymeindia.com

Figure 1.26 : Enzymes du système antioxydant et place de la catalase

Avec plus de 200 000 réactions catalysées par seconde, elle est une des enzymes les plus efficaces connues. La vitesse de réaction ne semble en effet limitée que par la diffusion, c'est à dire par la vitesse limite avec laquelle les molécules parviennent au site actif de l'enzyme. Chez les eucaryotes, elle est présente dans le peroxysome des cellules.

Au cours du processus de biotransformation des xénobiotiques (pesticides, HAP, etc.), les enzymes de métabolisation peuvent libérer des espèces réactives du O₂, et du peroxyde d'hydrogène notamment. Ces radicaux libres sont alors pris en charge par les enzymes du système antioxydant dont la catalase (Figure 1.24). Dès lors, une augmentation de l'activité des enzymes du système antioxydant, dont la catalase, traduit une forte activité de métabolisation et prise en charge des toxiques (**Di Giulio et al., 1993**).

Ainsi, la présence de xénobiotiques tels que des produits phytosanitaires dans l'organisme induit une production de H₂O₂ augmentant alors l'activité enzymatique CAT comme le suggèrent les travaux de **Ribera et al. (2001)** chez le ver de terre *Eisenia fetida andrei* exposé au carbaryl. Les travaux de **Richardson et al. (2008)** sur la moule (*Perna viridis*) mettent en évidence une activation de l'activité CAT sous l'effet des HAP et de pesticides organochlorés. Les pesticides organophosphorés et les carbamates induisent des variations d'activité CAT chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), signe de la prise en charge des toxiques (**Ferrari et al., 2007**). Chez les mammifères aussi, l'effet des pesticides sur les variations d'activité des enzymes antioxydantes au cours du processus de biotransformation a été étudié (**Jett et Navoa, 2000**).

INFLUENCE DE LA PRATIQUE CULTURALE SUR LE TRANSFERT DE PRODUITS PHYTOSANITAIRES

Après une présentation du site expérimental viticole de l'étude, l'objectif de cette partie sera de décrire les matériels et méthodes mis en œuvre ainsi que les résultats obtenus et discutés sur la problématique des transferts de pesticides du sol vers les eaux de drainage en fonction de l'entretien du sol des inter-rangs.

1 Site expérimental

1.1 *Historique et présentation de la parcelle expérimentale*

1.1.1 Problématique et genèse du projet

Dans un contexte général de pollution grandissante des eaux et des sols en milieu viticole, est née l'idée de mettre en place un nouveau projet au sein de l'Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV).

En effet, essayer d'acquérir des références et des moyens de comparaison entre les différentes techniques d'entretien des sols en viticulture dans le but de déterminer les pratiques les plus respectueuses de l'environnement est devenu un nouvel enjeu pour la station midi-pyrénéenne de l'Institut Français de la Vigne et du Vin.

Ainsi, à partir de l'année 2000, le Domaine Expérimental Viticole Tarnais (DEV T) a accepté de mettre à la disposition de l'IFV une parcelle de 5 ha située en zone Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) Gaillac pour cette nouvelle étude (Figure 2.1). Cette parcelle était, dans les années 90, exploitée en grandes cultures (maïs), elle a donc été drainée afin de pouvoir accueillir une culture viticole.



Figure 2.1 : Photographie de la parcelle mise à disposition pour le projet par le DEVT en 2000

1.1.2 Caractéristiques de la parcelle

Les années 2000 et 2001 ont été consacrées aux étapes préalables de planification de la mise en place du projet : prévision de la délimitation de placettes expérimentales homogènes, réalisation d'un plan de drainage de la parcelle pour pouvoir permettre la mise en place des vignes, établissement d'un schéma de plantation (cépages, nombre de rangs, etc.)...

Ainsi, différentes études préalables sur la parcelle (caractéristiques du sol, hydrologie) ont du être menées afin d'installer le dispositif le mieux adapté à l'étude envisagée (drainage et système de collecte des eaux, plantation de vigne...). La figure 2.2 présente une vue aérienne de la parcelle.

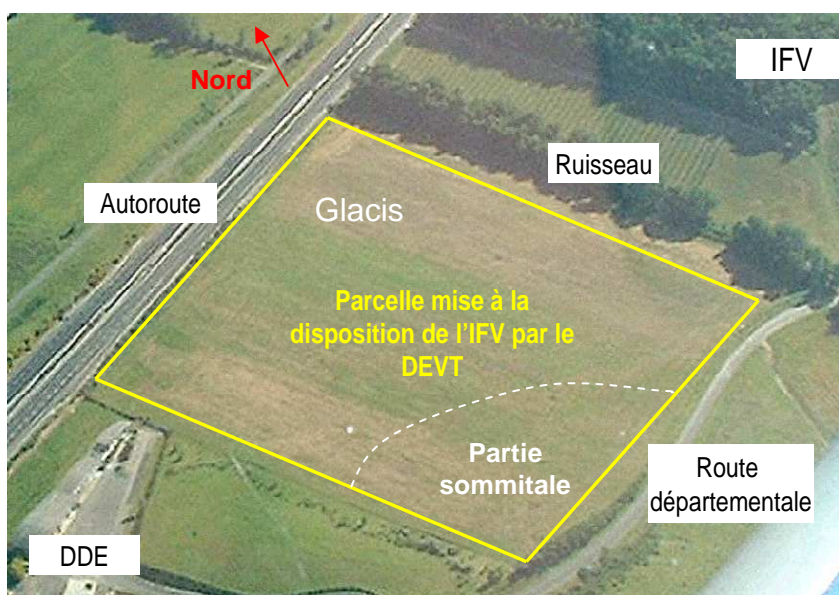


Figure 2.2 : Vue aérienne de la parcelle

➤ **Etude pédologique :**

La réalisation de 20 profils pédologiques (fosses pédologiques et prélèvements à la tarière) en 2001, ainsi que des analyses de terre ont permis de délimiter 3 zones homogènes :

- un sol de graves sur la partie sommitale de la parcelle,
- un sol de « boubènes » sur le glacis,
- un sol de « boubènes » graveleuses le long du ruisseau.

Cette dernière zone de 1 ha environ a été exclue de l'expérimentation et consacrée à un conservatoire des cépages.

Ainsi, la parcelle prévue pour l'étude de l'influence des modes d'entretien du sol sur la qualité des eaux et des sols se limite à **4 ha** correspondant à 2 types de sols : sol de graves sur 1ha environ et sol de boubènes sur 3 ha.

Un **sol de boubènes** correspond dans le sud-ouest de la France (en Midi-Pyrénées et dans le Bordelais) à des terres à texture argilo-limoneuse : il s'agit d'un **luvisol-reduxisol** selon le référentiel pédologique (**AFES, 1995**). Il s'agit de sols généralement hydromorphes, battants, à mauvaise stabilité structurale et éventuellement caillouteux (**Colin, 2000**). Le limon est jaune ou gris clair, très fin, parfois lessivé et réduit à ses éléments siliceux (Figure 2.3). Il s'agit d'une terre plutôt pauvre en matière organique avec une faible capacité de rétention en eau, relativement imperméable, d'alluvions anciennes de cailloux sur une base argileuse. Les sols de boubènes présentent une hétérogénéité de composition et de morphologie (**Michel et al., 2003**). Cette hétérogénéité est principalement due à la profondeur d'apparition, à la teneur en argile, à l'organisation structurale et à la richesse en oxy-hydroxydes de fer de leurs horizons d'accumulation d'argile Bt et Btg_{FeMn} (50 à 90 cm de profondeur) et à la profondeur du cailloutis alluvial sous-jacent (**Zimmer et al., 1991**). Le concrétionnement de ces horizons modifie de façon déterminante la conduction de l'eau (**Guiesse et al., 1989**). Ces sols de boubènes sont dès lors très hétérogènes dans leur comportement vis-à-vis du drainage, bien qu'ils aient été reconnus *a priori* comme pédologiquement homogènes à l'échelle de la parcelle (**Masse et Lomi, 1989**).

Le squelette ferrique joue un rôle important pour ce type de sol dans l'élaboration de la structure des horizons argileux et de leurs propriétés hydrauliques. Lorsqu'il y a peu de concrétionnements, les circulations ne se font que dans les horizons

limoneux et l'horizon argileux Btg peut être considéré comme imperméable (Guiesse et Bourgeat, 1991).

Ainsi, la morphologie des boubènes modifie la circulation de l'eau à l'échelle de la parcelle.

Sol de boubènes

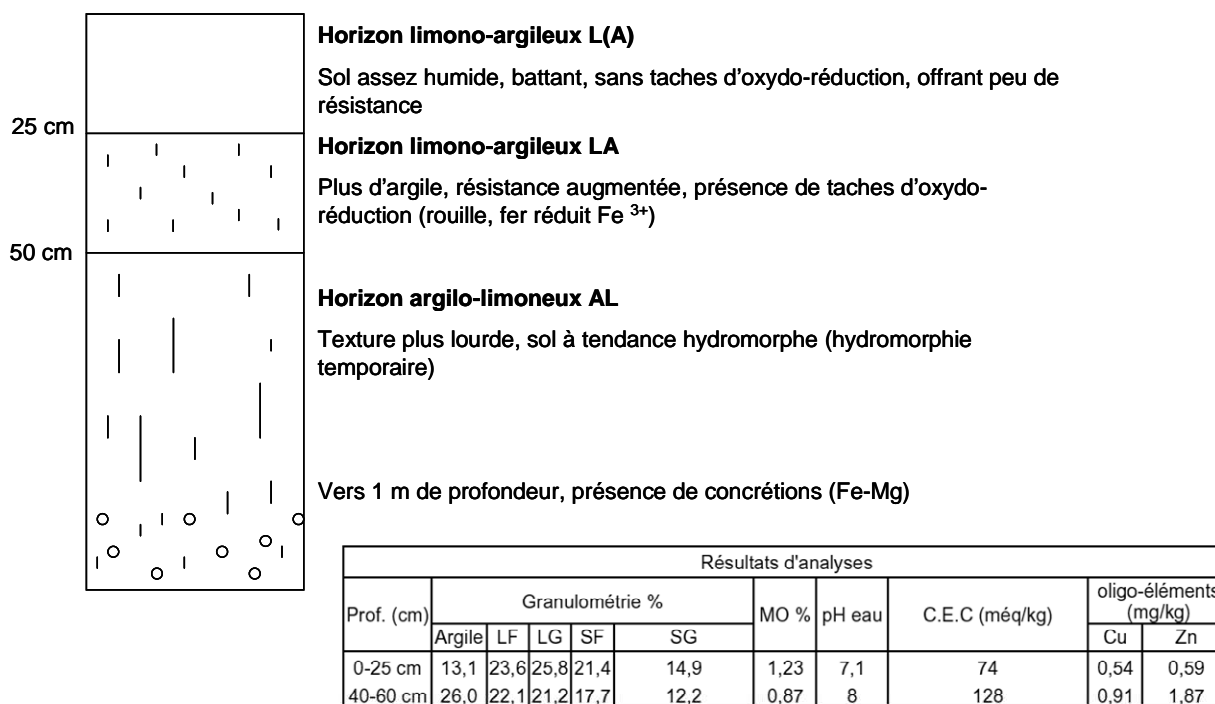


Figure 2.3 : Profil schématique du sol type réalisé dans la zone de boubènes accompagné des caractéristiques structurales et texturales de ce sol (moyenne sur 15 analyses)

Un test de stabilité structurale a été réalisé à l'IFV. Il consiste à appliquer à un échantillon de sol une humectation rapide par immersion dans un bêcher rempli d'eau et à mesurer la distribution de la taille des particules résultantes par passage au travers de différents tamis.

Le résultat est exprimé sous forme d'un diamètre moyen pondéral (Mean Weight Diameter, MWD). L'analyse des résultats montre que la structure du sol de la parcelle est très instable, il s'agit d'un sol systématiquement battant.

Les **sols de graves** sont des sols caillouteux, faits de graviers (Figure 2.4).

Sol de graves

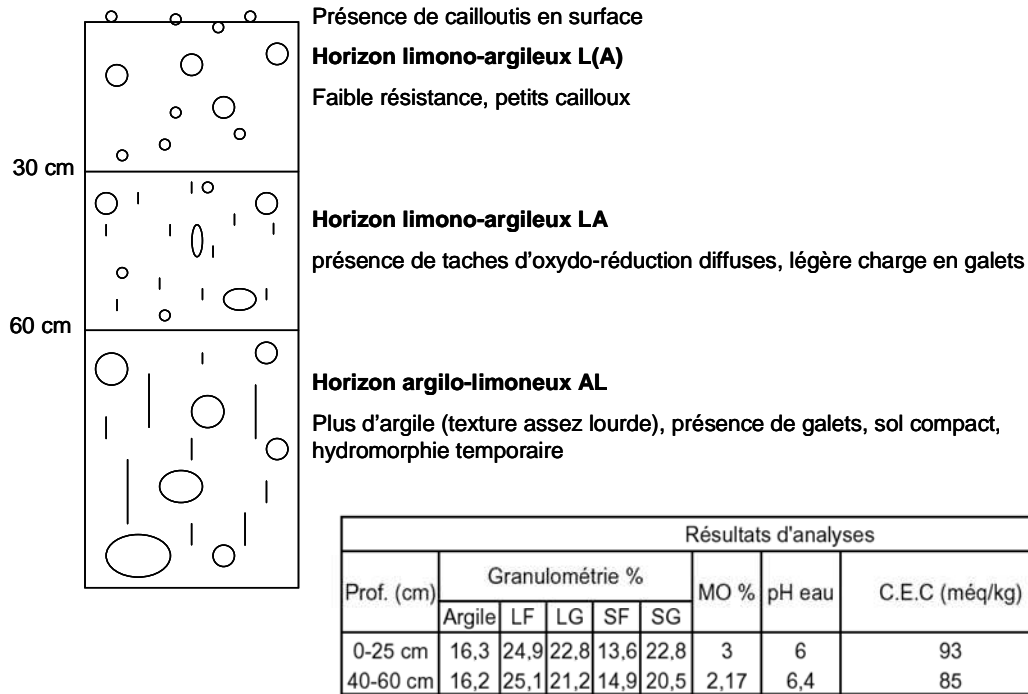


Figure 2.4 : Profil schématique du sol type réalisé dans la zone de graves accompagné des caractéristiques structurales et texturales de ce sol (moyenne sur 5 analyses)

La parcelle présente une pente du sud vers le nord-est comme le montre le plan topographique (Figure 2.5). Sur la partie ayant un sol de graves, la pente est de 4,6 %. La partie proche de l'autoroute est elle plus plane, la pente est de 1,1%. La pente moyenne est d'environ 3%.

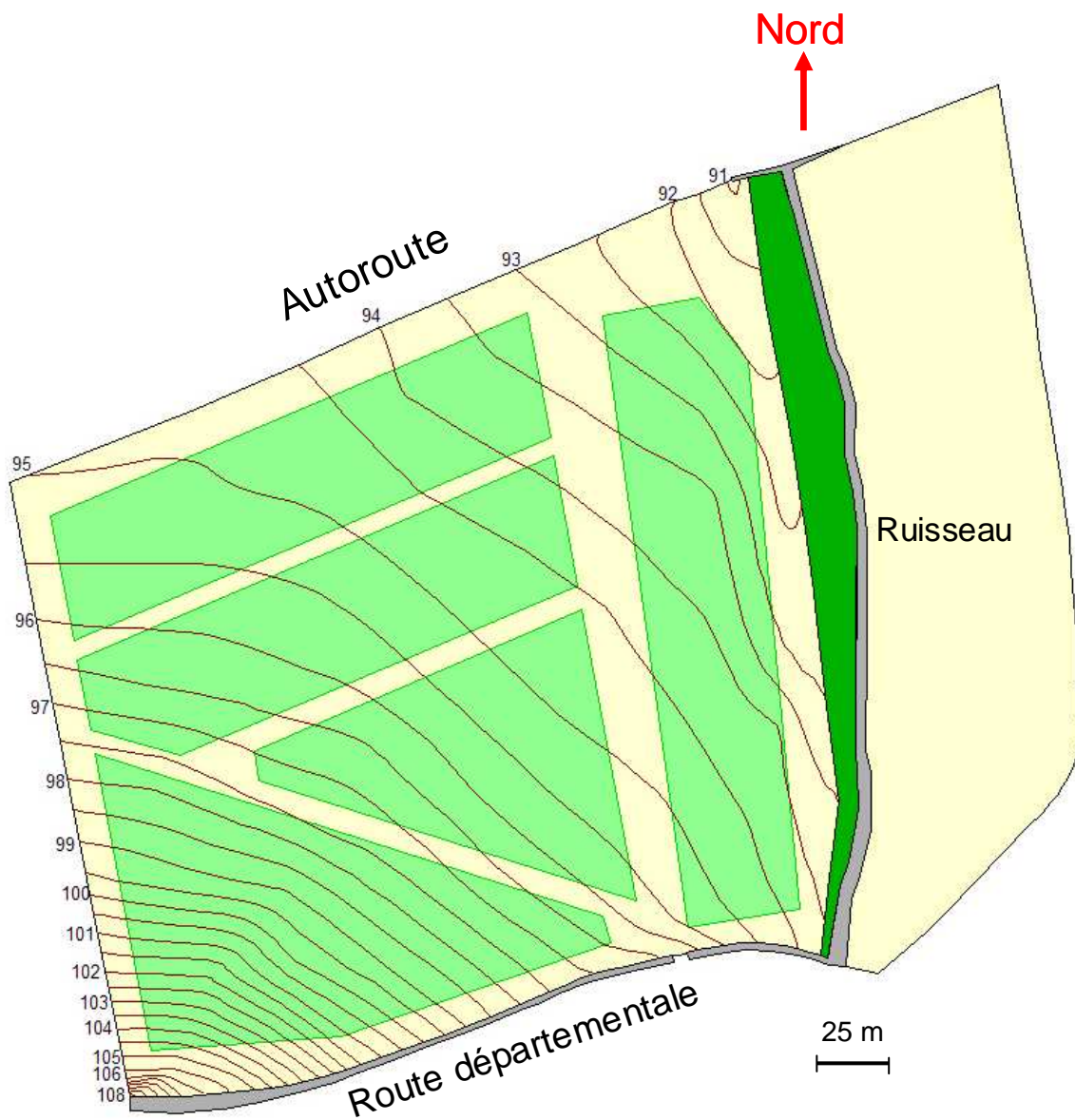


Figure 2.5 : Carte topographique de la parcelle expérimentale
Courbes de niveau (m) ; Projection Long/Lat WGS 84

➤ **Etude hydrologique :**

D'après un relevé topographique de la parcelle, un suivi de la hauteur de nappe et la mesure de l'intensité de l'hydromorphie (fosses pédologiques), il a été possible de déterminer :

- la présence d'une nappe perchée sur la zone de graves qui vient compléter les observations montrant la présence d'eau toute l'année sur la parcelle
- la présence d'une nappe souterraine le long du ruisseau.

1.1.3 Mise en place des installations

A la vue de l'ensemble de ces caractéristiques parcellaires données par la cartographie pédologique détaillée et l'analyse hydrique, le dispositif de l'étude a pu être mis en place.

D'après les données pédologiques, un découpage de la parcelle en 4 modalités expérimentales de 1 ha chacune a été envisagé dans l'objectif de suivre différents types d'entretien du sol et en tenant compte de la nature de ce sol (Figure 2.5). Une zone en prairie naturelle servira de zone témoin, non traitée.

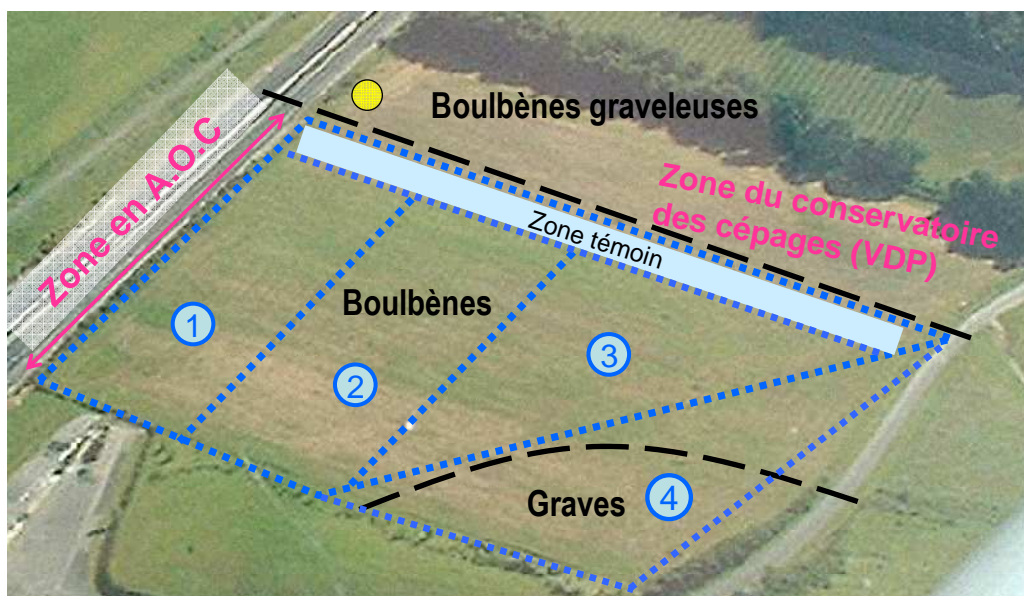


Figure 2.6 : Découpage de la parcelle en 4 modalités

La **modalité notée 1** sur la figure 2.6 correspond à une surface de 8960 m² sur un sol de boulbènes. Elle sera consacrée à un entretien du sol par désherbage chimique intégral.

La **modalité notée 2** de 10620 m² sur un sol de boulbènes correspondra à un entretien du sol par labour des inter-rangs à l'actisol (profondeur 15 cm) et un désherbage chimique sous les rangs.

La **modalité notée 3** de 9854 m² sur un sol de boulbènes est consacrée au suivi d'un enherbement des inter-rangs par semi et un désherbage chimique sous les rangs.

Enfin, la **modalité notée 4** est une répétition de la modalité 3 sur un sol de graves, elle s'étend sur 11584 m².

Le système de drainage de la parcelle a été mis en place au cours de l'année 2002. Il permet un isolement hydrique total de la parcelle et un isolement interne de chacune des différentes zones. Par ailleurs, ce dispositif offre la possibilité de collecter les eaux de drainage de chaque modalité de façon indépendante. Un descriptif plus détaillé est fourni dans le paragraphe 1.1.4.

Les vignes ont alors été plantées sur 2 ans. Une première vague de plantation a eu lieu en 2003 sur la zone sud-ouest de la parcelle, puis, la plantation a été achevée durant l'année 2004 de manière à couvrir les 4 ha (Figure 2.7). Différents cépages, ayant des vitesses de croissance variables, ont été implantés sur la vigne limitant ainsi l'effet de la croissance de la vigne sur les transferts étudiés et sur le développement des adventices.

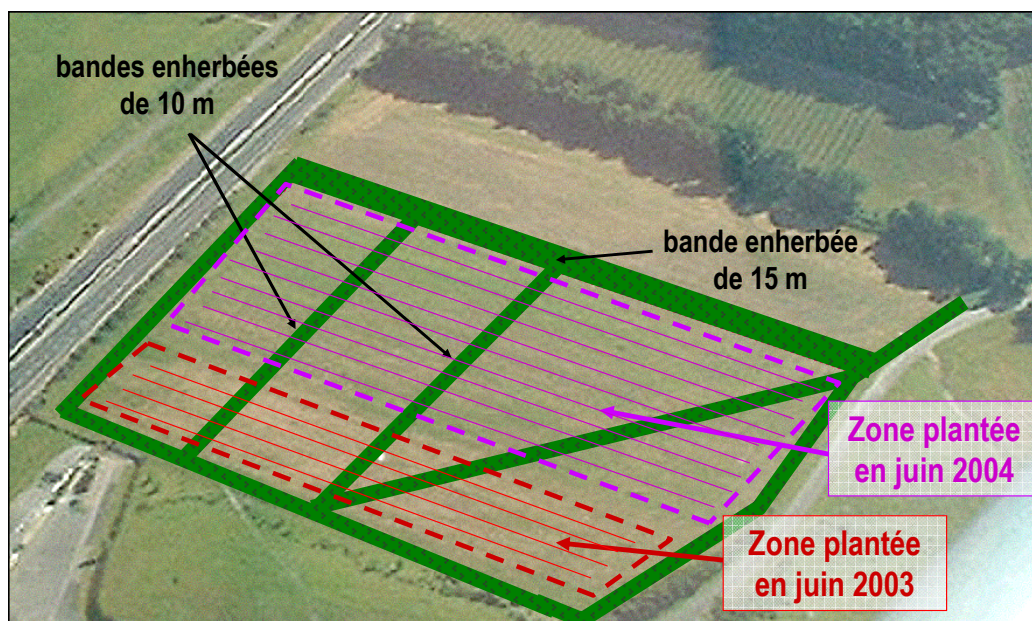


Figure 2.7 : Schéma de plantation des ceps de vignes sur la parcelle

Chaque modalité est ceinturée par une bande enherbée de 10 m de large afin d'éviter d'éventuels transferts latéraux de pesticides par ruissellement. D'après les travaux de **Gril et al. (1999)**, une bande enherbée de six mètres de large suffit pour retenir 99 % des produits phytosanitaires exportés par ruissellement.

Les années 2005-2006 ont été consacrées à la mise en place de l'essai (équipement, entretien des sols) et des installations finales (local de collecte des eaux de drainage). Pour les bandes enherbées, le semi a été réalisé à l'automne 2005 pour les inter-rangs des modalités 3 et 4 et au printemps 2006. En effet, dans les régions tempérées, il est préconisé d'installer les enherbements à l'automne

(octobre-novembre) sans irrigation. Le couvert commence son développement pendant la saison pluvieuse jusqu'au printemps (mars-avril) alors que les vignes sont en dormance (**Steenwerth et Belina, 2008**).

Les espèces semées sur la parcelle appartiennent à la famille des Poacées appartenant à un mélange composé à 50% de fétuque élevée (*Festuca arundinacea*), 30 % de ray grass (*Lolium sp.*) et 20 % de fétuque rouge (*Festuca rubra*). Ce couvert végétal a été choisi en raison de ses qualités : il s'agit d'espèces engazonnantes, à pousse lente, assurant un bon recouvrement du sol.

La centrale d'acquisition des données de basculement des augets relatives au drainage a été opérationnelle début 2008.

1.1.4 Dispositif de drainage et de collecte des eaux

➤ **Système de drainage :**

La parcelle bénéficie d'un système de drainage spécifique présentant un dispositif à 80 cm de profondeur (Figure 2.8).

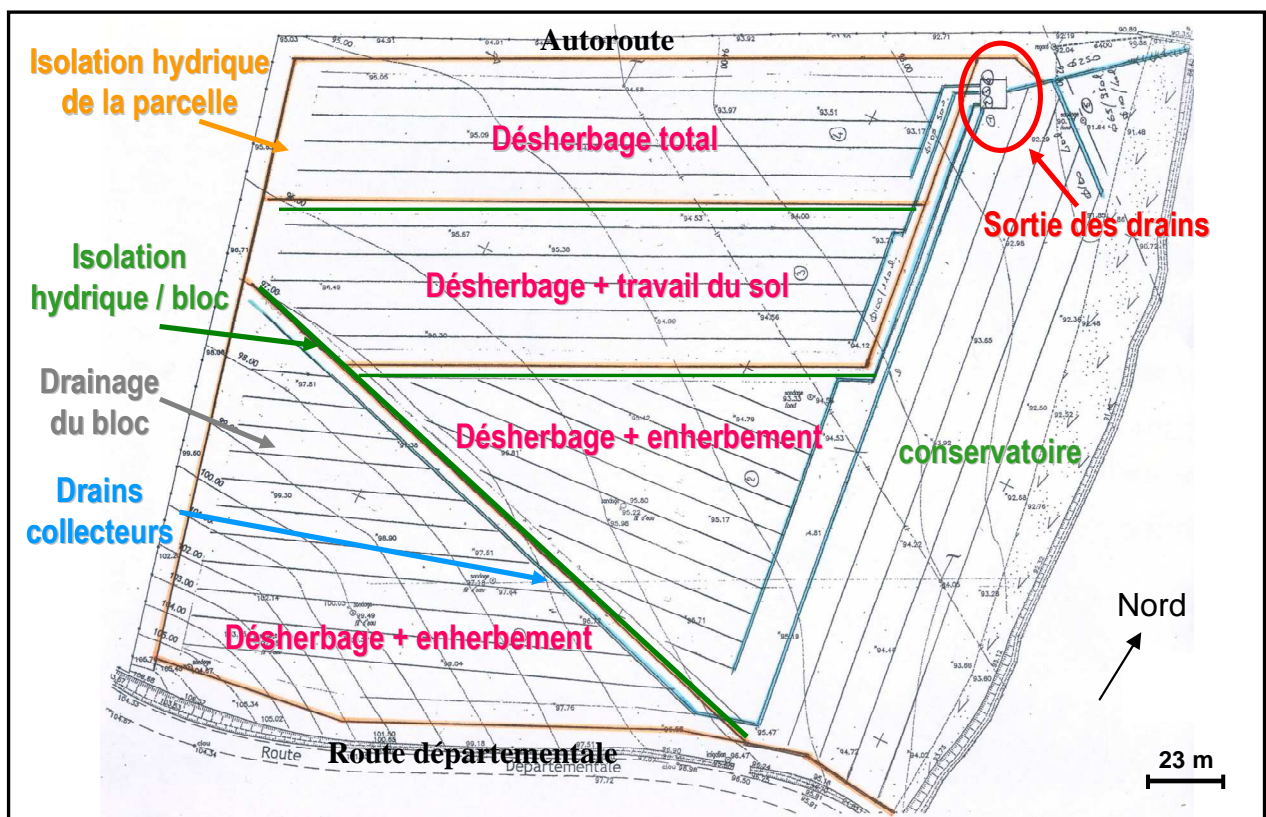


Figure 2.8 : Dispositif de drainage de la parcelle

La parcelle est isolée sur le plan hydrique par 3 drains qui empêchent ainsi la communication par infiltration des eaux en provenance des routes ou parcelles voisines. Trois autres drains permettent l'isolation de chaque modalité. L'ensemble de ces drains rejette les eaux récupérées en aval du système de collecte de la parcelle, au niveau du ruisseau.

A l'intérieur de chaque bloc, un réseau de drainage constitué de drains espacés de 10 m est en place. Chaque drain se déverse dans un drain collecteur qui achemine les eaux d'infiltration vers le dispositif de prélèvement situé dans le local de collecte des eaux et d'enregistrement des données.

➤ **Équipement métrologique :**

Le suivi de la qualité des eaux de drainage a nécessité la mise en place d'un équipement métrologique spécifique permettant le prélèvement automatique d'échantillons d'eau asservi au débit.

En sortie de chaque drain collecteur, 4 augets basculeurs collectent l'eau s'écoulant des drains (Figure 2.9). Le volume moyen par basculement des augets est de $9,99 \pm 0,92$ L pour l'auget de la modalité désherbée, $10,34 \pm 0,36$ L pour l'auget de la modalité travaillée, $10,71 \pm 0,17$ L pour l'auget de la modalité enherbée sur broussailles et $14,73 \pm 0,23$ L pour l'auget de la modalité enherbée sur graves. A chaque basculement de l'auget, une quantité d'eau connue (30 mL) est récupérée dans une bonbonne de 20L afin de constituer un échantillon représentatif de l'épisode de drainage (qui pourra par la suite être analysé chimiquement). Les échantillons d'eau sont collectés régulièrement par un opérateur après chaque épisode de fortes pluies et plus régulièrement tout au long de la saison de drainage qui s'étend globalement d'octobre à juin.

Depuis le début de l'année 2008, chaque auget est relié à une centrale d'acquisition des données assurant ainsi l'enregistrement de la fréquence des basculements d'augets et de ce fait, des variations de débits.

Un local souterrain étanche protège l'installation et le matériel de mesure. L'alimentation électrique de la centrale d'acquisition des données est permise par panneaux solaires. Une station météorologique est implantée à proximité du site afin de suivre l'intensité et la durée des pluies en relation avec les épisodes de drainage.



Figure 2.9 : Dispositif de prélèvement des eaux de drainage et de mesure des débits affiliés

Les augets basculeurs ont été étalonnés afin de pouvoir connaître avec précision la quantité d'eau évacuée par l'auget à chaque basculement. Il sera alors possible de relier le **nombre de basculements enregistrés par unité de temps** à une quantité d'eau d'infiltration, et de ce fait calculer le **débit d'écoulement des drains** et les **flux d'eau** (volumes écoulés) à l'échelle des modalités et de la parcelle.

Les premiers tests réalisés sur la parcelle ont consisté tout d'abord en une étude du bon fonctionnement de l'auget. Les dysfonctionnements éventuels ont été repérés et un rééquilibrage entre les 2 versoirs a été opéré.

Chacun des versoirs des augets a été rempli d'eau tour à tour afin de déterminer la quantité (\pm erreur commise) qui entraîne son basculement. Nous avons alors constaté après ces premiers tests de basculement des augets, l'existence d'un déséquilibre entre les volumes contenus et basculés par les 2 différents versoirs d'un même auget : les 2 « côtés » ne basculent pas pour la même quantité d'eau. Ceci provient certainement des caractéristiques intrinsèques de l'appareillage.

Toutefois, le volume d'eau pour un versoir entraînant le basculement de l'appareillage est tout à fait répétable sur nos 3 mesures.

Lorsque l'écart de volume entre les 2 versoirs est trop important, il est parfois possible de rehausser un des versoirs afin de limiter le volume d'eau accepté et de réduire ainsi l'écart entre les 2 « côtés » (Figure 2.10).

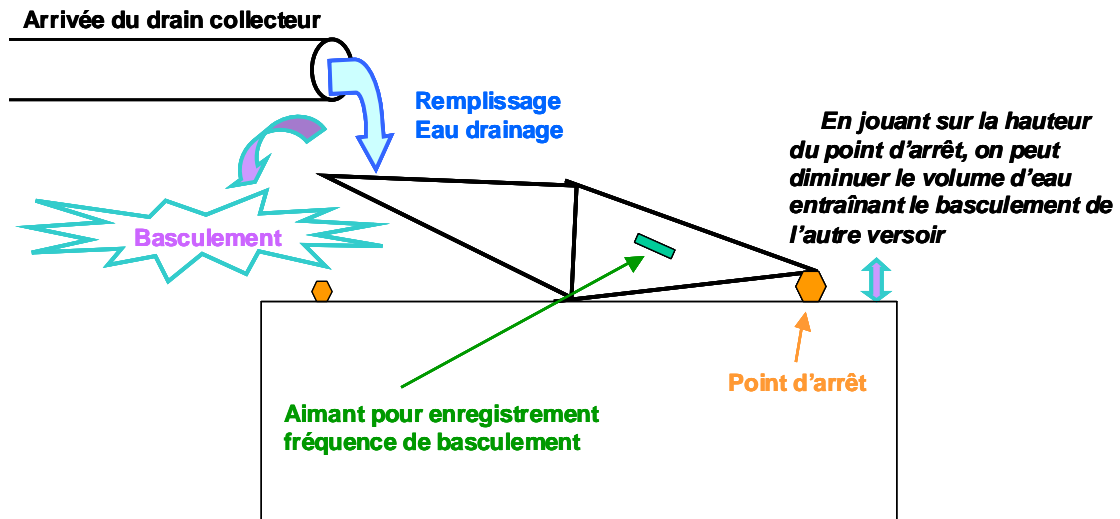


Figure 2.10 : Mécanisme du basculement de l'auget et conséquences de la modification de la hauteur des points d'arrêt

Bien que la différence de volume entre les 2 versoirs de l'auget ait été corrigée, une erreur de 100 mL par basculement persiste malgré les améliorations de l'appareillage (soit 0,3 mL sur le volume récupéré). Nous avons donc choisi de prendre une valeur moyenne entre les 2 côtés pour le volume de basculement de l'auget. Ainsi, comme le montrent les données expérimentales, seul un nombre de basculements impair induit une erreur dans le calcul des flux d'eau (volumes basculés). Par ailleurs, comme le souligne **Colombani (1988)**, il est possible de faire la somme des basculements d'ordre pair et impair séparément et de comparer les sommes ainsi obtenues. S'il s'agit d'une averse suffisamment intense et de durée suffisante, un déséquilibre entre les augets ne traduira pas une différence sensible des quantités d'eau drainées et « basculées » par unité de temps.

La plus grande erreur sur le volume écoulé est commise pour un seul basculement : on ne sait pas quel est le côté de l'auget qui a basculé. Cette erreur s'amointrit mais reste élevée pour 3 basculements. Ensuite, plus le nombre de basculement augmente, plus l'erreur est négligeable face à des volumes d'eau très importants.

Enfin, d'après « **Pameseb** » (Promotion de l'Agrométéorologie dans le Sud-Est de la Belgique), même sans incident technique, la durée du basculement de l'auget introduit une erreur sur le remplissage. En effet, quand l'eau de l'auget a atteint le poids nominal, l'auget quitte sa position en butée pour pivoter autour de ses deux vis d'axe, mais ce mouvement n'est pas instantané et la ligne de partage des eaux entre les deux augets ne passe sous le jet d'arrivée d'eau des drains collecteurs qu'au bout de quelques dixièmes de seconde. Pendant ce temps l'auget continue à se remplir et évacue finalement une dose d'eau supérieure à la nominale. Ce supplément est d'autant plus élevé que le débit est fort.

La connaissance des **courbes d'étalonnage** (traduisant la quantité d'eau basculée affiliée au débit) permet cependant de rectifier les erreurs. Ainsi, les erreurs commises sont corrigées par référence à l'étalon.

1.2 Itinéraire de protection phytosanitaire de la parcelle

Le choix de l'itinéraire phytosanitaire à suivre pour le traitement de la parcelle en AOC Gaillac s'est fait en fonction des produits les plus utilisés en viticulture et notamment dans le terroir gaillacois (relevés viticoles d'une grande cave coopérative de vigneron du sud-ouest). La majorité des molécules épandues sera suivie dans le sol et dans les eaux afin d'évaluer la contamination du vignoble gaillacois selon la modalité d'entretien du sol.

Concernant le traitement herbicide, la stratégie utilisée sur la parcelle est une stratégie « mixte ». En effet, à la sortie de l'hiver, les adventices déjà levées sont détruites par application d'un herbicide foliaire (systémique dans notre cas) de post-levé : le **glyphosate**. La formulation épandue sur la parcelle est le Kick-off (Phytunion®) à 360 g L⁻¹ de glyphosate équivalent acide, soit 480 g L⁻¹ de sel isopropylamine du glyphosate. Il se présente sous la forme d'un concentré soluble, liquide visqueux de couleur jaune. Au cours d'une campagne de traitement phytosanitaire, le glyphosate est épandu 2 fois sur la parcelle : à la mi-mars comme herbicide permettant la destruction des adventices déjà levées (en plein sur la modalité 1 et sous le rang pour les 3 autres modalités) puis dans le courant du mois

de juillet afin d'éliminer les taches persistantes de chiendent (sous le rang sur toutes les modalités). La dose maximale de matière active appliquée sur la parcelle est de 1440 g ha⁻¹ en plein sur la modalité désherbée chimiquement et de 720 g ha⁻¹ sous le rang pour les autres modalités.

Pour empêcher ensuite le développement des plantes non encore levées lors de l'application du premier herbicide, on réalise un traitement de "pré-levée" qui, par pénétration au niveau de l'ensemble des organes souterrains, entre la germination et la levée, empêche le développement des adventices. Cet herbicide de pré-levée est utilisé en application unique en pré-débourrement de la vigne. Afin de respecter les pratiques culturales couramment suivies en viticulture et de minimiser les risques de phytotoxicité, **2 herbicides de pré-levée sont utilisés en alternance** : la flumioxazine en 2006 et 2008 et le flazasulfuron en 2007.

Le Pledge (Philagro France®) est le produit formulé à base de **flumioxazine** (50% de la formulation) épandu sur la parcelle. Il s'agit d'un solide pulvérulent, jaune brun, dépourvu d'odeur. La flumioxazine est utilisée en application unique en pré-débourrement de la vigne (début avril) afin d'empêcher la levée des mauvaises herbes, sans toutefois être phytotoxique pour la culture.

La dose unique de matière active appliquée pour une campagne phytosanitaire est de 600 g ha⁻¹ pour la modalité 1 traitée en plein et de 200 g ha⁻¹ pour les 3 autres modalités, traitées uniquement sous les rangs de vigne.

Le **flazasulfuron** est la matière active (25 %) de la formulation Katana (Belchim Crop Protection®). Cette poudre cristalline blanche est épandue sur la parcelle expérimentale en pré-levée des adventices au printemps, comme la flumioxazine. La dose unique de matière active appliquée pour une campagne phytosanitaire est de 200 g ha⁻¹ pour la modalité 1 traitée en plein et de 65 g ha⁻¹ pour les 3 autres modalités, traitées uniquement sous les rangs de vigne.

Enfin, l'épamprage de la vigne est réalisé par épandage d'un herbicide : le **diquat** assurant la destruction des rejets sur les ceps à la fin du printemps. La formulation épandue est le Réglone 2 (Syngenta®) : un liquide brun foncé à 200 g L⁻¹ de diquat (dibromure monohydrate), contenant des agents mouillants. Le diquat est épandu au cours du mois de juin : 3 traitements permettent d'apporter au maximum une dose de 600 g ha⁻¹ de matière active sur la parcelle (sur toutes les modalités).

Plusieurs fongicides sont appliqués sur la parcelle afin de lutter contre les diverses maladies de la vigne (oïdium, mildiou, acariose...). Nous suivons plus en détail les 4 fongicides les plus utilisés : le folpel, le métalaxyl, le myclobutanil et le fosétyl-Al. En effet, ces 4 fongicides représentent le traitement de base appliqué en première intention sur le vignoble, quelles que soient les conditions climatiques. Toutefois, en raison d'une pression phytosanitaire importante, il est parfois nécessaire de multiplier les traitements et les molécules actives employées pour limiter les risques et éviter le développement de résistance. Un effet mildiou déclaré en fin de campagne (dans le cas des années les plus pluvieuses notamment) peut justifier l'utilisation de nouvelles spécialités commerciales ou l'emploi de cuivre (de même pour l'utilisation de soufre en cas de développement d'oïdium). Toutefois, le choix des fongicides suivis au cours de ce travail (parmi l'ensemble des molécules potentiellement épandues chaque année) a été fixé par le comité de thèse réunissant entre autres des professionnels. Nous avons ainsi choisi de nous cantonner aux 4 fongicides organiques les plus largement répandus et pulvérisés dans le territoire de Gaillac comme ailleurs en viticulture. Les métaux ne seront pas suivis, ni dans les sols, ni dans les eaux de drainage.

La formulation Rildgold F Pépité (Syngenta®) épandue sur la vigne se présente sous la forme de petites granules ou pépites brunes et permet de combiner l'action de 2 fongicides (le **folpel** : 40% de la formulation et le **métalaxyl** : 4,85 % de la formulation).

Ce fongicide est épandu sur toutes les modalités à partir de la mi-mai en alternance avec d'autres agents anti-fongiques en fonction des données météorologiques et de la pression phytosanitaire associée ...

La dose maximale de folpel appliquée sur la parcelle pour l'ensemble des traitements d'une campagne phytosanitaire est de 1920 g ha⁻¹. La dose totale de métalaxyl appliquée sur la parcelle pour l'ensemble des traitements d'une campagne phytosanitaire est de 232,8 g ha⁻¹. Selon les préconisations d'utilisation, le métalaxyl ne doit pas être appliqué sur mildiou déclaré mais seulement en lutte préventive de début de campagne.

Le **fosétyl-aluminium** est épandu sur la parcelle en formulation avec le mancozèbe dans un produit appelé Artimon ou Rhodax Express (Philagro France®) se présentant sous la forme de granulés bruns contenant 35% de fosétyl-Al (et 35 % de mancozèbe).

Ce fongicide est épandu sur toutes les modalités à partir de la mi-mai et durant toute la période estivale (environ tous les 14 jours en fonction de la pression phytosanitaire).

La dose maximale de matière active appliquée sur la parcelle pour l'ensemble des traitements d'une campagne phytosanitaire est de 6300 g ha⁻¹ (répartie en 3 traitements de 1400 g ha⁻¹ chacun).

Pour le myclobutanil, la formulation épandue sur la parcelle est le Mycloss Fort (Dow AgroSciences, Philagro France®) qui se présente sous forme d'un concentré liquide visqueux blanc, soluble dans l'eau, contenant la matière active à la concentration de 200 g L⁻¹. Le Mycloss Fort est épandu à la fin du printemps (fin mai - début juin), en tant que fongicide préventif sur l'ensemble de la parcelle. La dose totale et maximale appliquée est de 60 g ha⁻¹ répartie en 2 traitements phytosanitaires de la vigne de 30 g ha⁻¹ chacun. Une fois cette dose maximale autorisée déjà épandue sur la parcelle, le soufre mouillable vient jouer une action complémentaire anti-oïdium (Microthiol, 4050 g ha⁻¹ par application).

La stratégie insecticide choisie préconise une alternance de 2 molécules : 2 traitements à base d'un pyréthriinoïde (la lambda-cyhalothrine) encadrant un traitement organophosphoré (le chlorpyrifos-éthyl).


La formulation d'organophosphoré appliquée : Nelpon D (Dow AgroSciences, Philagro France®) se présente sous la forme d'un liquide concentré soluble jaune très clair contenant 228 g L⁻¹ de chlorpyrifos-éthyl. La dose totale de matière active appliquée en une seule fois sur la parcelle est de 342 g ha⁻¹.

La formulation de λ-cyhalothrine se présente sous la forme d'un liquide blanc très visqueux : Karaté Zéon (Syngenta®) contenant 100 g L⁻¹ de matière active. La dose totale de matière active appliquée sur la parcelle pour l'ensemble des traitements d'une campagne phytosanitaire est de 25 g ha⁻¹ (répartie en 2 traitements de 12,5 g ha⁻¹ chacun).

La préparation des bouillies et l'épandage des molécules actives se sont fait dans les règles des bonnes pratiques agricoles. Les bouillies sont préparées sur une aire imperméable, le reliquat est contrôlé en sortie de parcelle et après chaque traitement. Les fonds de cuve sont rincés sur la parcelle et les reliquats transférés dans des phytobacs.

L'épandage des insecticides et des fongicides se fait directement sur les vignes par un pulvérisateur pneumatique en face par face. Les herbicides sont appliqués par un pulvérisateur à jets projetés (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Conditions des épandages phytosanitaires



	Traitements fongicides et insecticides	Traitements herbicides
Type de matériel	Pulvérisateur pneumatique en face par face	Pulvérisateur à jets projetés
Pression (bars)	3	4
Vitesse d'avancement (km/h)	6	6

Les 3 tableaux ci-dessous (Tableaux 2.2 ; 2.3 ; 2.4) présentent les traitements et les interventions répertoriés sur la parcelle durant les 3 dernières années.

Tableau 2.2 : Traitements et interventions réalisés sur la parcelle en 2006

Année 2006					
Date	Intervention	Produit	Matière active	Concentration de la matière active dans la formulation	Concentration appliquée (g ha ⁻¹)
16/03/2006	désherbage post-levée	KICK OFF	glyphosate	360 g L ⁻¹	ss le rang: 720 en plein: 1440
05/04/2006	désherbage pré-levée	PLEDGE	flumioxazine	50%	ss le rang: 200 en plein: 600
20 au 24/04/2006	travail du sol inter-rang (actisol 10-15 cm)	/	/	/	/
20 au 24/04/2006	1ère tonte inter-rang	/	/	/	/
26/04/2006	travail du sol inter-rang (actisol 10-15 cm)	/	/	/	/
11/05/2006	anti-mildiou	ARTIMON	mancozèbe + fosétyl	35% / 35 %	700 / 700
24/05/2006	travail du sol inter-rang (actisol 10-15 cm)	/	/	/	/
24/05/2006	anti-mildiou	EPERON MIX PEPITE	métalaxyl + folpel	4,85% / 40%	116,4 / 960
	anti-oidium	MYCLOSS FORT	myclobutanil	200 g L ⁻¹	30
30/05/2006	2ème tonte inter-rang	/	/	/	/
02/06/2006	anti-mildiou	EPERON MIX PEPITE	métalaxyl + folpel	4,85% / 40%	116,4 / 960
	anti-oidium	MYCLOSS FORT	myclobutanil	200 g L ⁻¹	30
06/06/2006	travail du sol inter-rang (actisol 10-15 cm)	/	/	/	/
9 au 13/06/2006	épamprage	REGLONE 2	diquat	200 g L ⁻¹	600
16/06/2006	anti-mildiou	ARTIMON	mancozèbe + fosétyl	35% / 35 %	1400 / 1400
	anti-oidium	MI LORD	tébuconazole + spiroxamine	100 / 400 g L ⁻¹	50 / 200
16/06/2006	insecticide	KARATE ZEON	λ-cyhalothrine	100 g L ⁻¹	12,5
30/06/2006	3ème tonte inter-rang	/	/	/	/
03/07/2006	anti-mildiou	RHODAX EXPRESS	mancozèbe + fosétyl	35% / 35 %	1400 / 1400
	anti-oidium	MICROTHIOL	souffre	81%	4050
03/07/2006	insecticide	KARATE ZEON	λ-cyhalothrine	100 g L ⁻¹	12,5
21 et 25/07/2006	désherbage post-levée (tâches)	KICK OFF	glyphosate	360 g L ⁻¹	
30/07/2006	insecticide	DURSBEL	chlorpyrifos-éthyl		

Tableau 2.3 : Traitements et interventions réalisés sur la parcelle en 2007

Année 2007					
Date	Intervention	Produit	Matière active	Concentration de la matière active dans la formulation	Concentration appliquée (g ha-1)
15/03/2007	désherbage post-levée	KICK OFF	glyphosate	360 g L-1	ss le rang: 864 en plein: 1800
15/03/2007	travail du sol inter-rg		actisol 10-15 cm	/	/
16/04/2007	désherbage pré-levée	KATANA	flazasulfuron	25%	ss le rang: 16,5 en plein: 50
10/04/2007	anti-acariose	ARTIMON+ TRILOG	mancozèbe + fosétyl soufre micronisé	35% / 35 % 80%	280 / 280 4000
25/04/2007 09/05/2007	épamprage	REGLONE 2	diquat	200 g L-1	200
01/05/2007	anti-mildiou	ARTIMON	mancozèbe + fosétyl	35% / 35 %	1050 / 1050
10/05/2007	anti-mildiou	RIDGOLD F PEPITE	métalaxyl + folpel	4,85% / 40%	97 / 800
	anti-oidium	TRIOLOG	soufre micronisé	80%	4800
22/05/2007	tonte inter-rang	/	/	/	/
23/05/2007	travail du sol inter-rang	/	actisol 10-15 cm	/	/
24/05/2007	épamprage (tâches)	REGLONE 2	diquat	200 g L-1	DES : 90 - TRA : 60 - ENHB : 30 - ENHG : 120
25/05/2007	anti-mildiou	RIDGOLD F PEPITE	métalaxyl + folpel	4,85% / 40%	97 / 800
	anti-oidium	MILORD	tébuconazole + spiroxamine	100 / 400 g L-1	50 / 200
07/06/2007	anti-mildiou	VALIANT FLASH	fosétyl + folpel + cymoxanil	50% / 25% / 4%	1500 / 750 / 120
	anti-oidium	MYCLOSS FORT	myclobutanil	200 g L-1	30
19/06/2007	anti-mildiou	ARTIMON	mancozèbe + fosétyl	35% / 35 %	1400 / 1400
	anti-oidium	MYCLOSS FORT	myclobutanil	200 g L-1	30
19/06/2007	insecticide	KARATE ZEON	Λ-cyhalothrine	100 g L-1	12,5
22/06/2007	tonte inter-rang	/	/	/	/
25/06/2007	travail du sol inter-rang	/	actisol 10-15 cm	/	/
28/06/2006	anti-mildiou	MIKAL FLASH	fosétyl + folpel	50% / 25%	2000 / 1000
	anti-oidium	TRIOLOG	soufre micronisé	80%	4800
28/06/2007	insecticide	KARATE ZEON	Λ-cyhalothrine	100 g L-1	12,5
05/07/2007	anti-mildiou curatif	CYMSUN	cuivre + cymoxanil	300 g L-1 / 30 g L-1	1200 / 120
	anti-oidium	TRIOLOG	soufre micronisé	80%	4800
09/07/2007	tonte inter-rang	/	/	/	/
13/07/2007	anti-mildiou curatif	CYMSUN	cuivre + cymoxanil	300 g L-1 / 30 g L-1	1200 / 120
25/07/2007	anti-mildiou curatif	CYMSUN	cuivre + cymoxanil	300 g L-1 / 30 g L-1	1200 / 120
26/07/2007	insecticide	NELPON D	chlorpyrifos-éthyl	228 g L-1	342
26/07/2007	désherbage post-levée (tâches)	KICK OFF	glyphosate	360 g L-1	
27/07/2007	désherbage post-levée (tâches)	KICK OFF	glyphosate	360 g L-1	
27/07/2007	désherbage post-levée (tâches)	KICK OFF	glyphosate	360 g L-1	
01/08/2007	anti-mildiou contact	NORDOX 75 WG	cuivre de l'oxyde cuivreux	75%	1125 g

Tableau 2.4 : Traitements et interventions réalisés sur la parcelle en 2008

Année 2008					
Date	Intervention	Produit	Matière active	Concentration de la matière active dans la formulation	Concentration appliquée (g ha-1)
04/04/2008	désherbage post-levée	KICK OFF	glyphosate	360 g L-1	ss le rang: 864 en plein: 1800
08/04/2008	travail du sol inter-rang	/	actisol 10-15 cm	/	/
29/04/2008	désherbage pré-levée	PLEDGE	flumioxazine	50%	ss le rang: 200 en plein: 600
02/05/2008	anti-mildiou	ARTIMON	mancozèbe + fosétyl-Al	35% / 35 %	700 / 700
13/05/2008	anti-mildiou	RIDGOLD F PEPITE	métalaxyl + folpel	4,85% / 40%	97 / 800
22/05/2008	anti-mildiou	RIDGOLD F PEPITE	métalaxyl + folpel	4,85% / 40%	97 / 800
	anti-oidium	MYCLOSS FORT	myclobutanil	200 g L-1	30
fin mai	travail du sol inter-rang	/	actisol 10-15 cm	/	/
fin mai	tonte inter-rang	/	/	/	/
04/06/2008	anti-mildiou	VIGNOR 2	chlorothalonil + cymoxanil + folpel	200g L-1 - 60g L-1 - 200g L-1	400 / 120 / 400
	anti-oidium	MYCLOSS FORT	myclobutanil	200 g L-1	30
18/06/2008	anti-mildiou	AMAROK	cymoxanil + folpel	40g L-1 - 334g/ L	120 / 1002
	anti-oidium	MYCLOSS FORT	myclobutanil	200 g L-1	30
18/06/2008	insecticide	KARATE ZEON	λ-cyhalothrine	100 g L-1	12,5
01/07/2008	anti-mildiou	MIKAL FLASH	fosétyl-Al + folpel	50% / 25%	2000 / 1000
	anti-oidium	TRILOG	soufre micronisé	80%	4000
02/07/2008	insecticide	KARATE ZEON	λ-cyhalothrine	15%	10
début juillet	travail du sol inter-rang	/	actisol 10-15 cm	/	/
début juillet	tonte inter-rang	/	/	/	/
17/07/2008	anti-mildiou	AVISO CUP DF	cymoxanil + métirame-zinc + cuivre	4,8% / 18,4% / 24,1%	120 / 460 / 602,5
	anti-oidium	TRILOG	soufre micronisé	80%	2400
22/07/2008	anti-oidium	STROBY DF	krésoxim-méthyl	50%	100
	anti-mildiou	NORDOX 75 WG	cuivre de l'oxyde cuivreux	75%	1125
31/07/2008	anti-oidium	MICROTHIOL	soufre micronisé	81%	4860
	insecticide	NELPON D	chlorpyrifos-éthyl	228 g L-1	342
13/08/2008	anti-mildiou	NORDOX 75 WG	cuivre de l'oxyde cuivreux	75%	1050
	anti-mildiou	CHAMP FLO	cuivre de l'hydroxyde de cuivre	360 g L-1	1188

Les années 2007 et 2008 ont présenté des conditions météorologiques très humides, avec un printemps très pluvieux, ce qui a induit une importante pression parasitaire et une lutte antifongique accrue (multiplication des traitements, utilisation d'un plus grand nombre de matières actives...). Les traitements insecticides obéissent aux dates fixées par arrêtés préfectoraux. Les herbicides de pré-levée ont été alternés d'une année sur l'autre.

Dès 2007, la vigne a dépassé l'état de plantier. Les photographies ci-dessous présentent une vision de la parcelle faisant apparaître les différentes modalités d'entretien du sol.

Modalité 1 : désherbage chimique intégral (sous le rang et sur l'inter-rang)



Modalité 2 : désherbage chimique sous le rang et travail du sol sur l'inter-rang



Modalité 3 : désherbage chimique sous le rang et enherbement permanent semé sur l'inter-rang



Modalité 4 : répétition de la modalité 3 (désherbage chimique sous le rang et enherbement permanent semé sur l'inter-rang) mais sur un sol de graves, les trois premières modalités étant mises en place sur un sol de boubènes.



La modalité 4 (enherbée sur graves) faisant intervenir un type de sol différent ne sera pas étudiée dans le cadre de l'étude des transferts de produits phytosanitaires.

2 Matériels et méthodes du suivi des transferts

2.1 Matériels

2.1.1 Collecte des échantillons de sol et d'eau d'infiltration

Les **échantillons de sol** sont prélevés à l'aide d'une tarière, jusqu'à une profondeur de 40 cm (Figure 2.11). Les carottages sont répartis en 3 sachets de sol : l'un de 0 à 5 cm de profondeur (prélèvement de surface), l'autre de 5 à 20 cm et enfin le dernier de 20 à 40 cm de profondeur, afin de mettre en évidence les hétérogénéités de structure et de texture mais aussi de teneur en pesticides en fonction de la profondeur.



Figure 2.11 : Prélèvement de sols sur la parcelle en sortie d'hiver sur la modalité désherbée

Ces prélèvements sont effectués à différentes dates en fonction des traitements appliqués sur la parcelle et de la pression phytosanitaire qui s'exerce chaque année sur la vigne.

Pour chaque modalité, trois prélèvements sont effectués. Chaque modalité est divisée en 3 mailles de même surface et l'échantillonnage est effectué au hasard

dans chaque maille (un point par maille) de manière à limiter le biais induit par l'hétérogénéité des parcelles de l'expérimentation (Figure 2.12).

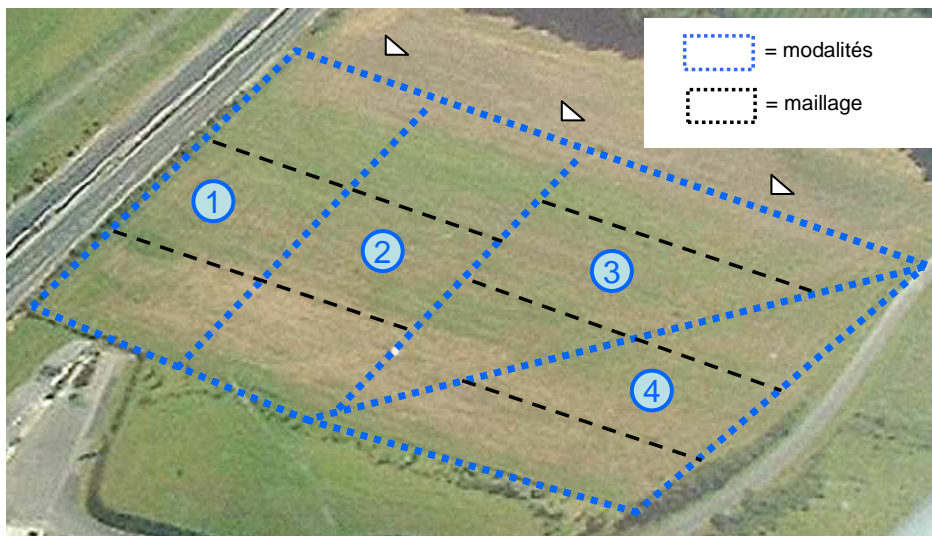


Figure 2.12 : Maillage systématique de la parcelle : un prélèvement de sol est effectué de manière aléatoire dans la maille de chaque modalité. Des prélèvements témoins sont aussi réalisés (△).

Chacun des prélèvements fera l'objet d'un double échantillonnage : l'un sous le rang entre 2 ceps de vigne, l'autre dans l'inter-rang. Par ailleurs, 3 échantillons témoins sont collectés lors de chaque prélèvement (positionnement sur la figure 2.12) : il s'agit d'échantillons de sol situé à proximité de la parcelle expérimentale mais ne faisant l'objet d'aucun traitement direct (assimilable à une prairie naturelle non désherbée, ni travaillée mécaniquement ou encore semée).

Les échantillons prélevés sont stockés au laboratoire à l'obscurité, à -20°C en attendant d'être analysés.

La collecte des échantillons d'eau se fait en sortie des drains dans le local souterrain. Après chaque épisode pluvieux, un agent de l'IFV s'assure du fonctionnement des drains et collecte l'eau recueillie mécaniquement dans les bonbonnes suite aux basculements des augets. La collecte de l'eau dans la bonbonne se fait ainsi manuellement, quotidiennement en période de pluies intenses en fonction de l'eau écoulée.

Si la quantité recueillie est inférieure à 2 litres, la totalité de l'échantillon est collectée dans des bouteilles en verre. Si cette quantité est supérieure, 2 litres sont collectés

après homogénéisation de la bonbonne à l'aide d'une pipette en verre. Le reste de l'échantillon stocké dans la bonbonne est alors rejeté vers le drain évacuateur. Nous disposons ainsi d'un échantillon moyen, correspondant à un prélèvement ponctuel, bilan de l'écoulement depuis la dernière date de prélèvement.

Afin de minimiser les pertes de pesticides par adsorption sur les parois des flacons ou par photodégradation, nous avons choisi d'utiliser des bonbonnes et des bouteilles en verre de couleur brune (opaque). Le plastique ayant été écarté pour éviter les risques trop importants d'adsorption, le choix de flacons en polycarbonate ou en polyéthylène téréphtalate (PET) avait été envisagé du fait de leur caractère inerte. Nous citerons toutefois les essais menés en laboratoire par **Patty (1997)** qui ont montré que pour une solution aqueuse d'isoproturon et de trifluraline conservée pendant 48 h dans un flacon en PET, l'adsorption de ces molécules s'élevait respectivement à 0,2 et 30 % (**Guimont, 2005**). Par ailleurs, le coût de ces matériaux et le besoin de bonbonnes de 20 litres nous ont conduit à l'utilisation du verre opaque pour nos expérimentations.

Les bonbonnes et bouteilles ont été décontaminées préalablement à l'expérimentation par un rinçage à l'éthanol (2 fois) suivi d'un rinçage à l'eau distillée. Chaque bouteille servant à la collecte des échantillons est étiquetée, remplie au tiers en vue de sa congélation (-20°C) pour une bonne conservation de l'eau et des traces de molécules durant quelques jours. Les bouteilles sont ensuite transférées au laboratoire à Albi en voiture dans une glacière (obscurité et froid) en vue de leur analyse.

2.1.2 Pesticides, solvants et verrerie spécifique

Les pesticides utilisés comme standards (pureté ≥ 98 %) pour nos expérimentations (élaboration de gammes étalon, enrichissement artificiel de sols en molécules actives) ont été achetés chez Promochem (Molsheim, France). Syngenta Agro SAS (Saint-Cyr l'Ecole, France) a fourni 3 des molécules de l'étude : la λ -cyhalothrine, le diquat et le métalaxyl.

Les échantillons de produits en formulation sont directement prélevés dans les bidons servant au traitement de la parcelle.

Les solvants nécessaires à nos études (acétone, dichlorométhane) sont de qualité spéciale pour l'analyse de traces de pesticides en chromatographie (CHROMASOLV®, pureté $\geq 99,9\%$). Ils proviennent de chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Enfin, le fonctionnement de l'extracteur pour l'Extraction Liquide Pressurisée (PLE) de Dionex S.A. Corporation (Voisins Le Bretonneux, France) nécessite des cellules d'extraction, de la verrerie, des filtres et des joints en téflon spécifiques pour l'Accelerated Solvent Extraction (ASE) 100 achetés chez le fournisseur de l'appareil.

2.1.3 Préparation des standards

Des solutions stock de pesticides standard sont préparées par dilution des molécules dans le dichlorométhane ou dans l'acétone (1 mg mL^{-1}). Des dilutions en gamme permettent alors de constituer des solutions filles nécessaires à la réalisation de gammes étalon, à la détermination des limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) instrumentales.

Par ailleurs, des standards sont réalisés avec les molécules en formulation. La solubilisation des poudres, granules ou bouillie de produits formulés se fait dans l'eau distillée. Les solutions filles pour les gammes ($0,1$ à $2,5 \cdot 10^{-4} \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) sont ensuite diluées dans l'acétone ou le dichlorométhane.

Dans notre étude, les standards commerciaux, en tenant compte de la dilution de la molécule due aux adjuvants (tensio-actifs, adhésifs, émulsionnants, stabilisants, colorants, matières répulsives...) présents dans les produits formulés, présentent le même comportement que les standards de molécules pures. Ainsi, nous utiliserons par la suite les molécules pures pour simplifier nos protocoles.

2.2 Méthode

Les 10 pesticides retenus pour notre étude appartiennent à des familles chimiques différentes. Il s'agit de molécules multi-classes. L'objectif est alors d'élaborer une méthode rapide et efficace pour l'extraction, l'identification, et le dosage simultanés

de ces molécules cibles présentes à l'état de traces dans les sols et les eaux d'infiltration.

Nous décrirons ainsi dans cette partie les méthodes élaborées puis validées pour la phase d'extraction des molécules du sol et de l'eau, et la phase de détermination analytique de ces pesticides.

Toutefois, les protocoles testés ne nous ont pas permis de mettre en œuvre des techniques d'extraction efficaces et compatibles avec la routine pour le glyphosate, le diquat et le fosétyl-aluminium. Nous présenterons cependant la mise en place de protocoles d'analyse ayant donné des résultats positifs mais très lourds à mettre en œuvre pour ces 3 sels.

2.2.1 Phase d'extraction

2.2.1.1 *Extraction des pesticides du sol*

La préparation des échantillons et l'extraction constituent les étapes les plus délicates. L'extraction des pesticides du sol est très souvent réalisée avec la technique du Soxhlet (**Cizdziel et Hodge, 2000 ; Fatoki et Awofolu, 2003**), de l'extraction assistée par ultrasons (UAE) (**Bossio et al., 2008**) ou l'extraction assistée par les micro-ondes (MAE) (**Fatoki et Awofolu, 2003 ; Padron-Sanz et al., 2005 ; Moreno et al., 2006 ; Fuentes et al., 2007**). Le tableau 2.5 non exhaustif présente une vue d'ensemble des différentes techniques récemment utilisées pour chacun des composés de ce cocktail utilisé en viticulture. La procédure d'extraction varie selon la matrice mais le tableau 1 fait état de nombreux processus intégrant des extractions en phase solide (**Topuz et al., 2005 ; Ibanez et al., 2006 ; Gonzalez-Rodriguez et al., 2008 ; Hildebrandt et al., 2008**), des extractions solides-liquides (**Bermudez-Couso et al., 2007**) ou des extractions liquides pressurisées (PLE) (**Kawata et al., 2005 ; Diaz-Cruz et Barcelo, 2006**) pour l'extraction des produits phytosanitaires du sol, des sédiments, composts ou vases.

Toutefois, une nouvelle étude a confirmé que l'extraction PLE a une meilleure efficacité que la MAE ou le Soxhlet pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) ou les pesticides organochlorés (**Wang et al., 2007**). Les

travaux de **Ferrell et Vencill, 2004** montrent également que la technique d'extraction de la flumioxazine du sol par PLE s'avère très efficace et répétable. Cette technique (extraction PLE) sera donc retenue pour l'extraction des pesticides du sol.

Tableau 2.5 : Synthèse bibliographique non exhaustive d'articles récents relatant les méthodes de détermination des pesticides de notre étude dans différentes matrices

Pesticide	Méthode d'extraction	Technique analytique	Analyse en composé seul ou multirésidus	Matrices analysées	LOD méthodologiques	Réf.
Flazasulfuron	SPE	LC-MS	Multirésidus	Eaux	0,005 µg mL ⁻¹	Ayano <i>et al.</i> , 2004
Métalaxyl	SPE	HPLC-UV	Multirésidus avec myclobutanil	Eaux profondes	0,035 µg mL ⁻¹	D'Archivio <i>et al.</i> , 2007
	/	GC-NPD HPLC	Multirésidus avec myclobutanil	Air Air	0,012 µg mL ⁻¹ 0,012 µg mL ⁻¹	Tsiropoulos <i>et al.</i> , 2006
	Extraction à l'acétate d'éthyle	LC-MS/MS	Multirésidus avec myclobutanil et chlorpyrifos	Raisins	10 µg kg ⁻¹	Venkateswarlu <i>et al.</i> , 2007
	SPE	GC-MS	Multirésidus	Eaux de surface et profondes	0,01 µg mL ⁻¹	Hildebrandt <i>et al.</i> , 2008
	SPE	GC-MS	Multirésidus avec λ-cyhalothrine	Légumes, salades	1 µg kg ⁻¹	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2008
	Extraction à l'eau et au méthanol	LC-MS/MS	Multirésidus	Plants de tabac	20 à 40 µg kg ⁻¹	Mayer-Helm <i>et al.</i> , 2008
	Extraction solide-liquide	GC-MS	Multirésidus avec folpel	Sols Sédiments	1 à 4 µg kg ⁻¹ (sols) 1 à 5 µg kg ⁻¹ (sédiments)	Bemudez-Couso <i>et al.</i> , 2007
	SPE dispersive + acétate d'éthyle	GC-TOF/MS GC X GC-TOF/MS	Multirésidus avec chlorpyrifos, myclobutanil et λ-cyhalothrine	Raisins Raisins	13 µg kg ⁻¹ 3 µg kg ⁻¹	Banerjee <i>et al.</i> , 2008
Chlorpyrifos	Extraction à l'acétate d'éthyle	LC-ESI-MS/MS	Multirésidus avec metalaxyl et myclobutanil	Raisins	10 µg kg ⁻¹	Venkateswarlu <i>et al.</i> , 2007
	PLE	GC-MS	Multirésidus	Composts	30 µg kg ⁻¹	Kawata <i>et al.</i> , 2005
	SPE dispersive + acétate d'éthyle	GC-TOF/MS GC X GC-TOF/MS	Multirésidus avec metalaxyl, myclobutanil et λ-cyhalothrine	Raisins Raisins	6 µg kg ⁻¹ 1 µg kg ⁻¹	Banerjee <i>et al.</i> , 2008
	PLE	GC-MS	Multirésidus	Vase, bourbe Sols agricoles	< 62 µg kg ⁻¹ < 31 µg kg ⁻¹	Diaz-Cruz and Barcelo, 2006
Folpel	Extraction solide-liquide	GC-MS	Multirésidus avec metalaxyl	Sols Sédiments	1 à 4 µg kg ⁻¹ (sols) 1 à 5 µg kg ⁻¹ (sédiments)	Bemudez-Couso <i>et al.</i> , 2007
	SPE	HPLC-UV	Multirésidus	Jus de fruit	0,5 µg kg ⁻¹	Topuz <i>et al.</i> , 2005
Myclobutanil	/	GC-NPD HPLC	Multirésidus avec metalaxyl	Air Air	0,006 µg mL ⁻¹ 0,006 µg mL ⁻¹	Tsiropoulos <i>et al.</i> , 2006
	Extraction à l'acétate d'éthyle	LC-ESI-MS/MS	Multirésidus avec metalaxyl et chlorpyrifos	Raisins	10 µg kg ⁻¹	Venkateswarlu <i>et al.</i> , 2007
	SPE dispersive + acétate d'éthyle	GC-TOF/MS GC X GC-TOF/MS	Multirésidus avec metalaxyl, chlorpyrifos et λ-cyhalothrine	Raisins Raisins	10 µg kg ⁻¹ 2,5 µg kg ⁻¹	Banerjee <i>et al.</i> , 2008
λ-cyhalothrine	SPE	GC-MS/MS	/	Huiles végétales	0,3 µg kg ⁻¹	Esteve-Turillas <i>et al.</i> , 2005
	Acétate d'éthyle + dispersion en phase solide	LC-MS/MS	/	Fruits	0,4 à 2 mg kg ⁻¹	Soler <i>et al.</i> , 2004
	SPE	GC-MS	Multirésidus avec metalaxyl	Légumes, salades	2 µg kg ⁻¹	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2008
	SPE dispersive + acétate d'éthyle	GC-TOF/MS GC X GC-TOF/MS	Multirésidus avec metalaxyl, myclobutanil et chlorpyrifos	Raisins Raisins	17 µg kg ⁻¹ 3 µg kg ⁻¹	Banerjee <i>et al.</i> , 2008
Flumioxazine	SPE - LLE - PLE	GC-MS	/	Sols, eaux	LOD instrumentale : 9 ng mL ⁻¹	Ferrell and Vencill, 2004
Glyphosate	Extraction sur colonne : Chelex100 puis AG 1-X8 (lavage HCl) NaOH et HCl	GC-MS	Avec son métabolite AMPA	Eaux	< 0,1 µg L ⁻¹	Borjesson and Torstensson, 2000
	/	GC-MS	Avec son métabolite AMPA	Sols	< 0,006 µg g ⁻¹	Borjesson and Torstensson, 2000
	/	HPLC	Avec son métabolite AMPA	Eaux et plantes	0,16 µg L ⁻¹	Nedelkoska and Low, 2004
	Membrane liquide supportée	HPLC-UV + dérivation (TsCl)	Avec son métabolite AMPA	Jus de fruits	<0,025 mg L ⁻¹	Khrolenko and Wiczorek, 2005
	SPE	LC-ESI-MS/MS + dérivation (HCl + FMOC)	Avec son métabolite AMPA	Sols Eaux	5 µg kg ⁻¹ 5 ng L ⁻¹	Ibanez <i>et al.</i> , 2005 Ibanez <i>et al.</i> , 2006
	Extraction à l'eau puis dichlorométhane et purification sur colonne CAX	LC-MS/MS+ dérivation (FMOC-Cl)	Avec son métabolite AMPA	Nourriture : fruits, légumes, viande, miel...	0,05 mg kg ⁻¹	Li <i>et al.</i> , 2007
Eaux: membrane d'acétate de cellulose Sols: KH ₂ PO ₄ , agitation et filtration	HPLC-UV + dérivation (FMOC-Cl)	/	Eaux Sols, sédiments	<0,1 mg L ⁻¹ <0,5 mg kg ⁻¹	Peruzzo <i>et al.</i> , 2008	
Diquat	Extraction eau/hexane	LC-ESI-MS	Multirésidus	Huiles d'olive	4 µg kg ⁻¹	Aramendia <i>et al.</i> , 2006
	Extraction au méthanol	HPLC-UV	Multirésidus	Matériel biologique	1 ng mL ⁻¹ ou g ⁻¹	Fuke <i>et al.</i> , 2002
	Réduction par NaBH ₄ puis SPE	GC-MS	Avec le Paraquat	Plasma et urine	0,05 mg L ⁻¹	Menck de Almeida and Yonamine, 2007
	Digestion ou agitation ou MAE Nettoyage par SPE	HPLC-UV et confirmation par LC-MS/MS	Multirésidus	Sols	1 à 2 µg kg ⁻¹ (digestion) 5 à 7,5 µg kg ⁻¹ (MAE)	Pateiro-Moure <i>et al.</i> , 2008
	Extraction Fluide Supercritique (SFE)	HPLC-UV (DAD)	Avec le Paraquat	Huiles d'olive	0,002 µg g ⁻¹	Zougagh <i>et al.</i> , 2008
Fosétyl-Al	Extraction à l'eau au « mixeur »	LC-MS	/	Laitues	< 0,05 mg kg ⁻¹	Hernandez <i>et al.</i> , 2003

Abréviations: GC, chromatographie en phase gazeuse; FMOC, 9-fluorénylméthylchloroformate; HPLC, chromatographie liquide haute performance; LC, chromatographie en phase liquide (ESI: ionisation par électrospray); LLE, extraction liquide-liquide; LOD, limite de détection; MAE, extraction assistée par microondes; MS, spectrométrie de masse; NPD, détecteur au nitrogène-phosphore; PLE, extraction liquide pressurisée; SFE, extraction au fluide supercritique; SPE, extraction en phase solide; TOF, Temps de vol.

2.2.1.1.1 Pré-traitement

La terre, préalablement prélevée sur la parcelle et conservée à l'obscurité et -20°C, est lentement décongelée puis séchée durant 1h à 50°C en vue de sa déshydratation. Le sol est ensuite finement broyé dans un mortier à l'aide d'un pilon. 100 g de ce sol sont pesés et introduits dans une cellule de l'extracteur de 66 mL.

2.2.1.1.2 Principe de l'Extraction Liquide Pressurisée (PLE)

L'extraction solide-liquide des molécules actives à partir d'échantillons de sol est réalisée grâce à un extracteur « Accelerated Solvent Extractor » ASE 100 de chez Dionex Corporation (Figure 2.13).

D'après la littérature (**Conte et al., 1997 ; Popp et al., 1997 ; Tao et al., 2004 ; Wang et al., 2007**), cet extracteur permet, en combinant températures élevées et fortes pressions, d'accomplir des extractions sur des matrices solides ou semi-solides en un temps plus court qu'une extraction traditionnelle type Soxhlet et avec de plus faibles quantités de solvant.



Figure 2.13 : Extracteur ASE 100 (Dionex) et ses cellules

Le principe de l'appareil est assez simple. Une cellule contenant un échantillon de sol est placée dans l'extracteur, elle est alors remplie de solvant jusqu'à un volume déterminé (en % du volume total de la cellule). L'échantillon de sol baignant ainsi dans le solvant est soumis à l'action de fortes températures et fortes pressions (10^7 Pa), ce qui permet d'augmenter la dissolution des composés dans le solvant, leur diffusion et les transferts de matière dans un temps assez bref (cette phase est

appelée temps statique de l'extraction). Le solvant et les molécules extraites qu'il contient sont ensuite collectés puis la cellule peut être à nouveau remplie plusieurs fois selon la méthode d'extraction choisie. Le processus se termine par une purge du solvant contenu dans la cellule sous pression d'azote gazeux.

2.2.1.1.3 Méthode choisie

Plusieurs paramètres peuvent être réglés afin de mener à bien une extraction optimale des molécules à partir d'échantillons de sol contaminé.

Après différents tests d'optimisation de chacun des paramètres : solvant, température, nombre de cycles (décrits dans l'article ci-après, **Schreck et al., 2008 a**), une méthode d'extraction optimale a pu être définie (Tableau 2.6).

Tableau 2.6 : Récapitulatif des paramètres de la méthode d'extraction définis pour la matrice sol

Paramètres	Valeurs
Volume de la cellule	66 mL
Volume de terre contaminée	100 g (terre bien tassée)
Solvant	Acétone
Température	100°C
Temps statique	2 min
Flush volume	60 %
Nombre de cycles	3
Temps de purge	120 s

Le protocole d'extraction des molécules du sol débute alors par un rinçage de l'extracteur à l'acétone avec la cellule spécifique de rinçage. Un rinçage de l'appareil est également nécessaire à chaque changement de solvant et en fin de journée.

100 g de terre préalablement séchée sont alors introduits et bien tassés dans une cellule de 66 mL. La cellule est placée dans l'appareil en vue de son extraction. Le solvant contenant les pesticides extraits est récupéré dans une bouteille en verre Dionex et transféré dans un ballon.

L'ensemble de ces réglages de l'appareil pour une extraction optimale a été réalisé à partir d'échantillons de sol artificiellement contaminés en matières actives.

Pour cela, nous avons enrichi en pesticides de la terre prélevée sur une prairie voisine de la parcelle, de même composition pédologique, mais exempte de traitement phytosanitaire depuis plusieurs années.

Une extraction de cette terre témoin non dopée a été réalisée au laboratoire, selon les mêmes conditions opératoires que pour les échantillons de sols contaminés. L'analyse a révélé l'absence de pesticides dans cette terre, confirmant notre hypothèse et validant ainsi son utilisation comme sol « neutre ». Cette vérification a été réalisée en triplicat.

La contamination artificielle est réalisée sur une terre séchée. Un échantillon de sol est pesé, mis à séché puis réhumidifié avec le volume perdu, par une solution aqueuse contenant les pesticides de l'étude. La réhumidification se fait dans un grand mortier. La terre est alors malaxée pour assurer une contamination homogène de l'échantillon. Celui-ci est alors placé une journée au congélateur afin de reproduire les conditions subies par les échantillons du terrain.

100 g de terre contaminée sont pesés puis extraits selon les conditions opératoires définies plus haut.

Cet enrichissement du sol a été réalisé avec des solutions de différentes concentrations en pesticides (contamination en gamme de 1 à 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de sol).

Cette contamination artificielle nous a ainsi permis de définir la méthode d'extraction optimale, mais également de connaître les rendements d'extraction pour chacune des molécules étudiées. Par ailleurs, elle permet de déterminer aussi les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) méthodologiques.

L'ensemble de ces expérimentations ainsi que leurs résultats ayant donné lieu à la publication d'un article dans la revue *Talanta* (**Schreck et al., 2008 a**) seront détaillés dans le document ci-joint (**section 2.2.2.2.4**).

2.2.1.2 Extraction des pesticides de l'eau

Le protocole d'extraction et de dosage des traces de pesticides dans les eaux d'infiltration débute par une extraction liquide-liquide des molécules de la matrice inspirée des travaux de **Ferrell et Vencill (2004)** sur la flumioxazine.

Il a été mis au point à partir de solutions aqueuses artificiellement enrichies en pesticides au laboratoire (contamination en gamme de 1 à 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ d'eau)

Cette extraction utilise le dichlorométhane comme solvant organique. Celui-ci a été choisi en raison de la grande solubilité des molécules actives dans ce solvant, sa non-miscibilité à l'eau et sa densité supérieure à celle de l'eau. Ceci permet de récupérer facilement la phase organique contenant les pesticides après l'extraction dans l'ampoule à décanter : en effet, le solvant organique constitue la phase la plus lourde et reste donc au fond de l'ampoule après décantation.

Le volume de dichlorométhane nécessaire à l'extraction correspond à 80 % du volume d'eau d'infiltration à extraire ($V_{\text{dichlorométhane total}} = 0,8 V_{\text{eau}}$) réparti en 3 fois (**Ferrell et Vencill, 2004**).

Nous notons qu'en fonction de l'écoulement des drains et donc du nombre de basculements des augets, le volume collecté à extraire est variable : de 300 mL à 1 L.

L'extraction se fait dans une ampoule à décanter (de taille adaptée au volume à extraire).

La totalité du volume de cette eau de drainage à extraire est préalablement introduite dans l'ampoule, à l'aide d'un entonnoir en verre. La bouteille du prélèvement est alors rincée avec de l'eau distillée. Les matières en suspension (MES) sont analysées également. Elles peuvent en effet constituer des sédiments emportés vers les nappes plus profondes et sur lesquels sont adsorbées les molécules phytosanitaires ayant le Koc le plus élevé. Le choix de garder ces MES est arbitraire mais il nous semble intéressant de conserver ces particules car elles sont véhiculées par l'eau dans le sol et potentiellement responsables de la contamination des eaux souterraines.

Un tiers du volume de dichlorométhane est ajouté à l'eau en vue de la première extraction. L'extraction se fait par agitations énergiques ponctuées de dégazages. Il y a alors transfert de matière vers le dichlorométhane qui s'enrichit alors en molécules à l'état de traces. Celui-ci se décante ensuite progressivement (Figure 2.14).

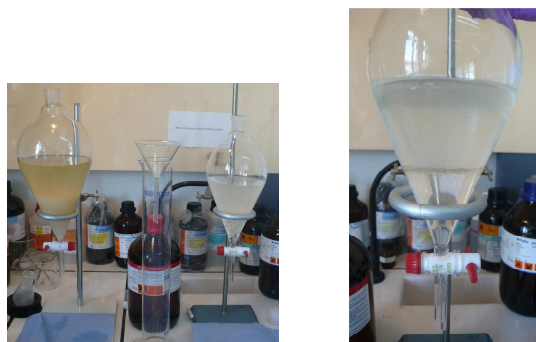


Figure 2.14 : Extraction liquide-liquide au dichlorométhane des molécules présentes dans l'eau de drainage (adaptation de la taille de l'ampoule au volume à extraire ; à gauche, présence de particules en suspension dans l'eau de drainage).

Le dichlorométhane enrichi en pesticides après cette première extraction est alors récupéré dans un ballon en vue de son évaporation. L'embout de l'ampoule est alors rincé à la pipette Pasteur avec le solvant.

L'extraction est reconduite 2 fois, la phase organique étant toujours collectée dans le même ballon.

L'expérience a montré qu'après 3 étapes de lavage, l'extraction est optimale. Le tableau 2.7 présente les rendements d'extraction pour chacune des molécules.

Tableau 2.7 : Rendements de l'extraction liquide-liquide des pesticides des eaux de drainage

Molécule	Masse molaire	Rendement d'extraction liquide-liquide (%) **
Flazasulfuron *	407,4	75,10 ± 3,51
Métalaxyl	279,3	79,56 ± 4,12
Chlropyrifos	350,6	65,23 ± 3,76
Folpel	296,6	88,17 ± 3,58
Myclobutanil	288,8	89,03 ± 1,58
λ-cyhalothrine	449,9	70,93 ± 2,65
Flumioxazine	354,3	90,47 ± 3,96

* Le flazasulfuron étant faiblement volatile et thermiquement instable (Galetti et al., 1995 ; Ayano et al., 2004), le composé suivi en GC-MS est son produit de thermolyse (spectre présenté en [Annexe 1](#)).

** Rendement d'extraction ± erreur standard (%)

2.2.1.3 Concentration et dilutions des échantillons

Les extraits de sol dans l'acétone et les extraits d'eau dans le dichlorométhane, récupérés dans des ballons, sont concentrés.

Le solvant est évaporé à sec, à l'évaporateur rotatif. Le ballon est rincé 3 fois au dichlorométhane. Le solvant de rinçage est transféré dans un pilulier en vue de son évaporation sous courant d'azote. L'échantillon est ensuite repris dans 500 µL de dichlorométhane pour les extraits de sol et dans 50 µL de ce même solvant pour les extraits d'eau.

La solution peut ainsi être analysée avec la méthode d'analyse multi-résidus appropriée et de ce fait être comparée à une solution de référence afin de connaître les concentrations en molécules actives recherchées (étalonnage externe).

2.2.2 Analyse chromatographique

Différents tests ont été réalisés sur les différents postes analytiques du laboratoire.

Le tableau 2.5 récapitule également les différentes **procédures analytiques** décrites dans la littérature pour le dosage de chaque matière active.

L'ensemble de ces pesticides a déjà été étudié dans diverses matrices individuellement (**Hernandez et al., 2003 ; Ayano et al., 2004 ; Ferrell et Vencill, 2004**) ou avec des méthodes spécifiques pour chaque famille de molécules.

Selon la matrice et le composé recherché, la détermination des pesticides est menée par différentes techniques analytiques comme la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) ou la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (Tableau 2.5). La GC-MS en mode impact électronique apporte souvent de meilleurs résultats que la LC-MS ou la GC-MS par ionisation chimique en termes de LOD (**Ayano et al., 2004 ; Topuz et al., 2005 ; D'Archivio et al., 2007**), pour des raisons de rendement d'ionisation.

Par ailleurs, ce tableau montre que les 7 pesticides retenus pour l'étude n'ont jamais été analysés simultanément. Notre objectif sera alors d'essayer de mettre au point une méthode analytique multirésidus sur l'ensemble de ces composés cibles.

Le glyphosate, le diquat et le fosétyl-Al feront l'objet d'un chapitre ultérieur du fait des travaux de mise au point analytiques qu'ils demandent, incompatibles avec un traitement en routine.

2.2.2.1 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Cette méthode séparative couplée à une détection très sensible permet l'identification de molécules volatiles, thermostables à l'état de traces dans des mélanges complexes.

L'appareil est un chromatographe Trace de Finnigan équipé d'un passeur d'échantillon couplé à un spectromètre de masse équipé d'un analyseur à piégeage de charge (trappe à ions) Polaris Q de Thermo Electron Corporation, Courtaboeuf les Ulis, France (Figure 2.14). L'ensemble est piloté par un ordinateur muni d'un système d'acquisition et d'exploitation des données utilisant le logiciel *XCalibur*.



Figure 2.15 : Chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse à piégeage de charges (Finnigan PolarisQ)

Le chromatographe est équipé d'une colonne apolaire Restek RTX-5MS (5 % diphényle, 95 % diméthylpolysiloxane) de 30 m de long, 0,25 mm de diamètre intérieur et 0,25 μm d'épaisseur de film. Le gaz vecteur est l'hélium (qualité Alpha 2 - Air Liquide, France) avec un débit de 1 mL min^{-1} .

Le spectromètre de masse est utilisé en mode impact électronique (EI : mode d'ionisation provoqué par des collisions avec les électrons à 70 eV ; intensité du filament de 250 μA). Avant chaque utilisation, le spectromètre est calibré automatiquement (réglage en mode AutoTune).

Les conditions expérimentales et leur optimisation ayant donné lieu à la publication d'un article dans la revue *Talanta* font l'objet d'un prochain chapitre (**section 2.2.2.2.4**).

La méthode est adaptée des travaux de **Kawata *et al.* (2005)** dosant les pesticides (cyperméthrine et chlorpyrifos) présents dans le compost. Le gradient de température de la colonne a été programmé de 50°C (pendant une minute) jusqu'à 280°C (pendant 10 minutes) avec un pas de 15°C min⁻¹. La température de l'injecteur est de 250°C, le mode d'injection est le « splitless » (il permet pour les échantillons en solution très diluée une concentration des composés vaporisés dans les tous premiers décimètres de la colonne (**Rouessac *et al.*, 1992**). La température de la ligne de transfert est de 200°C et celle de la chambre d'ionisation est de 250°C, avec une énergie d'ionisation de 70 eV et une fenêtre de balayage de masse de m/z 50 à 450. Le volume injecté est de 1µL.

Les composés sont alors **identifiés par leur temps de rétention** sur le chromatogramme et par leurs **ions spécifiques** caractérisés par leur rapport masse/charge (m/z) sur le **spectre de masse**.

Les aires des pics sont déterminées sur le chromatogramme obtenu en mode balayage sur la base du Courant Ionique Total (TIC) à partir duquel un appel (ou extraction) des ions spécifiques est réalisé pour chacune des molécules de l'étude. Le mode balayage (scan) du TIC consiste à prendre les spectres complets entre 2 masses extrêmes de façon répétée.

Pour les solutions les plus diluées, le rapport Signal/Bruit (SN) permet de déterminer si l'on se trouve à la limite de détection ou de quantification. La **limite de détection** notée LOD (SN ≈ 3) est définie comme étant la plus petite quantité d'un analyte pouvant être détectée et considérée comme différente de la valeur du blanc, mais non certainement quantifié (**AFNOR, décembre 1999**). La **limite de quantification** notée LOQ (SN ≈ 10) est la plus petite grandeur d'un analyte pouvant être déterminé quantitativement.

L'utilisation de la MS en tandem (MS/MS) a pour avantage de supprimer le bruit de fond lié en partie à l'effet de la matrice. Cette technique permet de mieux isoler les molécules d'intérêt et d'améliorer ainsi la sélectivité et la sensibilité de la méthode d'analyse. Elle implique toutefois (dans une analyse en multi-résidus) que les temps de rétention des composés recherchés ne soient pas trop proches. En effet, les

fenêtres d'isolement doivent être suffisamment éloignées afin de pouvoir déterminer des segments d'analyse spécifiques de chaque ion caractéristique pour chacune des molécules.

2.2.2.2 Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à absorption ultraviolet (HPLC-UV)

Cette méthode séparative utilise un chromatographe liquide haute performance Finnigan (Thermo Electron Corporation, Courtaboeuf les Ulis, France) muni d'un passeur AS 3000, d'une pompe P4000. Celui-ci est couplé à un système de détection à absorption UV : UV 6000 P à barette de diodes (UV-DAD). L'ensemble est piloté par un ordinateur muni du logiciel d'exploitation et d'acquisition des données *ChromQuest*.

Une colonne de type Kromasil RP-18 (150mm x 4,6 mm, 5µm) permet la séparation des molécules sous gradient de solvant.

Nos conditions de travail ont été déterminées d'après les différentes données de la littérature (**Armenta et al., 2005 ; Rivas et al., 2006**). Le mode d'élution utilisé est un système de solvant (acétonitrile / eau) ; Tableau 2.8.

Dans le but de déterminer simultanément les composés étudiés, les conditions chromatographiques ont été optimisées afin notamment de pouvoir séparer la flumioxazine et le myclobutanil qui sortent à des temps très proches.

Tableau 2.8 : Gradient de solvant de la méthode multi-résidus HPLC/UV

Temps (mn)	Acétonitrile (%)	Eau (%)
0	60	40
7	67	33
10	95	5
15	95	5
17	60	40
20	60	40

20 µL de la solution sont injectés dans le système conditionné à 60 % d'acétonitrile ; après un palier de 7 min, le gradient de solvant monte progressivement jusqu'à 95 %

de solvant à un débit de 1 mL min⁻¹. La séquence marque ensuite un second palier de 5 min avant le retour aux conditions initiales.

Le Tableau 2.9 résume les caractéristiques obtenues pour chacune des molécules détectables avec cette méthode en HPLC-UV.

Tableau 2.9 : Récapitulatif des données relatives aux molécules pour une analyse en HPLC-UV

Pesticide	Temps de rétention (min)	LOD instrumentale (µg mL ⁻¹)	λ max (nm)
Métalaxyl	3,1	0,5	222 et 274
Flumioxazine	4,2	0,12	223 et 294
Myclobutanil	4,55	0,2	227
Folpel	6,11	0,2	232 et 303
Chlorpyrifos	11,2	0,7	237 et 295
λ-cyhalothrine	12,39	0,75	222 et 281

Nous remarquons toutefois que le flzasulfuron, le diquat, le glyphosate et le fosétyl-Al ne sont pas détectables par la méthode mise au point.

Le chromatogramme suivant (Figure 2.16) présente la séparation du mélange des 6 autres pesticides à la concentration de 2,5 µg mL⁻¹.

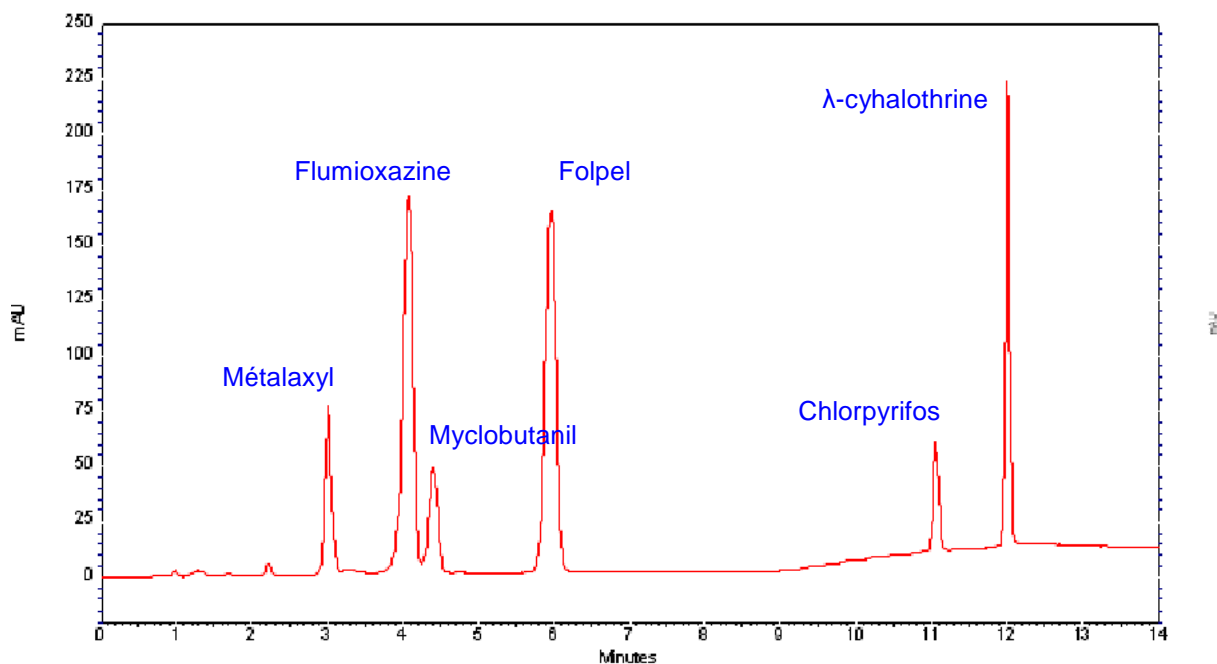


Figure 2.16 : Chromatogramme HPLC-UV de la séparation d'un mélange de 6 pesticides à 2,5 µg mL⁻¹. Phase stationnaire: colonne RP-18 (150mm x 4,6 mm, 5µm) ; phase mobile: acétonitrile / eau ; détection UV (λ = 226nm)

Cette méthode permet une analyse multi-résidus, intéressante pour les molécules difficilement détectables en GC-MS (folpel et flumioxazine notamment).

2.2.2.3 Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

L'appareil utilisé est un chromatographe en phase liquide Finnigan Surveyor (Thermo Electron Corporation, Courtaboeuf les Ulis, France) muni d'un système de pompe et d'un passeur couplé à une détection en spectrométrie de masse à trappe à ions (LCQ Advantage Max de Thermo Finnigan) (Figure 2.17). L'appareil est piloté depuis un ordinateur équipé du logiciel *XCalibur*. La Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) a été conduite sur une phase stationnaire de type phase inverse RP18 (Phenomenex) de 15 cm de long, 2 mm de diamètre intérieur et 5 μm de granulométrie de phase).



Figure 2.17 : Chromatographe liquide couplé à un spectromètre de masse à trappe d'ion

L'appareil est utilisé le plus souvent en mode ionisation par électrospray positif (ESI+).

Les premiers tests ont été réalisés en infusion ($5 \mu\text{L min}^{-1}$) dans le méthanol sur certaines des molécules recherchées. Le gradient de solvant appliqué dans notre méthode correspond à celui élaboré sur le poste HPLC-UV.

2.2.2.4 Développement et optimisation analytique

La chromatographie gazeuse couplée à une détection en spectrométrie de masse (GC-MS) présente d'une manière générale plusieurs avantages : rapidité, sensibilité, simplicité, reproductibilité, faibles coûts... De ce fait, c'est la méthode retenue pour l'ensemble de l'étude.

En effet, l'objectif était de sélectionner la méthode analytique offrant les meilleurs « rendements » pour l'ensemble des molécules en une seule injection, tout en offrant des limites de détection les plus faibles possibles pour la majorité des composés.

Ainsi, la méthode proposée est rapide. Elle permet la détermination simultanée des 7 pesticides multi-classes dans des échantillons de sols agricoles ou d'eau de drainage (le diquat, le glyphosate et le fosétyl-Al n'étant plus recherchés pour des raisons de difficultés méthodologiques). Elle est facile à mettre en œuvre, utilisable en routine et ne nécessite pas d'étapes de nettoyage, souvent longues.

La mise au point et la validation de la méthode analytique sont décrites dans l'article ci-après publié dans le journal **Talanta** (**Schreck *et al.*, 2008 a**), à partir d'échantillons de sols.

Les conditions chromatographiques sont décrites précédemment (**section 2.2.2.3.1**). Elles permettent de séparer les 7 molécules étudiées sur un même chromatogramme (Figure 2.18).

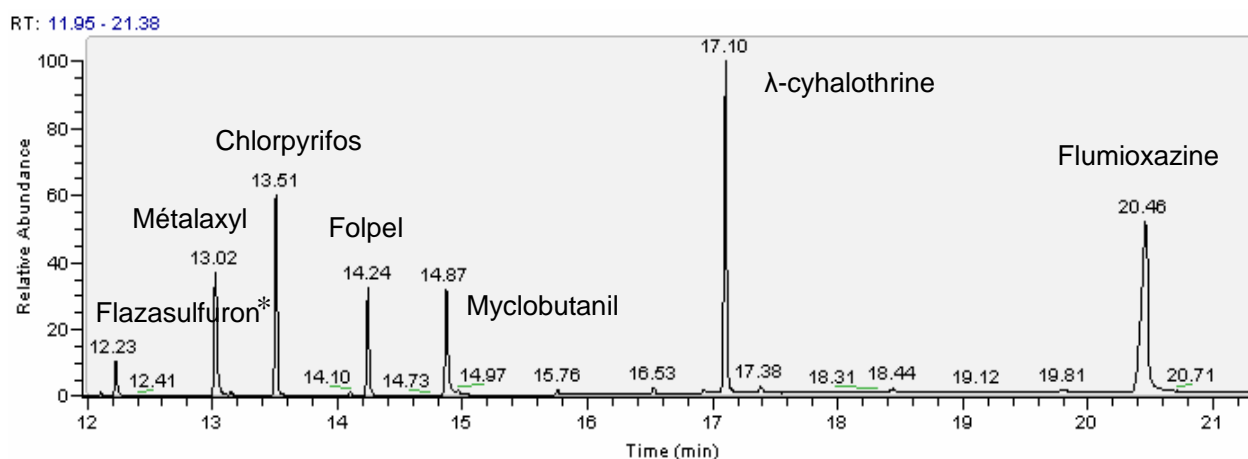


Figure 2.18 : Chromatogramme qualitatif en mode TIC (Courant ionique total),

* Produit de dégradation du flazasulfuron.

Les spectres de masse de chacun des composés sont présentés en annexe (**Annexe 1**).

La quantification de chaque molécule se fait ensuite (dans les échantillons de sol ou d'eau concentrés) par appel des ions caractéristiques sur le chromatogramme de masse en TIC.

La figure 2.19 ci-dessous présente un exemple de détection du myclobutanil dans un échantillon d'eau d'infiltration de la parcelle.

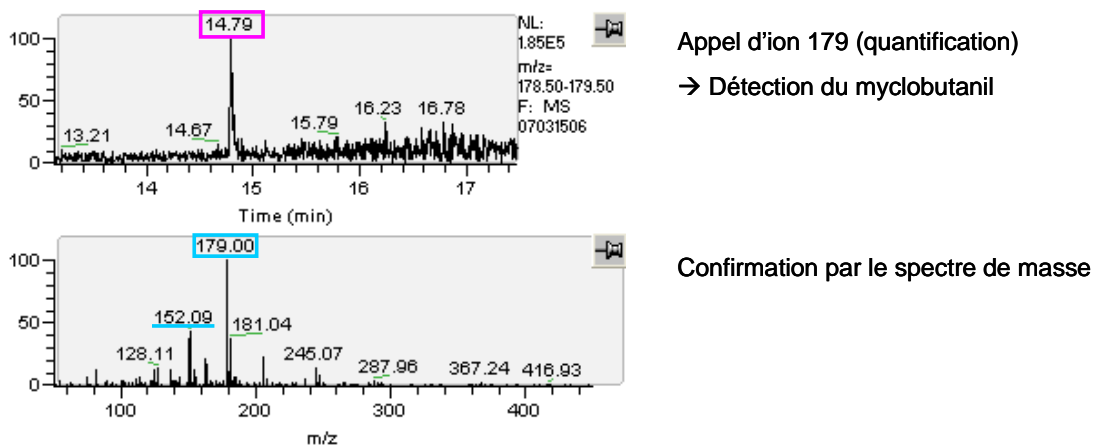


Figure 2.19 : Identification du myclobutanil en TIC et appel d'ion dans un échantillon d'eau de drainage collectée sur la parcelle (Modalité 1, 08/12/2006)

Les tableaux 2.10 et 2.11 sont des récapitulatifs des rendements d'extraction et des caractéristiques des molécules utilisées pour leur détermination et quantification en GC-MS, à partir d'échantillons de sols (Tableau 2.10) ou d'eaux de drainage (Tableau 2.11).

Tableau 2.10 : Rendements de l'extraction par PLE et caractéristiques du dosage des molécules en GC-MS à partir d'échantillons de sol

Molécule	Masse molaire	Rendement d'extraction PLE (%) **	Temps de rétention (min)	Ions spécifiques (m/z)	LOD instrumentale ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD méthodologique ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Flazasulfuron *	407,4	68,00 \pm 4,65	12,23	231,1 232;188,1	0,25	3,68
Métalaxyl	279,3	99,90 \pm 4,40	13,02	206,1 160; 132,1	0,25	3,75
Chlropyrifos	350,6	53,83 \pm 2,36	13,51	197 199; 313,9	0,25	4,64
Folpel	296,6	64,33 \pm 4,06	14,24	260 130; 104,1	1	7,77
Myclobutanil	288,8	81,20 \pm 0,81	14,87	179 152; 150	0,5	3,08
λ-cyhalothrine	449,9	87,43 \pm 2,97	17,10	181,1 197,1; 141,2	0,25	1,43
Flumioxazine	354,3	96,33 \pm 4,91	20,46	354 232; 188,2	1	5,19

* Le flazasulfuron étant faiblement volatile et thermiquement instable (Galetti et al., 1995 ; Ayano et al., 2004), le composé suivi en GC-MS est son produit de thermolyse (spectre présenté en [Annexe 1](#)).

** Rendement d'extraction \pm erreur standard (%)

Tableau 2.11 : Rendements de l'extraction liquide-liquide et limites de détection méthodologiques du dosage des molécules en GC-MS à partir d'échantillons d'eaux de drainage

Molécule	Masse molaire	Rendement d'extraction liquide-liquide (%) **	LOD méthodologique ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Flazasulfuron *	407,4	75,10 \pm 3,51	0,017
Métalaxyl	279,3	79,56 \pm 4,12	0,016
Chlropyrifos	350,6	65,23 \pm 3,76	0,039
Folpel	296,6	88,17 \pm 3,58	0,139
Myclobutanil	288,8	89,03 \pm 1,58	0,014
λ-cyhalothrine	449,9	70,93 \pm 2,65	0,036
Flumioxazine	354,3	90,47 \pm 3,96	0,056

* Le flazasulfuron étant faiblement volatile et thermiquement instable (Galetti et al., 1995 ; Ayano et al., 2004), le composé suivi en GC-MS est son produit de thermolyse (spectre présenté en [Annexe 1](#)).

** Rendement d'extraction \pm erreur standard (%)

L'ensemble de ces résultats et discussions relatifs au traitement des échantillons de sol est présenté dans l'article ci-joint :

Schreck E, Geret F, Gontier L, Treilhou M, 2008 a. Development and validation of a rapid multiresidue method for pesticide determination using gas chromatography–mass spectrometry: A realistic case in vineyard soils. Talanta 77, 298-303.



Development and validation of a rapid multiresidue method for pesticide determination using gas chromatography–mass spectrometry: A realistic case in vineyard soils

E. Schreck^{a,b,*}, F. Geret^a, L. Gontier^b, M. Treilhou^a

^a Laboratoire de Chimie et Biochimie des Interactions, Université de Toulouse, Centre universitaire JF Champollion, Place de Verdun, 81012 Albi, France

^b Institut Français de la Vigne et du Vin-IFV Midi-Pyrénées, V'innopôle, BP 22, 81310 Lisle sur Tarn, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 March 2008
Received in revised form 9 June 2008
Accepted 18 June 2008
Available online 27 June 2008

Keywords:

Pesticides
Pressurized liquid extraction (PLE)
Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)
Soil samples

ABSTRACT

A rapid and simultaneous method for residue identification and quantification for seven pesticides in agricultural soils has been developed to study a realistic situation in vineyard. The target compounds are two insecticides, two herbicides and three fungicides, from different chemical families. The procedure is based on a pressurized liquid extraction (PLE) with acetone, before a multiresidue GC–MS analysis. The recovery of PLE is between 53.8 ± 2.4 and $99.9 \pm 4.4\%$ according to pesticide. A limit of detection (LOD) between 1.4 and $4.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ of dry soil was obtained for five analytes. This procedure for testing soil contamination is sensitive and easy to perform.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pesticides are widely sprayed on agricultural land, especially in wine-growing areas, because of their agronomic applications: chemical weeding, yield damage prevention, pest control against crop destruction, etc. New agricultural practices attempt to reduce the quantities of toxic compounds applied but pesticides are still used in vineyards. They could accumulate in soils and become a real environmental pollution risk [1].

Different mixtures of compounds are typically sprayed on vineyards. However, a cocktail of seven of them is widely used by wine growers (especially in the Gaillac area, south-west France), and potentially present in soil. These pesticides belong to several different chemical families: two herbicides (flazasulfuron: sulfonylurea, and flumioxazin: *N*-phenylimide), two insecticides (chlorpyrifos-ethyl: organophosphate, and λ -cyhalothrin: pyrethroid), and three fungicides (metalaxyl: xylylalanine, folpet: thiophthalimide, and myclobutanil: triazole). So, the aim of this study was to elaborate a rapid and efficient method to

determine pesticide accumulation and pollution in Gaillac vineyard.

Sample preparation and compound extraction is one of the most delicate steps in pesticide determination at trace levels in soils. At present, pesticide extraction from soils is mostly done using the Soxhlet technique [2,3], the ultrasonic assisted extraction (UAE) [4] or microwaves-assisted extraction (MAE) [3,5–7]. The non-exhaustive Table 1 shows an overall picture of the different techniques previously used for each compound of this vine cocktail. The extraction procedure changes according to the sample matrices but Table 1 reports also solid–liquid extraction [8] and pressurized liquid extraction (PLE) [9,10] for vine pesticide extraction from soils, sediments, composts or sludges. However, a new study has shown that PLE has better extraction efficiency than MAE or Soxhlet extraction for PAHs and organochlorine pesticides [11]. Moreover, as reported by Ferrell and Vencill [12], PLE was proved to be a highly efficient and repeatable means of extracting flumioxazin from soils.

Table 1 summarizes too the different analytical procedure that have been used for each target compound. These seven vine pesticides have already been studied individually [12,13] or with class-specific methods in different sample matrices. According to the matrix and the analyte, pesticide determination was carried out by different analytical methods such as liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) or gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) (see references in Table 1). Even if the detection

* Corresponding author at: Laboratoire de Chimie et Biochimie des Interactions, Université de Toulouse, Centre universitaire JF Champollion, Place de Verdun, 81012 Albi, France. Tel.: +33 5 63 48 17 00; fax: +33 5 63 48 64 33.
E-mail address: eva.schreck@univ-jfc.fr (E. Schreck).

Table 1
Reported procedures for pesticide residues determination in different matrices

Pesticide	Extraction Procedure	Analytical Technique	Multiresidue method	Sample, Matrices	Methodological LOD	Ref.
Flazasulfuron	SPE	LC-MS	Multiresidue	Waters	0.005 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[13]
Metalaxyl	SPE	HPLC-UV	Multiresidue with myclobutanil	Groundwaters	0.035 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[14]
	/	GC-NPD HPLC	Multiresidue with myclobutanil	Air samples Air samples	0.012 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 0.012 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[18]
	Ethyl acetate extraction	LC-MS/MS	Multiresidue with chlorpyrifos and myclobutanil	Fresh grape samples	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[19]
	SPE	GS-MS	Multiresidue	Surface and groundwaters	0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[20]
	SPE	GS-MS	Multiresidue with λ -cyhalothrin	Leafy vegetables	1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[21]
	Water and methanol extraction	LC-MS/MS	Multiresidue	Tobacco plants	20–40 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[22]
	Solid-liquid extraction	GS-MS	Multiresidue with folpet	Soils Sediments	1–4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (soils) 1–5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (sediments)	[8]
	Ethyl acetate + dispersive SPE	GC-TOF/MS GC X GC-TOF/MS	Multiresidue with chlorpyrifos, myclobutanil and λ -cyhalothrin	Grapes Grapes	13 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[23]
Chlorpyrifos	Ethyl acetate extraction	LC-ESI-MS/MS	Multiresidue with metalaxyl and myclobutanil	Fresh grape samples	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[19]
	PLE	GC-MS	Multiresidue	Composts	30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[9]
	Ethyl acetate + dispersive SPE	GC-TOF/MS GC X GC-TOF/MS	Multiresidue with metalaxyl, myclobutanil and λ -cyhalothrin	Grapes Grapes	6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[23]
	PLE	GC-MS	Multiresidue	Sludges Agricultural soils	<62 $\mu\text{g kg}^{-1}$ <31 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[10]
Folpet	Solid-liquid extraction	GC-MS	Multiresidue with metalaxyl	Soils Sediments	1–4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (soils) 1–5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (sediments)	[8]
	SPE	HPLC-UV	Multiresidue	Fruit juices	0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[15]
Myclobutanil	/	GC-NPD HPLC	Multiresidue with metalaxyl	Air samples Air samples	0.006 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 0.006 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[18]
	Ethyl acetate extraction	LC-ESI-MS/MS	Multiresidue with metalaxyl and chlorpyrifos	Fresh grape samples	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[19]
	Ethyl acetate + dispersive SPE	GC-TOF/MS GC X GC-TOF/MS	Multiresidue with metalaxyl, chlorpyrifos and λ -cyhalothrin	Grapes Grapes	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 2.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[23]
λ -Cyhalothrin	Combined SPE	GC-MS/MS	/	Vegitable oils	0.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[24]
	Ethyl acetate + solid phase dispersion	LC-MS/MS	/	Fruits	0.4–2 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[25]
	SPE	GC-MS	Multiresidue with metalaxyl	Leafy vegetables	2 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[21]
	Ethyl acetate + dispersive SPE	GC-TOF/MS GC X GC-TOF/MS	Multiresidue with metalaxyl, myclobutanil and chlorpyrifos	Grapes Grapes	17 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[23]
Flumioxazin	SPE-LLE-PLE	GC-MS	/	Soils, waters	Instrumental LOD: 9 ng mL ⁻¹	[12]

Note: Non-exhaustive references (Ref.) were obtained from recent analytical abstracts. Abbreviations: LOD, limit of detection; GC, gas chromatography; LC, liquid chromatography (ESI: electrospray ionisation); MS, mass spectrometry; SPE, solid-phase extraction; PLE, pressurized liquid extraction; LLE, liquid-liquid extraction; HPLC, high performance liquid chromatography; TOF, time of flight; NPD, nitrogen-phosphorous detector.

limits depended on matrices, GC-MS provided often better results than LC-MS in terms of LOD (limits of detection), except for water and liquid samples [13–15].

Table 1 shows that these seven analytes have never been analysed simultaneously. However, they are lipophilic, volatile and thermally stable (except for flazasulfuron); so they can be determined using the PLE/GC-MS tandem. Moreover, the use of the PLE technique coupled with GC-MS analysis has already been tested with success in soil samples [10,16,17], particularly for organochlorine pesticides.

Thus, the aim of this paper is to focus on an actual case of possible contamination, and then set out a new analytical protocol. We propose a rapid method for the simultaneous determination of seven multi-class analytes from agricultural soils. It is suitable for

routine soil analyses from vineyards, often contaminated with this widely used pesticide cocktail.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

The standard pesticides were purchased from Promochem (Molsheim, France) (purity $\geq 98\%$). Syngenta Agro SAS (Saint Cyr l'Ecole, France) supplied two compounds: λ -cyhalothrin and metalaxyl. Standard stock solutions were prepared by dissolving each pesticide in acetone (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Reagents and solvents with pesticide analytical grade were obtained from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

Table 2
Retention times (RT) and specific selected ions for pesticide identification

Molecule	Use	Molecular weight	RT (min)	Specific fragment ions (<i>m/z</i>)	
				Quantification ion (<i>m/z</i> (% relative abundance))	Qualification ions (<i>m/z</i> (% relative abundance))
Flazasulfuron ^a	Herbicide	407.4	12.23	231.1 (100)	232 (16); 188.1 (16)
Metalaxyl	Fungicide	279.3	13.02	206.1 (87)	160 (100); 132.1 (60)
Chlorpyrifos-ethyl	Insecticide	350.6	13.51	197 (100)	199 (88); 313.9 (83)
Folpet	Fungicide	296.6	14.24	260 (94)	130 (100); 104.1 (72)
Myclobutanil	Fungicide	288.8	14.87	179 (100)	152 (42); 150 (32)
λ -Cyhalothrin	Insecticide	449.9	17.10	181.1 (100)	197.1 (42); 141.2 (33)
Flumioxazin	Herbicide	354.3	20.46	354 (100)	232 (16); 188.2 (15)

Note: The ion extraction in TIC focused on the three characteristic ions. For quantification, the chosen ion is the most representative of the analyte even if its relative abundance was not 100%.

^a Degradation product.

2.2. Apparatus

The extraction procedure was carried out using an Accelerated Solvent Extraction apparatus: ASE 100 system from Dionex S.A. Corporation (Voisins Le Bretonneux, France) with 66 mL stainless-steel vessels. A Finnigan Polaris Q gas chromatograph-ion trap mass spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Courtaboeuf les Ulis, France) with an RTX-5 (Restek Corporation, Lisses, France) column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m) was used for the quantitative analysis. The mass spectrometer was operated in electron-impact mode (EI-70 eV).

2.3. Soil samples

Agricultural soil samples were collected from an experimental area in a Gaillac vineyard, from the top 40 cm layer. After collection, the samples were immediately frozen in plastic bags at -20°C until extraction and quantitative analysis. The samples were dried 1 h at 50°C for dehydration before extraction.

The experiment yield recoveries, linearity and limits of detection (LOD) were determined using an uncontaminated soil (from the same area and with a similar composition) spiked with the target pesticides at known concentrations (concentration range from 1 to 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

2.4. Pressurized liquid extraction

Pesticide concentrations in soil samples were determined using pressurized liquid extraction with 100 g being introduced into a 66 mL cell with a piece of cellulose paper in the bottom. Extraction was performed at 10^7 Pa. PLE variables were selected carefully: solvent, temperature and number of cycles were tested in order to improve the soil extraction procedure and after several trials (Section 3.1), acetone was chosen as extraction solvent. Temperature was 100°C , with 3 cycles per sample, a 60% flush volume, a static time of 3 min and a purge time of 120 s [26,27]. The extract was evaporated to dryness using a rotary evaporator ($38\text{--}42^{\circ}\text{C}$) and the flask was rinsed three times with dichloromethane. The sample was then concentrated under reduced pressure and re-dissolved with 500 μL of dichloromethane.

2.5. GC-MS analysis

1 μL of the final extract was injected into the GC-MS for a multi-residues detection under temperature gradient.

The instrumental conditions were adapted from Kawata et al. [9]. The injector temperature was 250°C , in splitless mode. The oven temperature was programmed from 50°C (hold 1 min) to 280°C at $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (hold 10 min). Helium (alpha 2 from Air Liquide, France) was used as carrier gas (1 mL min^{-1}). The transfer line

and ionisation temperatures were 200 and 250°C , respectively. The mass spectrometer was calibrated daily.

All the compounds could be identified by their retention time on the chromatogram and their specific ion *m/z* on the mass spectrum (Table 2). Peak areas were obtained from the chromatogram in total ion current (TIC) with selected ion extraction. Pesticide quantification was based on comparison of the areas in the samples with those of the standards (external standard method).

Extractions and GC/MS analyses were made in triplicate.

3. Results and discussion

3.1. Effect of the PLE variables

Extraction solvent, temperature and number of cycles are important parameters to improve in order to achieve efficient extraction. All the seven pesticides listed were used for evaluating the effect of these variables.

Five different extraction solvents, acetone, hexane, dichloromethane, ethyl acetate and acetonitrile, selected according to their physico-chemical properties (polarity and pesticide solubility efficiency), were evaluated by studying their desorption efficiency.

Table 3 shows the results of the influence of solvent on pesticide extraction recoveries, at a temperature of 100°C (see below). The choice of solvent for extraction improvement is made by selecting the one with the best desorption efficiency for the largest number of compounds. Hexane is only efficient for two of the multi-class analytes: chlorpyrifos and λ -cyhalothrin, for the other compounds, the recoveries did not exceed 28%. With dichloromethane and ethyl acetate, the recoveries were average. The two most efficient were acetonitrile and especially acetone, which was thus selected as PLE solvent because of its improvement in the extraction methodology and advantages in use. In fact, acetone allows lipophilic compound solubility ($>4000\text{ g L}^{-1}$ for several pesticides [28]), it is only weakly toxic (DL 50 = 5800 mg kg^{-1} in the rabbit [29]) and easily eliminated in the environment. Moreover, as one of the cheapest solvents it can be used for routine analyses in the laboratory.

The effect of the extraction temperature on PLE performance for the seven pesticides was evaluated by testing three levels (80, 100 and 120°C).

Table 4 confirms that 100°C is the best temperature for optimal pesticide extraction. The recoveries were higher for the seven analytes. A temperature of only 80°C is not high enough to disrupt the solute-matrix interactions and active sites in soil [9]. However, results show a decrease in efficiency when the temperature is increased to 120°C , as previously reported by Kawata et al. [9] and Concha-Grana et al. [16] for a temperature of 150°C . Pesticides are damaged by high temperatures.

Thus, a temperature of 100°C was recommended for the extraction of the target pesticides.

Table 3
Influence of solvent on pesticide extraction recoveries

	Analytical recovery (%)									
	Acetone		Hexane		Dichloromethane		Ethyl acetate		Acetonitrile	
	Mean (%)	S.D. (%)	Mean (%)	S.D. (%)	Mean (%)	S.D. (%)	Mean (%)	S.D. (%)	Mean (%)	S.D. (%)
Flazasulfuron ^a	68.00	4.65	8.49	4.56	62.08	3.11	59.77	4.26	67.70	2.26
Metalaxyl	99.90	4.40	14.49	3.87	64.36	2.45	81.35	2.71	63.40	3.04
Chlorpyrifos	53.83	2.36	81.36	3.42	41.25	2.85	47.67	2.85	50.46	3.47
Folpet	64.33	4.06	28.01	2.36	42.11	4.08	58.57	3.46	57.51	3.31
Myclobutanil	81.20	0.81	11.59	3.38	77.68	1.99	70.81	2.39	71.56	2.84
λ -Cyhalothrin	87.43	2.97	101.1	5.01	77.82	2.41	84.50	3.01	106.01	6.12
Flumioxazin	96.33	4.91	7.2	3.42	20.9	3.78	31.60	2.97	21.26	3.15

^a Degradation product.**Table 4**
Influence of temperature on pesticide extraction recoveries

	Analytical recovery (%)					
	80 °C		100 °C		120 °C	
	Mean (%)	S.D. (%)	Mean (%)	S.D. (%)	Mean (%)	S.D. (%)
Flazasulfuron ^a	24.33	3.59	68.00	4.65	50.01	4.12
Metalaxyl	55.76	3.86	99.90	4.40	46.92	3.16
Chlorpyrifos	33.55	3.18	53.83	2.36	24.85	3.25
Folpet	35.17	2.16	64.33	4.06	28.86	4.92
Myclobutanil	60.93	2.45	81.20	0.81	48.41	4.67
λ -Cyhalothrin	60.3	4.06	87.43	2.97	55.71	2.83
Flumioxazin	10.24	2.78	96.33	4.91	21.61	4.64

^a Degradation product.**Table 5**
Influence of the number of cycles on pesticide extraction recoveries

	Recovery of each cycle in percentage of the total extractable quantity (%)		
	First extraction cycle	Second extraction cycle	Third extraction cycle
Flazasulfuron ^a	33.9	46	19.2
Metalaxy	79	18.7	2.2
Chlorpyrifos	80.7	16.6	<LOD
Folpet	86.2	12.7	<LOD
Myclobutanil	80.7	18.5	<LOD
λ -Cyhalothrin	84.9	13.9	<LOD
Flumioxazin	81	12.6	<LOD

^a Degradation product.

The number of extraction cycles was evaluated at a temperature of 100 °C with acetone. The results are given in Table 5. We noticed that two extraction cycles provided a good recovery, and could be sufficient to remove the total pesticide contents extractable by the

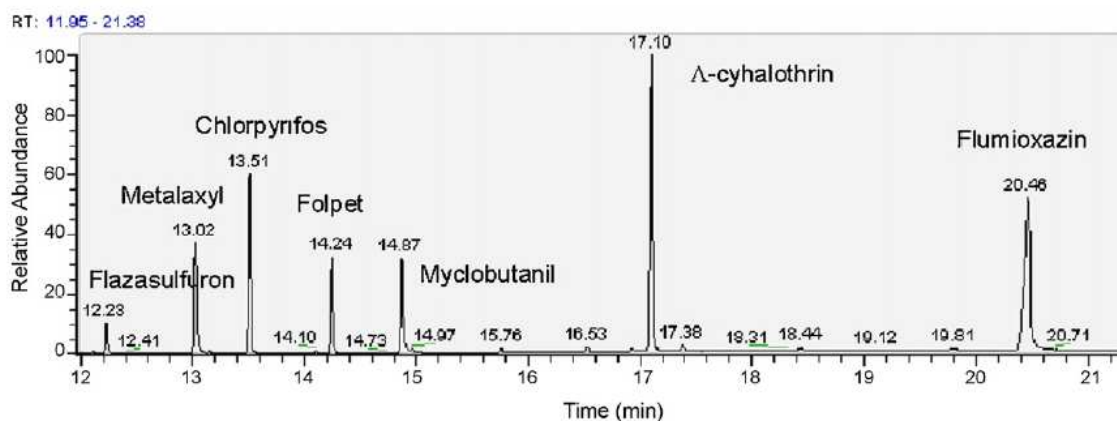
methodology. However, a third cycle was necessary to improve the extraction of two compounds (metalaxyl and flazasulfuron), so we chose three extraction cycles for this study. Actually, one cycle more did not increase significantly the solvent volume to evaporate and prolong the total extraction time of only a few minutes.

The efficiency and matrix effect during extraction were checked with an inert matrix (celite) spiked with the seven target pesticides. This method helped to detect anomalies due to extraction or instrumental causes (pressure and temperature). All the recoveries were the same as with the contaminated soil (statistical analysis with the non-parametric Kruskal–Wallis test, using the SPSS program (standard version 11.0, SPSS Inc.)).

3.2. Evaluation of the method performance and validation

The target compounds were identified in the soil matrix by their retention time and their mass spectrum. A qualitative chromatogram in total ion current (Fig. 1) shows that the multi-class compounds are simultaneously determined with the multi-residues method.

It is well known that sulfonylureas are generally not very responsive to separation by gas chromatography (GC) because of their extremely low volatility and high thermal instability [30], which explains why the herbicide flazasulfuron has so far only been studied using liquid chromatography [13]. However, this multi-class method allows the reproductive determination of the degradation product of flazasulfuron by GC–MS. The ion tracked in the mass spectrum (Fig. 2) is the thermolyze product, and while this methodology does not give flazasulfuron detection, it is possible to obtain a good idea of flazasulfuron concentration in the soil sample by following its degradation product, which has good linearity (Table 6). The ion 231.1 is chosen because of good sensitivity and selectivity.

**Fig. 1.** A qualitative chromatogram in total ion current (TIC mode).

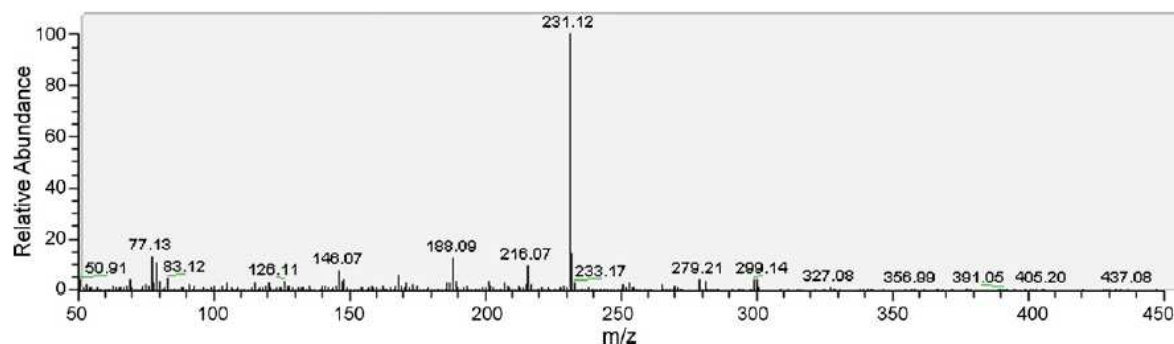


Fig. 2. Mass spectrum of the thermolyze product of the sulfonylurea herbicide flazasulfuron.

Table 6

Data for calibration curves and quantitative analysis

	Chromatogram area with ion extraction (3 replicates for each standard solution)																R^2
	0.00025 ^a		0.0005 ^a		0.00075 ^a		0.001 ^a		0.0025 ^a		0.005 ^a		0.0075 ^a		0.01 ^a		
	Area mean	S.D.	Area mean	S.D.	Area mean	S.D.	Area mean	S.D.	Area mean	S.D.	Area mean	S.D.	Area mean	S.D.	Area mean	S.D.	
Flazasulfuron ^b	859	9	1668	67	3104	127	4393	241	11014	443	29350	1175	48672	2092	66770	2874	0.989
Metalaxyl	508	5	1524	52	2260	112	4130	229	8390	328	22093	994	33184	1493	44840	1793	0.995
Chlorpyrifos	435	3	820	8	1235	46	2008	102	5021	204	11643	558	19521	839	27729	1275	0.989
λ -Cyhalothrin	<LOD		<LOD		199	8	807	7	1563	48	4257	178	8424	353	12998	571	0.947
Folpet	<LOD		1890	111	3792	136	5919	239	13025	526	32640	1386	52582	2314	71021	3195	0.993
Myclobutanil	1490	71	2866	114	4887	245	7909	320	18827	753	54254	1807	89645	3852	123017	5658	0.986
Flumioxazin	<LOD		<LOD		276	11	906	9	1864	104	5899	253	10886	468	14018	589	0.972

^a Concentration $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

^b Degradation product.

In order to evaluate performance and quantification for all the target pesticides, spiked samples of soil were used. No target pesticides were detected from these uncontaminated (blank) samples which were then spiked with the cocktail of pesticides at different concentrations (range from 1 to 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of soil). The samples were extracted 1 day after spiking and injected in GC–MS to estimate the methodological limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). The instrumental LOD and LOQ were determined with pesticide standards in acetone (see concentration range in Table 6). A range of pesticide concentrations (three replicates for each standard solution) allows the linearity of the calibration curve to be checked for each analyte, using peak areas (Table 6). Good response linearity was found for all the pesticides at concentrations within the tested interval (see R^2 in Table 6).

The limits of detection and quantification of the pesticides were experimentally obtained in TIC with ion extractions, on a signal-to-noise basis of 3:1 and 10:1, respectively. Table 7 gives the values of instrumental and methodological limits of detection and quantification. The LODs and LOQs were defined as three times of standard deviation (S.D.) on the basis of three independent determinations. The methodological LOD values are higher than those obtained instrumentally (with standard solutions). In fact, the methodolog-

ical LOD (or LOQ) includes all the procedural steps from sample collection to pesticide detection by mass spectrometry after GC/MS injection. So, the methodological values give an overall picture of extraction recoveries and the potential matrix effect in analyte determination. The matrix effect increases the LOQ and LOD a little, but it is still rather weak.

The methodological LOD (Table 7) are between 1.4 and 4.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of dry soil for five compounds (not flumioxazin or folpet). These LOD are in agreement with the bibliography values expressed in Table 1 for metalaxyl in soil and sediments samples [8] and for myclobutanil in grape samples [23], with GC–MS. For λ -cyhalothrin, better values were obtained than those obtained previously in fruits and vegetables [21,23]. An improvement in LOD with the PLE/GC–MS tandem is achieved for chlorpyrifos in soils or composts as compared with previous methods reported in literatures [9,10], Table 1. Thus, this new multiresidue method is sensitive, precise and easy to perform.

4. Application

This method was tested on a series of 54 agricultural soil samples collected from a Gaillac vineyard over a whole season

Table 7

Limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) for each compound

	Instrumental (standard solutions)		Methodological	
	LOQ (10:1) ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	LOD (3:1) ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	LOQ (10:1) ($\mu\text{g/kg}^{-1}$)	LOD (3:1) ($\mu\text{g/kg}^{-1}$)
Flazasulfuron ^a	0.69	0.25	11.20	3.68
Metalaxyl	0.79	0.25	8.87	3.75
Chlorpyrifos	0.81	0.25	14.01	4.64
Folpet	2.82	1	19.43	7.77
Myclobutanil	1.38	0.5	8.19	3.08
λ -Cyhalothrin	0.75	0.25	3.26	1.43
Flumioxazin	3.06	1	14.57	5.19

^a Degradation product.

from April to October, covering before, after and during pesticide spreading on the vines. Three sampling sites were located in the vine-growing area and three others in an uncontaminated area (controls). Each sample was divided into three depths, and every depth fraction was analysed in triplicate. We demonstrated that the procedure was very useful for checking pesticide residues in natural soils that had not been spiked artificially. Even if the concentrations were low, pesticide determination was still possible.

No target compounds were detected in blanks. During the pesticide spreading season, six analytes could be easily detected. The folpet was quickly degraded and not detected from the soil samples, as previously reported by Bermudez-Couso et al. [8,28]. The insecticides chlorpyrifos and λ -cyhalothrin were only detected in a very few samples of surface soil (0–5 cm of depth). The concentrations were at the limit of detection for these two pesticides. This observation suggests that chlorpyrifos was retained in soil rather than decomposed, as already noticed by Kawata et al. [9] and Reinecke and Reinecke [31]. Metalaxyl and myclobutanil were the two compounds found the most (as previously shown for fresh fruits like peppers by Martinez-Vidal et al. [32]). The two fungicides could be identified up to 40 cm deep in the soil due to their physico-chemical characteristics (solubility in water), and here their highest concentrations were about $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ of dry weight. In surface soil, the values reached a level of $8 \mu\text{g kg}^{-1}$ for myclobutanil and $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ for metalaxyl 1 day after pesticide spreading. The herbicides (flumioxazin and flazasulfuron) directly applied on the soil, were identified in surface soil (about $10 \mu\text{g kg}^{-1}$) but also in deeper samples (up to $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ wet soil).

5. Conclusion

A new rapid method was proposed in this paper to simultaneously determine seven multi-class pesticides in agricultural soils. This method is sensitive (LOD between 1.4 and $4.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ of dry soil for five compounds) and easy to perform (only two steps, complex instrumentation is not required) reducing costs, time and residue loss. The optimum conditions of pressurized liquid extraction and GC/MS detection have been established to improve method selectivity and sensitivity. It is certainly adapted to testing agricultural soil contamination because we investigated a cocktail of pesticides widely sprayed on vines. It has been validated by the study of soil samples from a Gaillac vineyard and could be applied for routine analyses.

Acknowledgments

We thank Syngenta Agro for supplying 2 pesticides for the study. We are grateful to Jean-Luc Carayon and Nathan Téné for their assistance in the determination of extraction parameters and soil analyses, and Adrian Pavely for reviewing the language of this paper.

References

- [1] A.R. Jacobson, S. Dousset, N. Guichard, P. Baveye, F. Andreux, Environ. Pollut. 138 (2005) 250.
- [2] J.V. Cizdziel, V.F. Hodge, Microchem. J. 64 (2000) 85.
- [3] O.S. Fatoki, R.O. Awofolu, J. Chromatogr. A 983 (2003) 225.
- [4] J.P. Bossio, J. Harry, C.A. Kinney, Chemosphere 70 (2008) 858.
- [5] E. Fuentes, M.E. Baez, R. Labra, J. Chromatogr. A 1169 (2007) 40.
- [6] D.V. Moreno, Z.S. Ferrera, J.J.S. Rodriguez, J. Chromatogr. A 1104 (2006) 11.
- [7] C. Padron-Sanz, R. Halko, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodriguez, J. Chromatogr. A 1078 (2005) 13.
- [8] A. Bermudez-Couso, M. Arias-Estevez, J.C. Novoa-Munoz, E. Lopez-Periago, B. Soto-Gonzalez, J. Simal-Gandar, Water Res. 41 (2007) 4515.
- [9] K. Kawata, T. Asada, K. Oikawa, J. Chromatogr. A 1090 (2005) 10.
- [10] M.S. Diaz-Cruz, D. Barcelo, J. Chromatogr. A 1132 (2006) 21.
- [11] W. Wang, B. Meng, X. Lu, Y. Liu, S. Tao, Anal. Chim. Acta 602 (2007) 211.
- [12] J.A. Ferrell, W.K. Vencill, J. AOAC Int. 87 (2004) 56.
- [13] E. Ayano, H. Kanazawa, M. Ando, T. Nishimura, Anal. Chim. Acta 507 (2004) 211.
- [14] A.A. D'Archivio, M. Fanelli, P. Mazzeo, F. Ruggieri, Talanta 71 (2007) 25.
- [15] S. Topuz, G. Ozhan, B. Alpertunga, Food Control 16 (2005) 87.
- [16] E. Concha-Grana, M.I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodriguez, E. Fernandez-Fernandez, Chemosphere 64 (2006) 588.
- [17] A. Hussen, R. Westbom, N. Megersa, L. Mathiasson, E. Bjorklund, J. Chromatogr. A 1152 (2007) 247.
- [18] N.G. Tsiropoulos, E.B. Bakeas, V. Raptis, S.S. Batistatou, Anal. Chim. Acta 573 (2006) 209.
- [19] P. Venkateswarlu, K.R. Mohan, C.R. Kumar, K. Seshiah, Food Chem. 105 (2007) 1760.
- [20] A. Hildebrandt, M. Guillamon, S. Lacorte, R. Tauler, D. Barcelo, Water Res. 42 (2008) 3315.
- [21] R.M. Gonzalez-Rodriguez, R. Rial-Otero, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gandara, J. Chromatogr. A 1196 (2008) 100.
- [22] B. Mayer-Helm, L. Hofbauer, J. Müller, Talanta 74 (2008) 1184.
- [23] K. Banerjee, S.H. Patil, S. Dasgupta, D.P. Oulkar, S.B. Patil, R. Savant, P.G. Adsule, J. Chromatogr. A 1190 (2008) 350.
- [24] F.A. Esteve-Turrillas, A. Pastor, M. de la Guardia, Anal. Chim. Acta 553 (2005) 50.
- [25] C. Soler, J. Manes, Y. Pico, J. Chromatogr. A 1048 (2004) 41.
- [26] E. Conte, R. Milani, G. Morali, F. Abballe, J. Chromatogr. A 765 (1997) 121.
- [27] P. Popp, P. Keil, M. Moder, A. Paschke, U. Thuss, J. Chromatogr. A 774 (1997) 203.
- [28] Agritox Database, AFSSA France, 2005, www.dive.afssa.fr/agritox/php/fiches.php.
- [29] National Institute for Occupational Safety and Health, in: D.V. Sweet (Ed.), Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, vol. 1, NIOSH, Cincinnati, OH, 1993, p. 217.
- [30] G. Galletti, A. Bonetti, G. Dinelli, J. Chromatogr. A 692 (1995) 27.
- [31] S.A. Reinecke, A.J. Reinecke, Ecotox. Environ. Safe. 66 (2007) 92.
- [32] J.L. Martinez Vidal, F.J. Arrebola, M. Mateu-Sanchez, J. Chromatogr. A 959 (2002) 203.

2.2.3 Cas du glyphosate, diquat et du fosétyl-aluminium

Ces 3 molécules (2 herbicides : le glyphosate et le diquat et 1 fongicide : le fosétyl-Al) s'avèrent de part leurs propriétés physico-chimiques difficiles à extraire des matrices sol et eau et à doser ensuite.

2.2.3.1 *Etape d'extraction du sol ou de l'eau*

Non volatiles, à caractère ionique, ces molécules sont souvent utilisées sous forme de sels et ont la capacité de se lier facilement aux colloïdes du sol (ces liaisons entraînant une désactivation de la molécule et son immobilisation). Ceci explique leur large utilisation en agriculture mais rend également leur extraction à partir d'échantillons de sol des plus difficiles (**Ibanez et al., 2005 ; Pateira-Moure et al., 2008**).

Par ailleurs, elles sont polaires, très solubles dans l'eau, et ont un coefficient de partage très défavorable à leur extraction de l'eau.

Concernant les échantillons de sol, au moment de la mise en place de la méthodologie, peu de travaux relataient des techniques d'extraction de ces molécules, rendant notre travail de mise au point de la méthodologie des plus complexes.

Des expérimentations ont été alors menés afin d'essayer de mettre au point une **méthode d'extraction par PLE**.

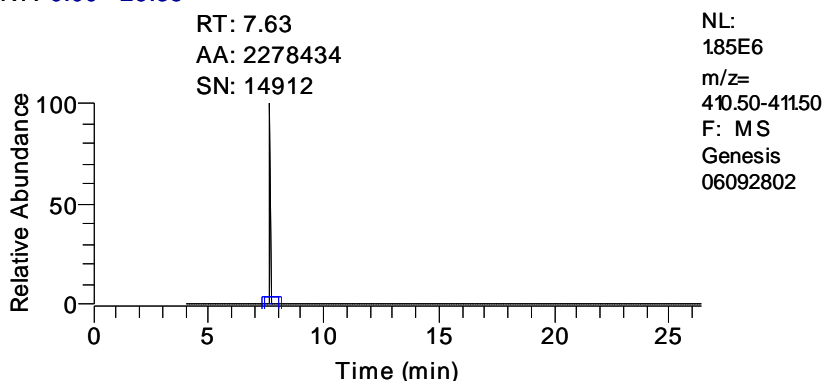
L'extraction du glyphosate du sol par PLE n'est pas décrite dans la littérature. Du fait des propriétés physico-chimiques de la molécule, cette extraction du sol nécessite l'emploi de solutions basiques ou acides (**Börjesson et Torstensson, 2000**) incompatibles avec l'utilisation de l'ASE 100 de Dionex. Toutefois, avec l'accompagnement du **service Recherche et Développement de Dionex**, une méthode d'extraction par PLE a été mise au point à partir d'échantillons de sols artificiellement enrichis en glyphosate.

Cette méthode consistait en une extraction de la molécule d'intérêt par une solution de méthanol à 1% de NH₃. La solution récupérée était alors concentrée avant l'étape de dérivation de la molécule.

Des essais sur différentes températures (80, 100, 120 et 140 °C) nous ont conduits à une température optimale de 100°C. Toutefois, même en jouant sur les différents paramètres de l'extracteur, le rendement d'extraction obtenu reste très insuffisant car inférieur à 1% (Figure 2.20).

Référence glyphosate dérivé 0,01 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ (Appel ion 411)

RT: 0.00 - 26.35



Extraction sol contaminé ; Méthanol, 1% NH_3 , 100°C

Concentration théorique: 1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ → rendement d'extraction très faible (<1 %)

RT: 0.00 - 26.37

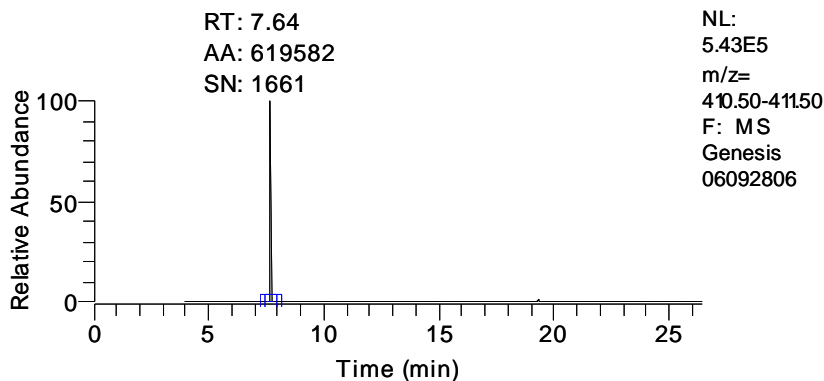


Figure 2.20 : Faible rendement d'extraction du glyphosate du sol par extraction liquide pressurisée à l'ASE 100 de Dionex. Conditions opératoires : 100 °C, méthanol 1% de NH_3 , dérivation par TFAA et TFE, détermination en GC-MS

Quelles que soient les modifications de méthodologies envisagées (augmentation du pourcentage d'ammoniac, ajout d'eau dans le méthanol (méthanol à 2% de NH_3 et 5% d'eau), malaxage de la terre par une solution de NaOH à 1 mol L^{-1} avant le processus d'extraction...), le rendement n'a pas pu être amélioré.

Cette extraction n'est donc pas efficace (son rendement est beaucoup trop faible) et elle ne permet pas d'extraire le glyphosate présent à l'état de traces dans nos sols. Les mêmes conclusions peuvent être tirées pour les molécules plus hydrophiles diquat et fosétyl-Al.

Depuis, de récents travaux proposent désormais l'extraction de ces molécules à partir du sol avec différentes techniques (Tableau 2.5) : extraction par KH_2PO_4 ; agitation, centrifugation et filtration sur papier Whatman pour le glyphosate (**Peruzzo et al., 2008**) ; digestion ou agitation ou MAE puis SPE (**Pateiro-Moure et al., 2008**) pour le diquat. Toutefois, les conditions décrites (acides ou basiques) sont incompatibles avec une extraction par PLE utilisant l'ASE 100 de Dionex.

Par ailleurs, bien qu'elle ait été réalisée avec succès au laboratoire, la méthode d'extraction des sols sur colonne décrite par **Börjesson et Torstensson (2000)** s'est pas avérée trop lourde à mettre en œuvre et donc pas réalisable sur des échantillons à traiter en routine.

Concernant les échantillons d'eau, nous avons rencontré les mêmes difficultés d'extraction et de quantification pour ces 3 molécules. Le coefficient de partage de ces sels est trop défavorable pour une extraction liquide-liquide avec un solvant organique. De plus, la concentration des échantillons d'eau s'est avérée très longue et incompatible avec le nombre d'échantillons à traiter.

Les références les plus récentes, présentées dans le tableau 2.5 font état d'une extraction du glyphosate de l'eau par SPE Oasis (**Ibanez et al., 2006**) ou d'une extraction par filtration sur membrane d'acétate de cellulose de $0,45 \mu\text{m}$ (**Peruzzo et al., 2008**). Pour le diquat, il y a peu de données dans la littérature concernant son analyse dans l'eau. Il est toutefois extrait par SPE du plasma et de l'urine (**Menck de Almeida et Yonamine, 2007**) et extrait par Extraction au Fluide Supercritique SFE de l'huile d'olive (**Zougagh et al., 2008**). Le fosétyl-Al n'a quant à lui jamais été recherché dans des matrices liquides.

2.2.3.2 Etape d'analyse

S'agissant de la **méthode de dosage**, nos travaux ont permis de tester avec efficacité des protocoles de quantification du glyphosate et du diquat.

Pour le **glyphosate**, il s'agit d'un dosage en GC-MS après dérivation de la molécule. En effet, afin de pouvoir obtenir un produit plus volatile et apolaire et donc analysable en GC-MS, une étape de dérivation du glyphosate est nécessaire (**Deyrup et al., 1985 ; Börjesson et Torstensson, 2000**). Il en est de même pour son métabolite : l'acide aminométhylphosphonique AMPA. Cette dérivation est une estérification et acylation de la molécule par un mélange d'anhydride trifluoroacétique (TFAA) et de trifluoroéthanol (TFE).

La réaction de dérivation se fait selon le schéma suivant (Figure 2.21).

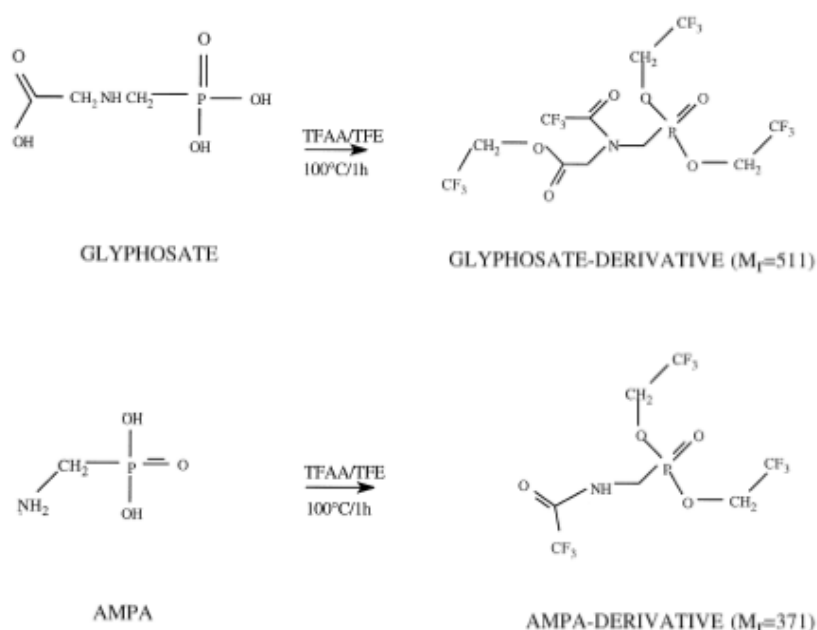


Figure 2.21 : Réaction de dérivation du glyphosate et de l'AMPA avec du trifluoroéthanol (TFE) et de l'anhydride trifluoroacétique (TFAA) d'après Börjesson et Torstensson (2000)

Nos premières expérimentations ont permis de mettre en place le protocole décrit par **Börjesson et Torstensson (2000)** sur des échantillons de glyphosate pur (en standard). Pour un échantillon de 1 mg de glyphosate, 400 μL de TFE puis 800 μL de TFAA sont ajoutés à la seringue. L'échantillon est alors bien homogénéisé au vortex. Il est ensuite placé à 100°C pendant 1h. Puis, une fois revenu à température ambiante, l'échantillon est concentré sous courant d'azote et repris dans 1 mL d'acétone ou dichlorométhane en vue de son analyse en GC-MS.

Lorsque les teneurs en glyphosate sont inférieures à 0,1 mg, les quantités de TFE et TFAA ajoutées pour la réaction de dérivation sont divisées par 2 (200 μL de TFE et

400 μL de TFAA) et l'échantillon est repris dans 500 μL d'acétone ou de dichlorométhane pour une analyse en GC-MS.

L'ion majoritaire de la molécule de glyphosate dérivée est l'ion m/z 410,9 (perte de TFE). Pour l'AMPA, les ions suivis sont les m/z 246 et 302 (perte de CF_3).

Les limites de détection instrumentales de ces molécules dérivées en GC-MS avoisinent $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Il faut toutefois noter que le processus de dérivation est un peu perturbé (baisse du rendement de la dérivation) lorsqu'il se déroule dans la matrice biologique « sol ».

Les contraintes liées à ce protocole d'extraction du glyphosate du sol ne nous ont pas permis de suivre le transfert de cette molécule au cours de l'étude.

Le glyphosate non dérivé a également fait l'objet d'une étude en spectrométrie de masse en LC-MS (suivi de l'ion m/z 168,1 (M-H^-) en ESI- dans le méthanol, MS_2 avec une énergie de collision de 43 % et une activation de 15 ms ($Q = 0,25$). Le spectre du glyphosate obtenu en infusion en LC-MS est présenté sur la figure 2.22.

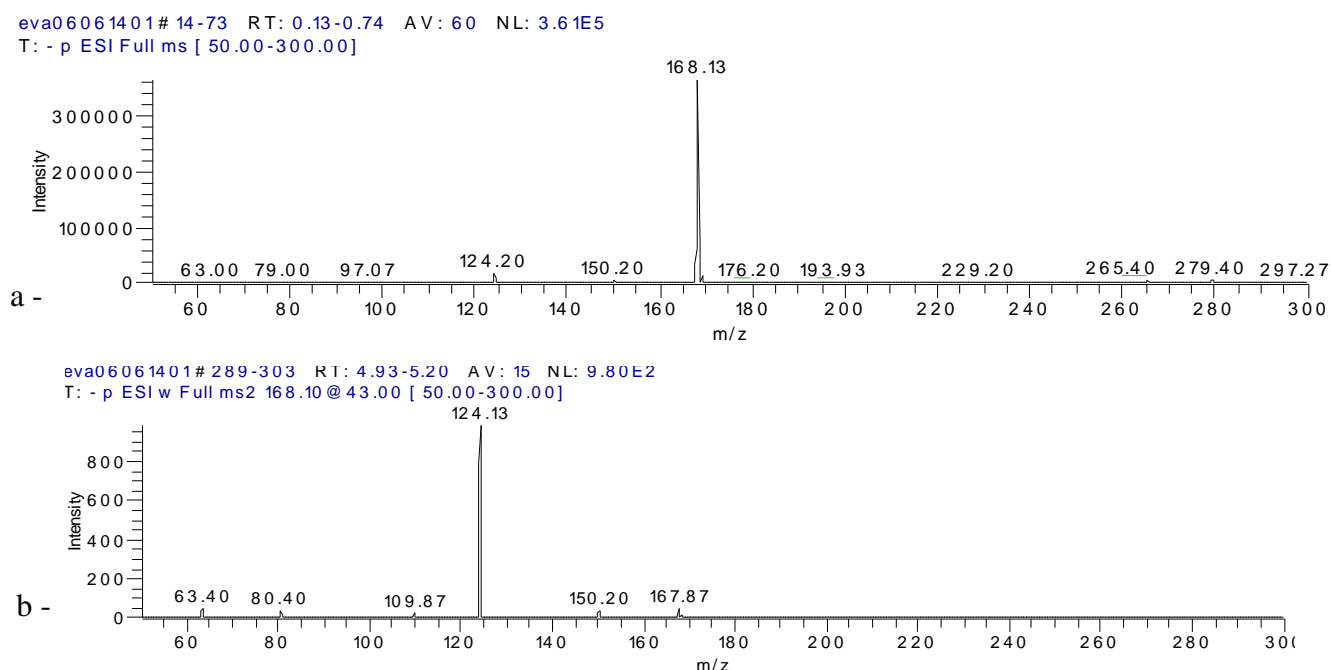
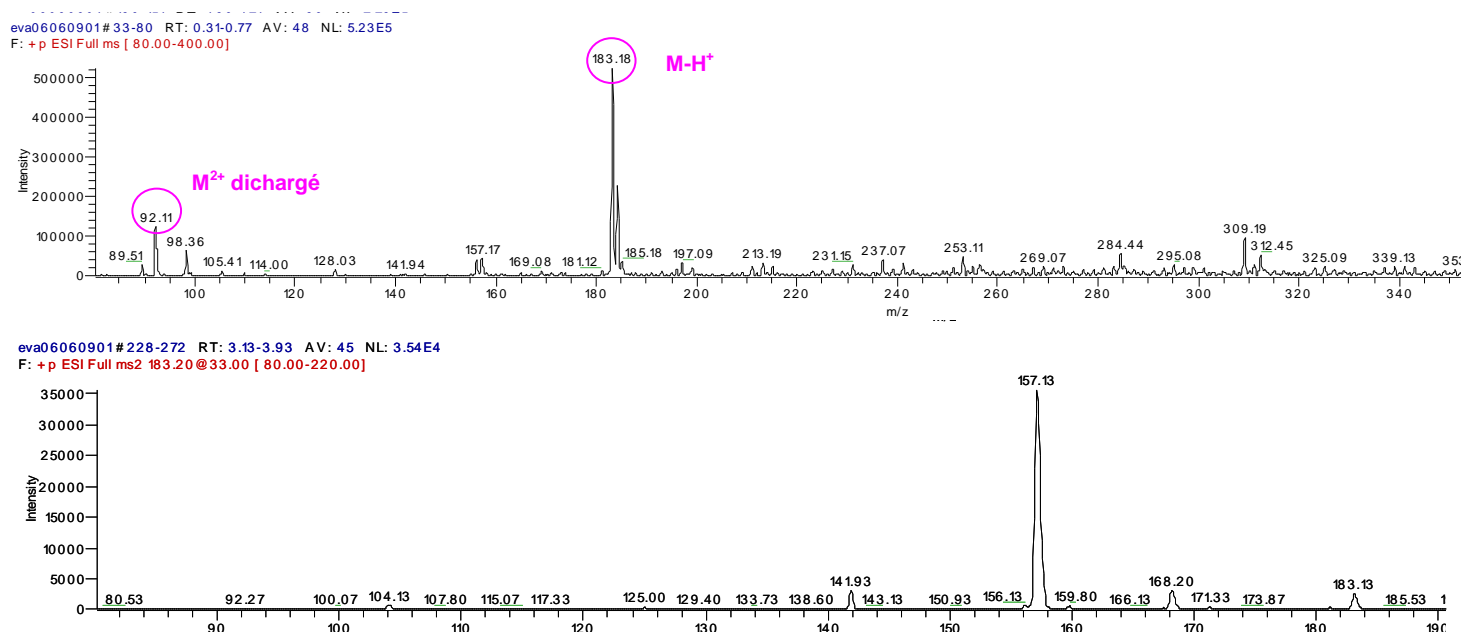


Figure 2.22 : a - Spectre du glyphosate en infusion dans le méthanol en LC-MS (ESI- ; $0,01 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$) ; b - Spectre MS_2 de l'ion fils après fragmentation (énergie de collision de 43 % et activation de 15 ms ($Q = 0,25$))

Concernant le **diquat**, des tests de dosage ont été réalisés en LC-MS. La détection se fait en masse par le suivi de l'ion m/z 183,2 ($M-H$)⁺ en ESI⁺ dans le méthanol, MS₂ avec une énergie de collision de 33 % et une activation de 15 ms ($Q = 0,25$) (Figure 2.23).



**Figure 2.23 : a - Spectre du diquat en infusion dans le méthanol en LC-MS (ESI⁺ ; 0,01 µg µL⁻¹) ;
b - Spectre MS₂ de l'ion fils après fragmentation (énergie de collision de 33 % et activation de
15 ms ($Q = 0,25$))**

Toutefois, la méthode en infusion ne permet pas le dosage puisqu'il n'y a pas de séparation. Ce sel de brome nécessiterait une technique chromatographique trop lourde qui n'a de ce fait pas été optimisée.

Enfin, le **fosétyl-aluminium** s'avère être très difficile à extraire des sols mais également à doser. Hormis les travaux de **Hernandez *et al.* (2003)**, très peu d'informations sont trouvées dans la littérature concernant le dosage de ce sel d'aluminium qui se dissocie facilement.

En conclusion, pour ces 3 molécules, les protocoles d'extraction et d'analyse nécessitent un important travail de mise au point méthodologique incompatible avec le nombre d'analyses à effectuer pour l'étude.

Ainsi, en accord avec les membres du comité de thèse, **ces pesticides ne sont pas recherchés dans la suite de nos expérimentations.**

2.2.4 Validation de la méthode d'analyse

La **méthode de quantification** choisie est l'étalonnage externe. Les courbes d'étalonnage ont été construites pour chaque molécule (**Schreck et al., 2008 a**). Elles présentent l'aire du pic en fonction de la concentration injectée, et sont obtenues par régression linéaire. Dans chaque cas, le coefficient de détermination est supérieur à 0,97 (sauf pour le folpel $R^2 = 0,94$). Ensuite, régulièrement lors des analyses, des standards des pesticides sont injectés afin de vérifier la reproductibilité de nos mesures et contrôler les spécifications du spectromètre de masse.

La méthode est validée conformément à la réglementation de l'AFNOR XP T 90-210 (**AFNOR, décembre 1999**).

La **répétabilité** de l'ensemble de la procédure analytique a été testée. Le processus d'extraction et de détermination analytique a été répété 3 fois sur un même échantillon. La répétabilité est exprimée par l'erreur standard commise sur le processus (écart-type / \sqrt{n}). Elle a été évaluée pour les échantillons de sols dopés et pour les échantillons de sols de la parcelle. Sa valeur étant $< 12 \%$, nous considérons notre processus comme répétable.

La **reproductibilité** de l'analyse est évaluée en injectant 3 fois la même solution en GC-MS. Plusieurs solutions de pesticides standard en gamme ont été ainsi injectées. La reproductibilité est exprimée par l'erreur standard (écart-type / \sqrt{n}). Sa valeur étant $< 12 \%$, nous considérons nos analyses comme reproductibles.

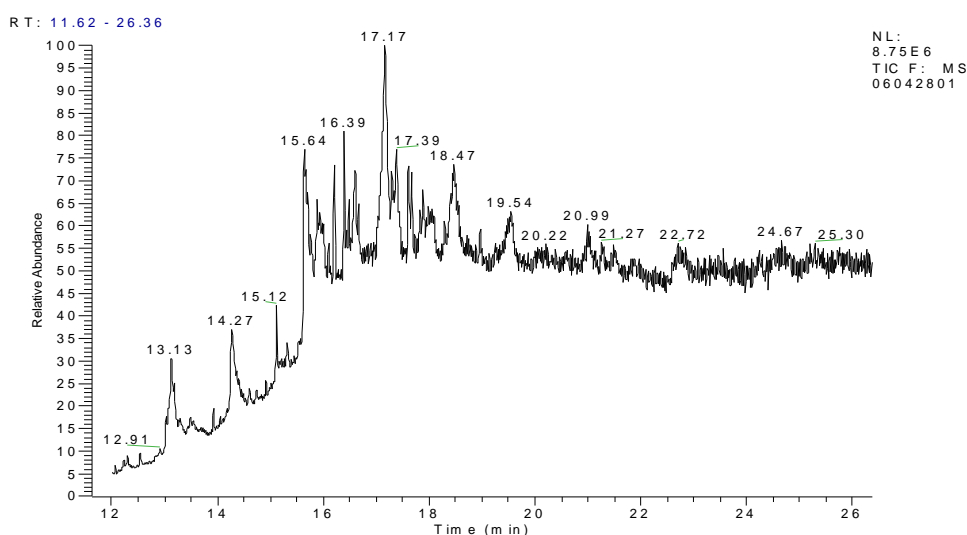
L'évaluation de l'**effet de matrice** est réalisée dans les 2 étapes de la détermination des traces de pesticides dans nos échantillons de sol : l'extraction par PLE et la quantification par GC-MS.

Ainsi, en PLE, l'effet de matrice est déterminé en utilisant de la célite (ou de la magnésie calcinée) comme corps inerte lors d'une extraction. Ce corps est contaminé en gamme comme le sont les échantillons de sols fortifiés. On évalue

ainsi la différence de rendement d'extraction. Des différences importantes avec des rendements bien supérieurs pour la célite pourraient témoigner d'un effet de matrice lors de l'extraction. Le sol pourrait de part sa structure et sa texture retenir fortement les molécules cibles, rendant moins efficace notre processus d'extraction. Par ailleurs, la célite étant un corps inerte, le fait d'avoir des rendements du même ordre que dans le sol permettrait de penser que l'effet de matrice est négligeable.

Les rendements d'extraction avec la célite n'étant pas significativement différents de ceux obtenus avec le sol contaminé (**Schreck et al., 2008 a**, analyse statistique avec le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis, $P > 0,05$), nous faisons donc l'hypothèse d'une absence d'effet de matrice dans cette étape d'extraction par PLE.

Lors de l'étape d'identification et de dosage des molécules par GC-MS, l'effet de matrice est évalué en réalisant des gammes de standard dans un extrait de sol. Il s'agit en effet de terre neutre (non polluée en molécules cibles) ayant été extraite selon les conditions opératoires définies pour l'ASE et concentrée jusqu'à obtenir un extrait comparable à celui obtenu pour nos échantillons de terre de la parcelle, mais ne contenant pas de traces de pesticides. Cet extrait est alors utilisé comme solvant de gammes de pesticides standards. Il permet ainsi de mettre en évidence l'effet de matrice dans l'étape analytique, en augmentant le bruit de fond sur les chromatogrammes (Figure 2.24).



Cet effet matrice explique les valeurs différentes obtenues pour la LOD (et LOQ) instrumentale et la LOD (et LOQ) méthodologique, plus haute (**Schreck et al., 2008 a**).

Ainsi, c'est l'étape de dosage qui contribue le plus à un effet matrice. Cet effet matrice reste toutefois connu, il augmente légèrement les valeurs des LOD et LOQ, mais peut être considéré comme plutôt faible.

En résumé, cette méthode nous permet une extraction puis un dosage rapide et multirésidus (correspondant au compromis souhaité pour notre cocktail de 7 molécules) mais elle a toutefois des limites. En effet, les LOD ne sont pas optimales pour le folpel et la flumioxazine.

La figure 2.25 propose un résumé de l'ensemble des étapes d'extraction et de dosage des molécules.

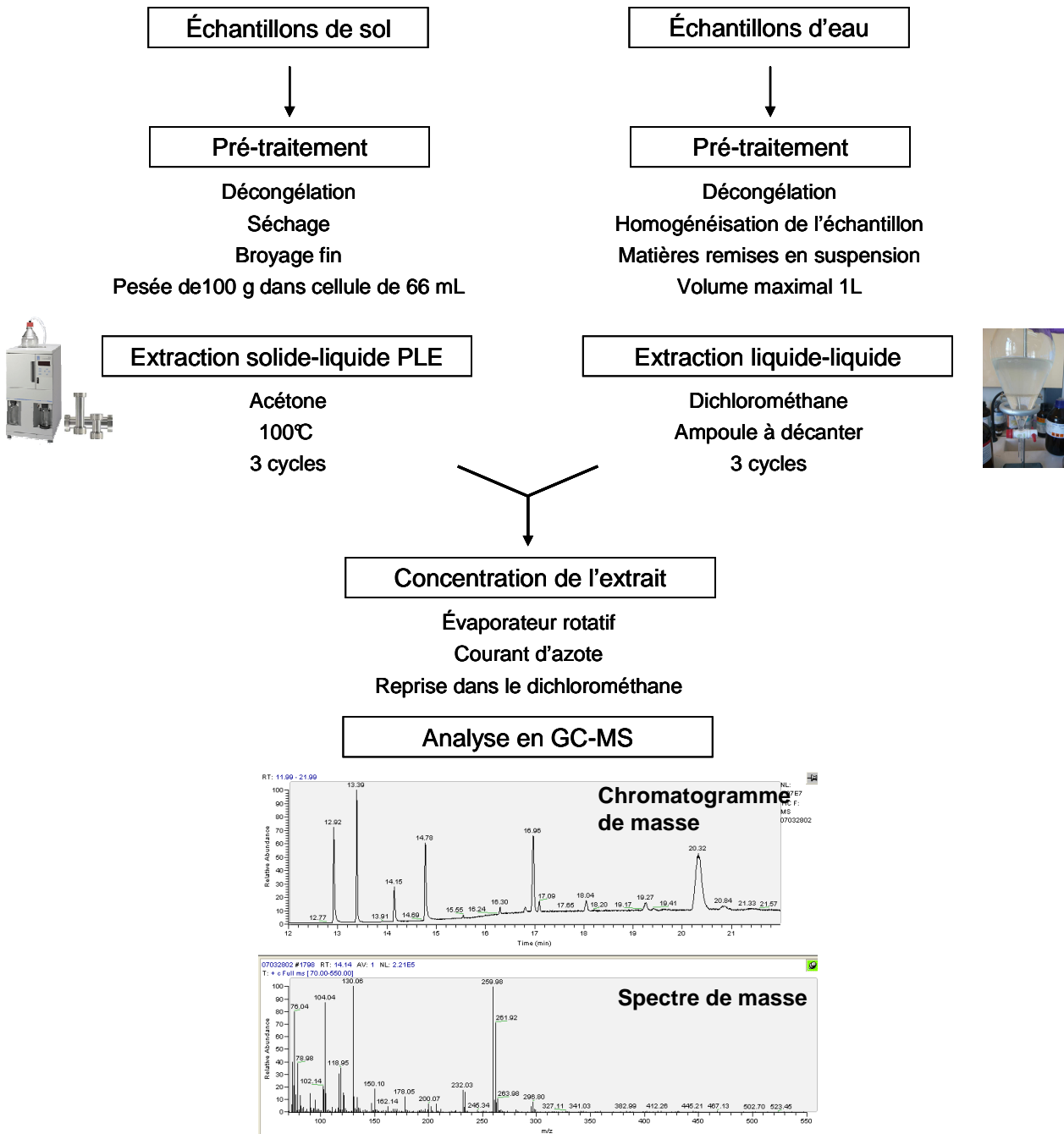


Figure 2.25 : De l'extraction à la détermination et au dosage analytique

2.2.4.1 Traitement statistique des données et modélisation

Les données des analyses des teneurs en pesticides retrouvées dans les sols et les eaux de drainage ont fait l'objet d'un **traitement statistique** afin de confirmer les tendances dégagées par l'analyse des résultats.

Ainsi, suite à une analyse de variance (ANOVA) à 2 facteurs réalisée sur le logiciel SPSS (version standard 11.0, SPSS Inc.), le test de Tukey a été utilisé pour comparer les différences de concentrations entre les modalités et les témoins d'une part et les dates des prélèvements d'autre part. L'homogénéité des variances est vérifiée par le test de Levene. Une différence significative est testée au seuil de 5% soit un niveau de probabilité $P < 0,05$. Toutes les valeurs présentées dans les résultats seront sous la forme d'une moyenne des réplicats \pm erreur standard (SD).

Afin de mettre en relation la pluviométrie et les phénomènes de drainage, une **modélisation** des lames d'eau drainées pour chaque modalité a été envisagée en collaboration avec **Julien Tournebize** (CR, Unité des Hydrosystèmes et Bioprocédés, Cemagref, Antony) travaillant sur ces systèmes de modélisation des transferts par drainage (**Tournebize, 2001**).

Le **modèle SIDRA** (simulation de drainage) du Cemagref (**Lesaffre et Zimmer, 1988 ; Lesaffre, 1989 ; Tournebize et al., 2004**) est basé sur une approche bilan hydrique et une résolution de l'équation de Boussinesq des écoulements d'eau dans un sol à nappe superficielle. Il convertit une recharge (P-ETP) en débit en tenant compte d'une forme de nappe superficielle constante. Le débit est la somme d'une recharge et d'un tarissement de nappe (vidange de la nappe superficielle) selon l'équation :

$$Q = A \cdot J + (1 - A) \cdot R$$

avec : A le coefficient de forme de nappe,

R la recharge,

$$J = \frac{K \cdot H^2}{L^2} \text{ (terme de Houghoudt)}$$

H la hauteur de nappe à l'interdrain,

K la conductivité hydraulique à saturation,

L le demi-écartement des drains.

Il faut donc adapter à notre système le modèle **SIDRA** plutôt conçu pour travailler en saison de drainage intense. Différentes hypothèses de départ sont fixées. Les entrées du modèle, outre les paramètres physiques, nécessitent aussi une porosité de drainage μ , en plus de K et L. Pour un sol de boubènes, on va fixer K et μ et en déduire pour chaque modalité la part contributive de la surface dans le débit. $K_{\text{saturation}} = 0,8 \text{ m j}^{-1}$ et $\mu=0,01$.

SIDRA est modifié pour le terme de recharge :

- 1) le cumul de pluie précédent un drainage doit être supérieur à X mm,
- 2) l'intensité de pluie horaire pour générer un drainage doit être supérieur à Y mm h^{-1} ,
- 3) la recharge est égale à la pluie horaire moins la somme de l'évapotranspiration (ETP), rapportée à la surface contributive Z.

3 Résultats et discussion

Dans cette partie, les résultats concernant les modalités sur sol de boubènes sont présentés. La modalité 4, enherbée sur sol de graves, n'a pas été suivie dans le cadre de l'étude du transfert de produits phytosanitaires du sol vers les eaux de drainage.

3.1 Comportement hydrologique du sol en lien avec son entretien

Les sols de boubènes créent un plancher « quasi-imperméable » (**Arlot, 1993**) laissant apparaître une nappe souterraine perchée.

Il apparaît alors que les transferts d'eau peuvent s'effectuer verticalement jusqu'à la nappe puis, quasi-horizontalement, dans la nappe vers le drain. Cette situation est celle de plus de 80% des sols drainés en France (**Arlot, 1993**).

Le fonctionnement hydrologique du sol a été étudié sur la période janvier-juillet 2008 à partir des données enregistrées par une centrale d'acquisition.

Nous considérons initialement les effets du ruissellement comme négligeables. En effet, ce phénomène est considéré comme nul sur la parcelle du fait de la faible pente sur sol de bouliènes et de la présence de bandes enherbées de 10 m de large.

Le drainage se caractérise par son fonctionnement intermittent. Chaque épisode pluvieux entraîne alors une réponse du réseau des drains appelée **épisode de drainage**.

La figure 2.26 présente les volumes d'eau écoulés en relation avec la pluviométrie du 1^{er} janvier au 15 juillet 2008.

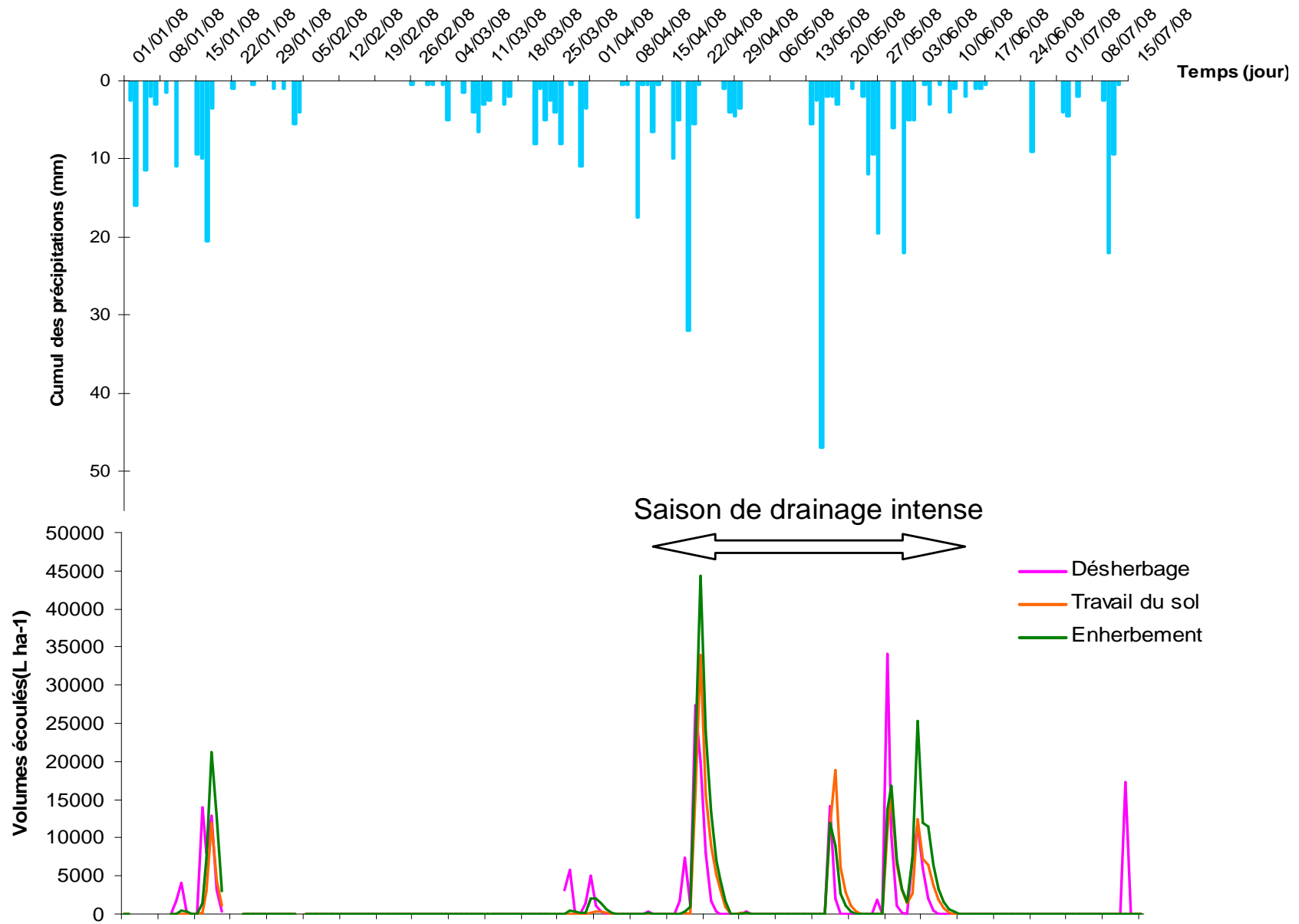


Figure 2.26 : Chronique d'écoulement de l'eau au niveau des drains de chaque modalité en relation avec les épisodes pluvieux.

Selon l'épisode pluvieux, l'épisode de drainage peut être simple (débit de pointe suivi d'une phase de tarissement) ou complexe (plusieurs débits de pointe se succédant, séparés par des phases de tarissement incomplètes).

L'objectif de nos travaux a donc été de réaliser une **individualisation des épisodes de drainage** par des critères d'indépendances des crues puis de **calculer les coefficients de restitution** du réseau de drainage dans le but de **décrire le régime hydrique du sol**.

Les volumes écoulés à la sortie du réseau de drainage constituent des valeurs fortement variables dans le temps, à l'échelle de la seconde, de l'heure mais aussi de la journée. Ainsi, selon **Lesaffre (1989)**, les critères d'indépendances permettent de déterminer si les pics multiples d'écoulement correspondent à un même épisode de drainage ou s'il s'agit de 2 épisodes distincts.

Le minimum relatif du pic de la première crue doit être inférieur à 10 % du débit de pointe de la seconde pour pouvoir déterminer ces 2 pics comme appartenant à 2 épisodes de drainage différents (Figure 2.27). Par ailleurs, le débit de pointe de la crue 2 doit être supérieur à 2 fois le minimum relatif (que nous prenons égal à 0).

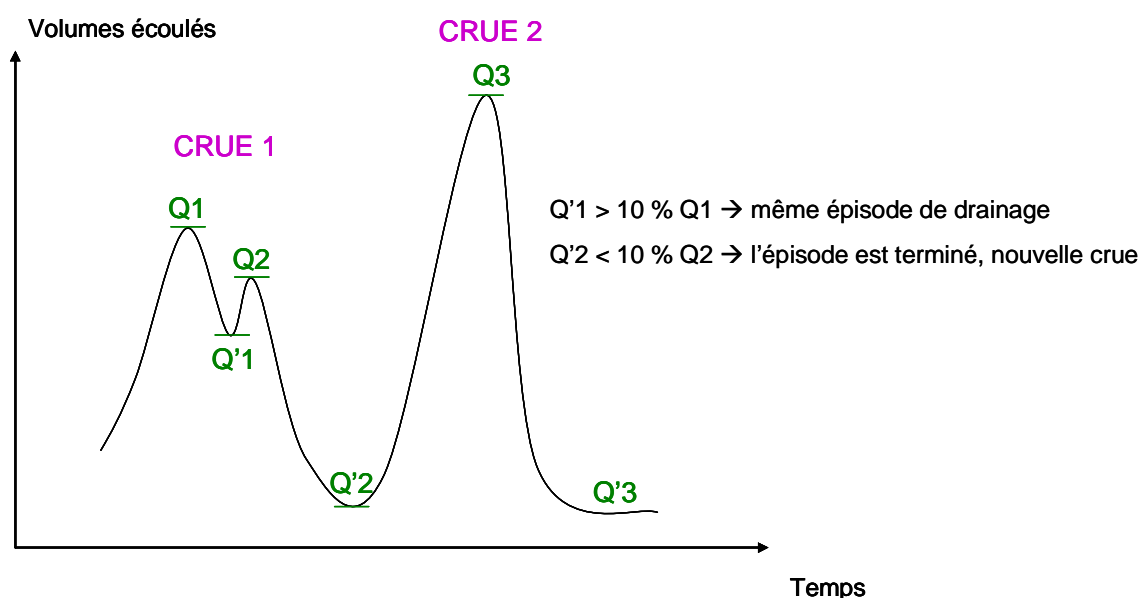


Figure 2.27 : Individualisation des épisodes de drainage par la méthode des critères d'indépendance des crues (Lesaffre, 1989 ; Arlot, 1993)

Cette technique nous a donc permis de déterminer, pour chacune des 3 modalités de l'étude, les épisodes de drainage et leurs coefficients de restitution.

Ainsi, 20 épisodes de drainage ont été isolés de janvier à juillet 2008 sur la modalité désherbée chimiquement et 8 épisodes ont été identifiés sur chacune des 2 autres modalités.

Le tableau 2.12 ci-après présente ces épisodes de drainage (début et fin) pour chaque modalité. L'individualisation des épisodes de drainage nous permet également de déterminer les **coefficients de restitution** (tableau 2.12). Il s'agit du rapport entre les lames d'eau évacuées par le réseau et celles apportées par les pluies.

Tableau 2.12 : Episodes de drainage et coefficients de restitution pour chaque modalité pour l'année 2008. La somme des volumes écoulés en L ha⁻¹ apparaît dans un encadré pour chaque modalité

Modalité	Episode	Début drainage	Fin drainage	Volumes écoulés (mm)	Pluie "drainante" (mm)	Début pluie "drainante" (mm)	Fin pluie "drainante" (mm)	Coefficient de restitution (%)
Désherbage	1	11/01/2008 21:31	13/01/2008 23:31	0,59	11,0	11/01/2008 17:00	12/01/2008 05:00	5,36
	2	16/01/2008 4:31	17/01/2008 17:31	1,84	19,5	16/01/2008 00:00	17/01/2008 04:00	9,44
	3	17/01/2008 18:31	20/01/2008 08:44	2,00	24,0	17/01/2008 15:00	19/01/2008 00:00	8,34
	4	26/03/2008 17:49	29/03/2008 16:48	0,93	11,0	26/03/2008 03:00	28/03/2008 18:00	8,45
	5	30/03/2008 20:49	31/03/2008 17:49	0,56	11,5	30/03/2008 16:00	31/03/2008 09:00	4,87
	6	31/03/2008 18:48	03/04/2008 07:46	0,21	3,0	31/03/2008 15:00	31/03/2008 18:00	7,00
	7	18/04/2008 17:31	20/04/2008 14:31	0,83	5,0	18/04/2008 16:00	18/04/2008 17:00	16,60
	8	20/04/2008 15:31	21/04/2008 17:31	4,44	33,0	20/04/2008 12:00	21/04/2008 12:00	13,45
	9	21/04/2008 18:31	25/04/2008 12:07	1,30	5,0	21/04/2008 16:00	22/04/2008 10:00	26,00
	10	30/04/2008 8:18	01/05/2008 01:17	0,04	8,0	30/04/2008 03:00	30/04/2008 12:00	0,50
	11	16/05/2008 16:39	20/05/2008 13:30	1,63	19,5	14/05/2008 19:00	19/05/2008 21:00	8,36
	12	25/05/2008 19:30	26/05/2008 10:30	0,20	12,0	25/05/2008 14:00	25/05/2008 18:00	1,63
	13	27/05/2008 5:40	27/05/2008 23:40	3,41	23,5	27/05/2008 03:00	27/05/2008 15:00	14,51
	14	28/05/2008 0:39	31/05/2008 09:39	1,15	10,0	27/05/2008 19:00	31/05/2008 03:00	11,50
	15	01/06/2008 21:53	03/06/2008 10:53	2,01	26,0	01/06/2008 20:00	02/06/2008 22:00	7,73
	16	03/06/2008 11:53	03/06/2008 17:53	0,19	3,0	03/06/2008 05:00	03/06/2008 09:00	6,33
	17	03/06/2008 18:53	04/06/2008 14:53	0,47	3,0	03/06/2008 17:00	03/06/2008 17:00	15,67
	18	04/06/2008 15:53	06/06/2008 09:42	0,11	1,0	06/06/2008 05:00	06/06/2008 07:00	11,00
	19	12/07/2008 1:14	12/07/2008 08:14	1,33	22,0	11/07/2008 22:00	12/07/2008 02:00	6,05
	20	12/07/2008 14:14	12/07/2008 22:14	0,40	7,5	12/07/2008 11:00	12/07/2008 15:00	5,36
Travail du sol	1	16/01/2008 13:31	20/01/2008 08:44	2,07	43,5	16/01/2008 00:00	19/01/2008 00:00	4,76
	2	31/03/2008 02:49	04/04/2008 07:30	0,11	14,5	30/03/2008 16:00	31/03/2008 18:00	0,76
	3	18/04/2008 20:31	19/04/2008 00:31	0,01	5	18/04/2008 16:00	18/04/2008 17:00	0,22
	4	20/04/2008 17:31	26/04/2008 12:07	8,38	38	20/04/2008 12:00	22/04/2008 10:00	22,05
	5	30/04/2008 08:18	30/04/2008 15:18	0,04	8	28/04/2008 01:00	30/04/2008 09:00	0,45
	6	16/05/2008 17:39	21/05/2008 14:30	4,06	11	16/05/2008 16:00	19/05/2008 23:00	36,91
	7	27/05/2008 13:40	01/06/2008 21:53	3,81	47	25/05/2008 14:00	31/05/2008 03:00	8,11
Enherbement	1	12/01/2008 01:31	14/01/2008 14:31	0,08	11	11/01/08 à 17:31	12/01/08 à 05:31	0,69
	2	16/01/2008 09:31	20/01/2008 08:44	4,55	43,5	16/01/2008 00:00	19/01/2008 00:00	10,46
	3	27/03/2008 07:48	30/03/2008 17:49	0,10	13,5	26/03/2008 03:00	30/03/2008 17:00	0,74
	4	30/03/2008 23:49	04/04/2008 07:30	0,63	14,5	30/03/2008 16:00	31/03/2008 17:49	4,34
	5	18/04/2008 05:31	26/04/2008 20:07	11,78	53	17/04/2008 09:25	22/04/2008 10:00	22,23
	6	16/05/2008 17:39	20/05/2008 22:30	2,50	11	16/05/2008 16:00	19/05/2008 21:00	22,73
	7	27/05/2008 13:40	01/06/2008 20:53	4,29	24,5	27/05/2008 11:00	31/05/2008 03:00	17,51
	8	01/06/2008 21:53	09/06/2008 21:42	6,80	36	01/06/2008 20:00	08/06/2008 08:00	18,89

Ces valeurs permettent de décrire le fonctionnement du réseau.

Les coefficients de restitution sont faibles et parfois très variables d'une date à l'autre pour une même modalité. Nous n'avons donc pas un fonctionnement classique de parcelle drainée avec une nappe perchée. Des coefficients de restitution faibles évoquent plutôt un fonctionnement de type préférentiel, avec un écoulement hydrique dans une réserve utile de bouldiers de l'ordre de 120-160mm.

En effet, une parcelle agricole drainée a un coefficient de restitution moyen de 30-50% avec des pointes à 80% (Lesaffre, 1989 ; Arlot, 1993). Le coefficient de restitution moyen de 10-15% sur notre parcelle, même en période hivernale signifie que l'excédent hydrique n'est pas exporté par les drains. La contribution de la pluie à l'écoulement est donc vraisemblablement très réduite par rapport à un schéma classique. L'hétérogénéité de composition et de morphologie des sols de bouldiers (**Guiesse et al., 1989 ; Michel et al., 2003**) est à l'origine d'un phénomène d'infiltrations profondes non limitantes expliquant cette faible part contributive au drainage.

La modélisation des écoulements nous a permis de déterminer la part contributive de la surface aux écoulements. Grâce aux simulations effectuées à l'aide de **SIDRA** (modèle de simulation du drainage, **Lesaffre et Zimmer, 1988 ; Lesaffre, 1989 ; Tournebize et al., 2004**) et réalisées par **Julien Tournebize**, une nouvelle dimension a été apportée à ce travail.

Nos conditions d'étude ne permettent pas l'utilisation d'un test très performant mais l'algorithme de **SIDRA** permet de déterminer automatiquement les jours de drainage sur l'année (**Tournebize**, communication personnelle). L'intensité de drainage théorique est du même ordre de grandeur que ce qui est mesuré. Une simulation avec **SIDRA** a donc été réalisée au pas de temps horaire utilisant les données d'évapotranspiration provenant d'un jeu de données du Cemagref pour la période janvier – juin 2008 (Figure 2.28).

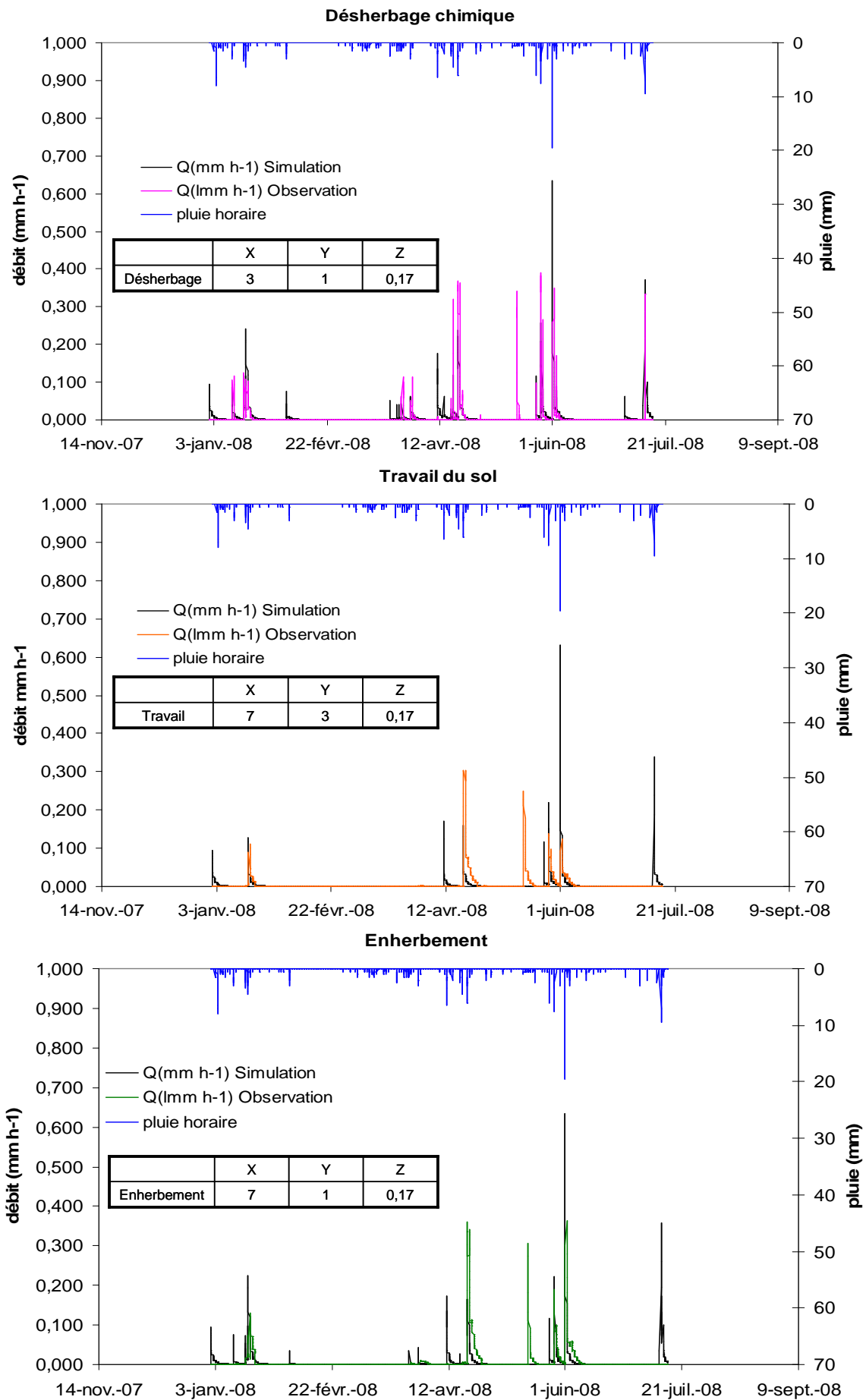


Figure 2.28 : Simulation des débits pour chaque modalité, corrélation avec les débits observés

Ainsi d'après le modèle **SIDRA**, **seulement 17 % (soit 1/6) de la surface contribuerait au drainage**. Sur ce sol de boubènes, une faible part des flux d'eau est de ce fait récupérée en sortie des drains. Les quantités de molécules retrouvées dans les eaux ne correspondraient donc qu'à une partie contributive de 17 % des quantités totales exportés vers les eaux d'infiltration.

Par ailleurs, le tracé de la courbe des double-cumuls (lames d'eaux drainées en fonction des pluies cumulées) permet de définir de grandes tendances assimilables à des saisons de drainage (**Lesaffre, 1989 ; Arlot, 1993**) (Figure 2.29).

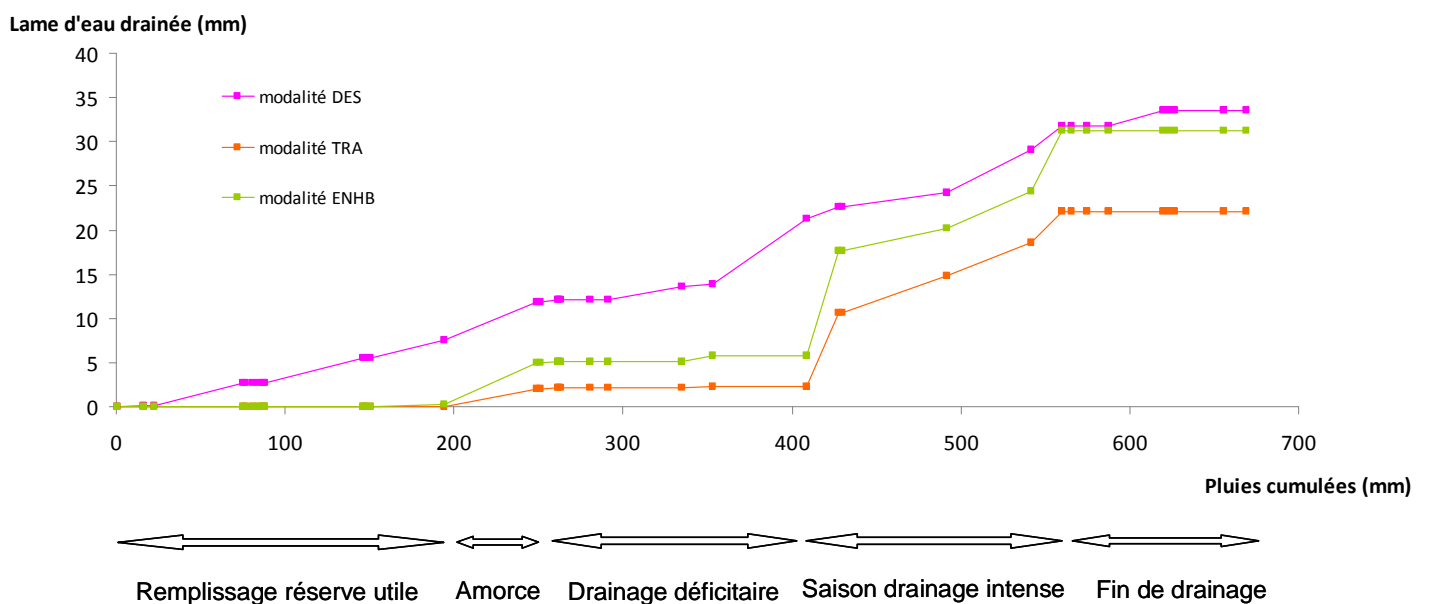


Figure 2.29 : Courbes des double-cumuls (lames d'eaux drainées en fonction des pluies cumulées) pour les modalités comparées de l'étude (dés herbée : DES ; travaillée : TRA et en herbée : ENB) permettant la détermination des saisons de drainage

L'étude de ces courbes construites par décade nous permet de déterminer des saisons de drainage.

A l'automne et au début de l'hiver, les pluies permettent le **remplissage de la réserve utile du sol** (d'environ 150 mm). La saison d'**amorce du drainage** se caractérise par les premiers écoulements. Elle correspond à la saturation progressive du sol (**Arlot, 1993**). Dans notre cas, cette phase d'amorce est décalée dans le temps : l'année 2008 est assez atypique en terme de climat par rapport aux autres années. L'absence de pluies au mois de février (Figure 2.30) a contribué à

l'existence d'un palier sur la courbe des double-cumuls. Le drainage devient alors déficitaire à la fin de l'hiver 2007-2008.

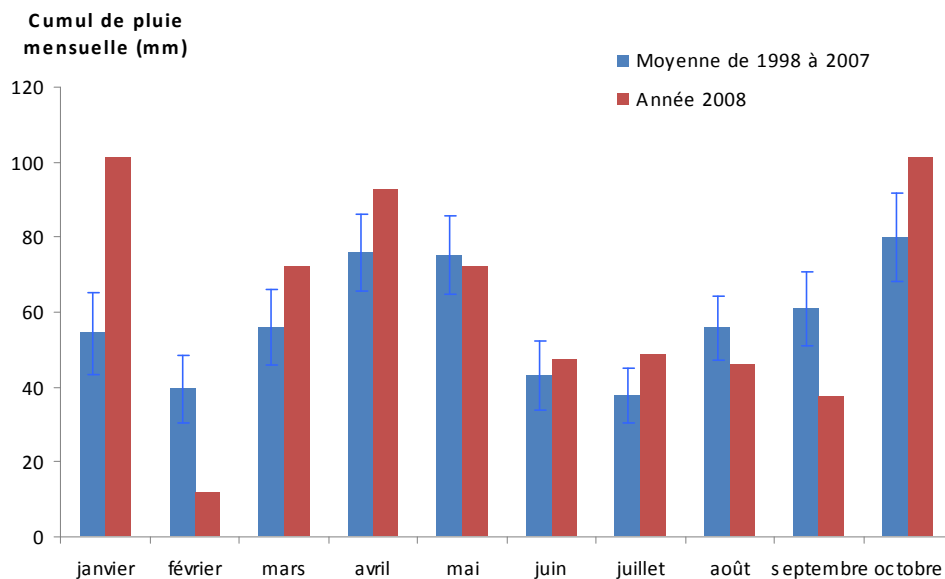


Figure 2.30 : Comparaison de la pluviométrie de l'année 2008 avec la moyenne de la pluviométrie des dix dernières années

Dès la reprise des premiers événements pluvieux, nous entrons dans la **saison de drainage intense** définie par **Arlot (1993)**. Le sol est saturé de manière stable en avril-mai (ce qui est assez tard dans la saison en comparaison avec une année classique). Enfin, la **fin de saison de drainage** est marquée par une rupture de tendance conduisant à un plateau. L'évapotranspiration devient alors durablement supérieure aux précipitations.

Une **comparaison de ces courbes en fonction de la modalité d'entretien** du sol nous permettra de mettre en évidence **les différences du fonctionnement hydraulique du sol**.

La courbe de la Figure 2.29 et le Tableau 2.12 permettent une comparaison des lames d'eau drainées. La modalité travaillée et la modalité enherbée réagissent de façon assez similaire aux épisodes pluvieux. En effet, l'écoulement aux drains se fait entre 2 h et 1 j après un épisode pluvieux pour la modalité enherbée et entre 2 h et 2 j pour la modalité travaillée (Tableau 2.12). Toutefois la modalité travaillée restitue

moins d'eau que les 2 autres (notamment en saison de drainage intense d'après la courbe des double-cumuls).

La modalité dés herbée chimiquement restitue généralement rapidement l'eau, en seulement quelques heures après une pluie. Elle a un comportement hydraulique différent et réagit très vite à un excédent pluviométrique (rapporté à l'évapotranspiration) comme en témoigne les écoulements de septembre et octobre 2007 non enregistrés par la centrale. Cette modalité restitue beaucoup d'eau dès l'automne et les saisons de drainage sont peu marquées.

Cette réaction rapide à la pluie de la modalité dés herbée peut être le témoignage de l'existence de chemins préférentiels d'écoulement de l'eau (macropores, fentes de dessiccation dus au sol nu en période printanière et estivale ; Figure 2.31). L'eau recueillie dans cette modalité est également très chargée en matières en suspension ; ce qui pourrait confirmer l'hypothèse de l'existence d'écoulements préférentiels de l'eau de pluie qui s'infiltré très vite.



Figure 2.31 : Fente de dessiccation sur la modalité dés herbée au début de l'automne

Bien que quelques épisodes drainants de cette campagne (4 épisodes d'octobre à décembre 2007) n'aient pas pu être enregistrés par la centrale, nous remarquons également d'après la somme des volumes écoulés depuis le mois de janvier 2008 (Tableau 2.12) que la modalité en herbée semble être celle qui restitue le plus important volume d'eau cumulé. En effet, la prise en compte des volumes écoulés estimés à l'automne 2007 confirme que cette modalité restitue sur une campagne complète autant d'eau que la modalité dés herbée (courbe des double-cumuls, Figure 2.29). Ces constatations rejoignent les conclusions de **Louchart (1999)** relatives au rôle de l'enherbement sur l'amélioration de la structure des sols et l'augmentation de

la capacité d'infiltration de l'eau sous couvert végétal. La zone racinaire, bien structurée et poreuse, favoriserait l'infiltrabilité de l'eau (Celette, 2007).

Par ailleurs, il n'est pas exclu de penser que la localisation de la modalité désherbée pourrait être à l'origine de son drainage précoce et intense. Située en bas de versant, elle pourrait être plus propice à l'engorgement.

Les courbes de double-cumul « débit-débit » ont été tracées dans l'objectif de confirmer nos hypothèses concernant le fonctionnement hydraulique des modalités d'entretien du sol. L'allure de la courbe « débit-débit » met en évidence des différences de comportement hydrologique et de restitution.

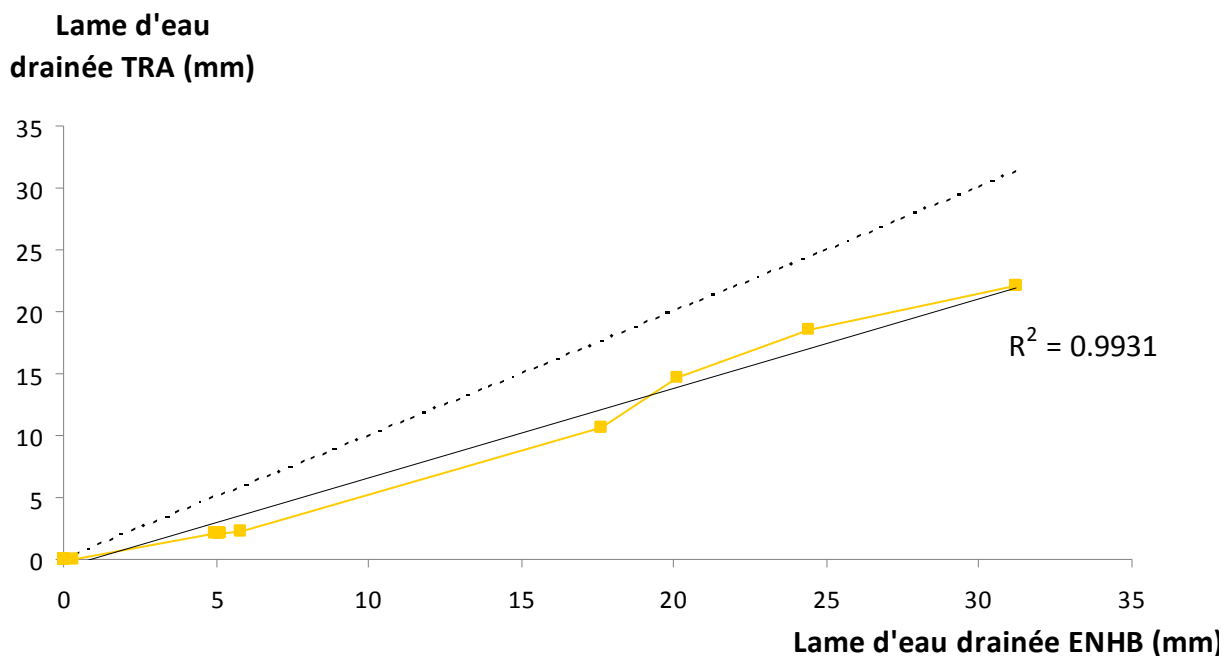


Figure 2.32 : Courbe double-cumul « débit-débit » : courbe des lames d'eaux drainées de la modalité travaillée (TRA) en fonction des lames d'eau drainées par la modalité enherbée (ENH). Une courbe de tendance (régression linéaire) a été ajoutée en noir (coefficient de corrélation : $R^2 = 0,9933$). La droite en pointillée est la bissectrice théorique

La Figure 2.32 présente les lames d'eau drainées par la modalité travaillée en fonction des lames d'eau drainées par la modalité enherbée. Nous pouvons en déduire d'après l'allure de la courbe et le coefficient de détermination de la régression linéaire ($R^2 = 0,9933$) que ces 2 modalités se caractérisent bien par un même fonctionnement hydraulique. Toutefois, elles ne restituent pas le même

volume d'eau. En effet, la droite de tendance ne se confond pas avec la bissectrice théorique du graphique : la modalité en abscisse (enherbement) draine plus pour l'ensemble de la période représentée (janvier à juillet 2008).

La courbe des double-cumuls classique (Figure 2.29) mettait en évidence un fonctionnement hydraulique différent pour la modalité enherbée. La Figure 2.33 vient confirmer cette tendance. La modalité désherbée est prise comme référence du tracé des courbes.

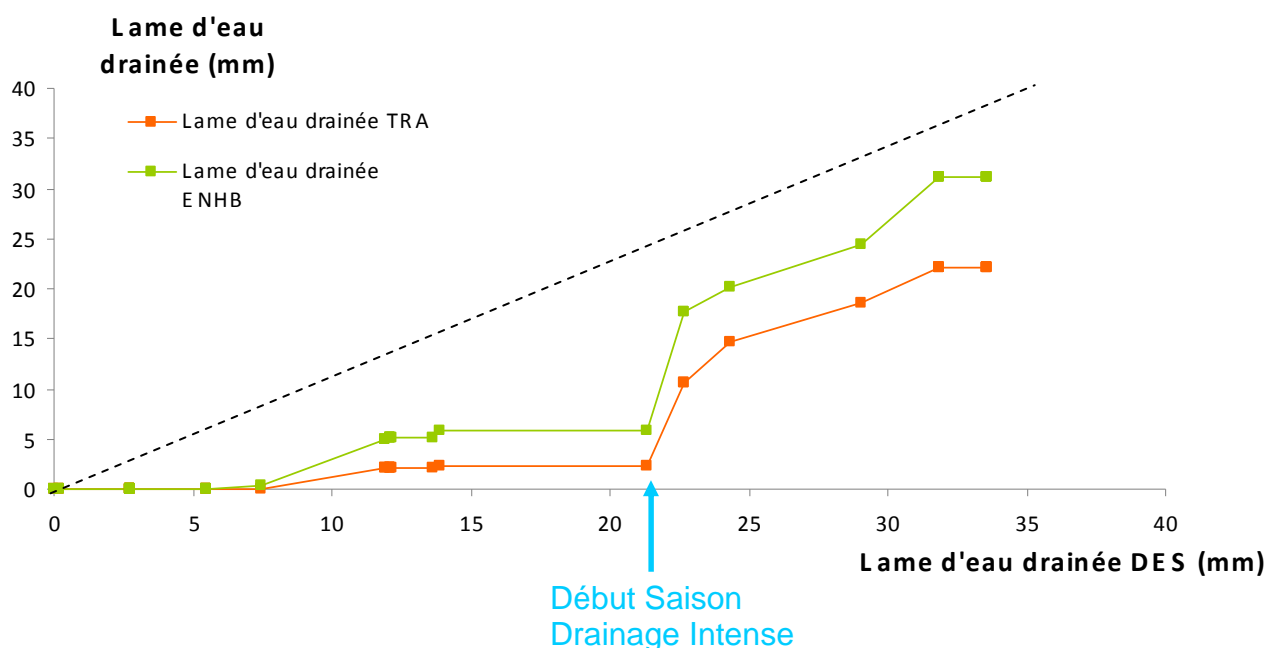


Figure 2.33 : Courbes double-cumuls « débit-débit » : courbes des lames d’eaux drainées pour les modalités travaillée (TRA) et enherbée (ENH) en fonction des lames d’eaux drainées par la modalité désherbée (DES). SDI : Saison de Drainage Intense

Le fonctionnement hydraulique de la modalité désherbée est vraiment différent de celui des 2 autres modalités. Les 2 courbes de double-cumuls présentées sur la Figure 2.33 ne sont pas linéaires. Par ailleurs, les restitutions de la modalité désherbée en début de saison de drainage intense sont plus importantes que pour les 2 autres modalités (éloignement de la bissectrice).

Résumé :

Les faibles coefficients de restitution et la modélisation par SIDRA indiquent que seulement 17 % de la surface de la parcelle contribue au drainage.

La modalité travaillée et la modalité enherbée réagissent de la même façon à la pluie. Elles ont le même fonctionnement hydraulique bien que la modalité travaillée restitue moins d'eau.

La modalité désherbée a un comportement hydraulique différent. Elle réagit très vite à la pluie de part l'existence de chemins préférentiels d'écoulement de l'eau (macropores, fentes de retrait) notamment en saison de drainage intense.

3.2 Concentrations en molécules actives dans les sols

Les résultats sont présentés pour chacune des molécules de l'étude, au niveau du rang et au niveau de l'inter-rang en fonction de la modalité d'entretien du sol. Au total, plus de 1700 analyses de sol ont été réalisées (3 modalités d'étude et un témoin ; 3 prélèvements par modalité ou témoin ; au niveau du rang mais aussi de l'inter-rang ; pour 3 profondeurs et sur 8 dates).

3.2.1 Au niveau des rangs

Les figures 2.34 et 2.35 présentent les concentrations en pesticides dans les échantillons de sols prélevés sur le **rang** des 3 modalités de l'étude et dans la bande enherbée témoin, aux 3 profondeurs (0-5 ; 5-20 et 20-40 cm). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g kg}^{-1}$ pour chacune des dates de prélèvement comme une moyenne (\pm erreur standard) des 3 répétitions de chaque modalité. Les flèches indiquent la position des traitements avec la molécule considérée par rapport aux prélèvements de sol et le nombre de traitements ayant été effectués (en relation avec les Tableaux 2.2 ; 2.3 ; 2.4). Une absence de donnée sur le graphique signifie que la valeur moyenne est inférieure à la limite de quantification (LOQ) voire de détection (LOD). **L'échelle logarithmique** a été choisie dans l'objectif de faciliter la lecture de l'ensemble des données (sans écraser les valeurs proches de la LOD).

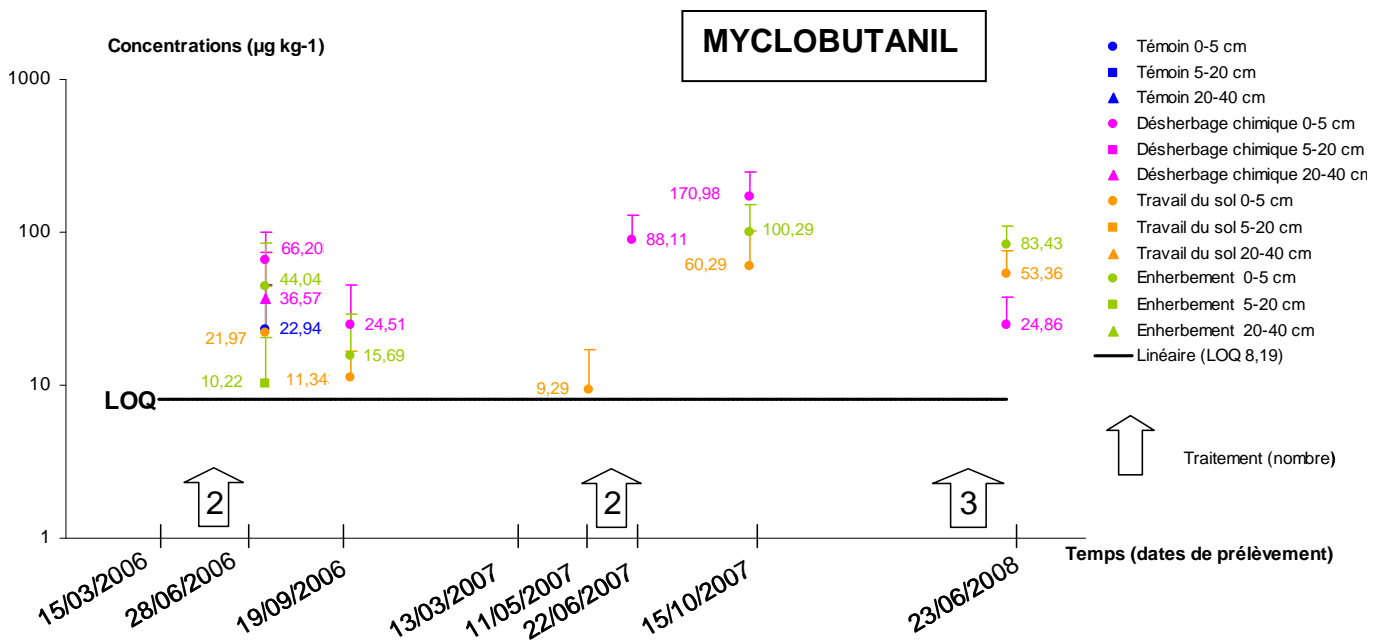
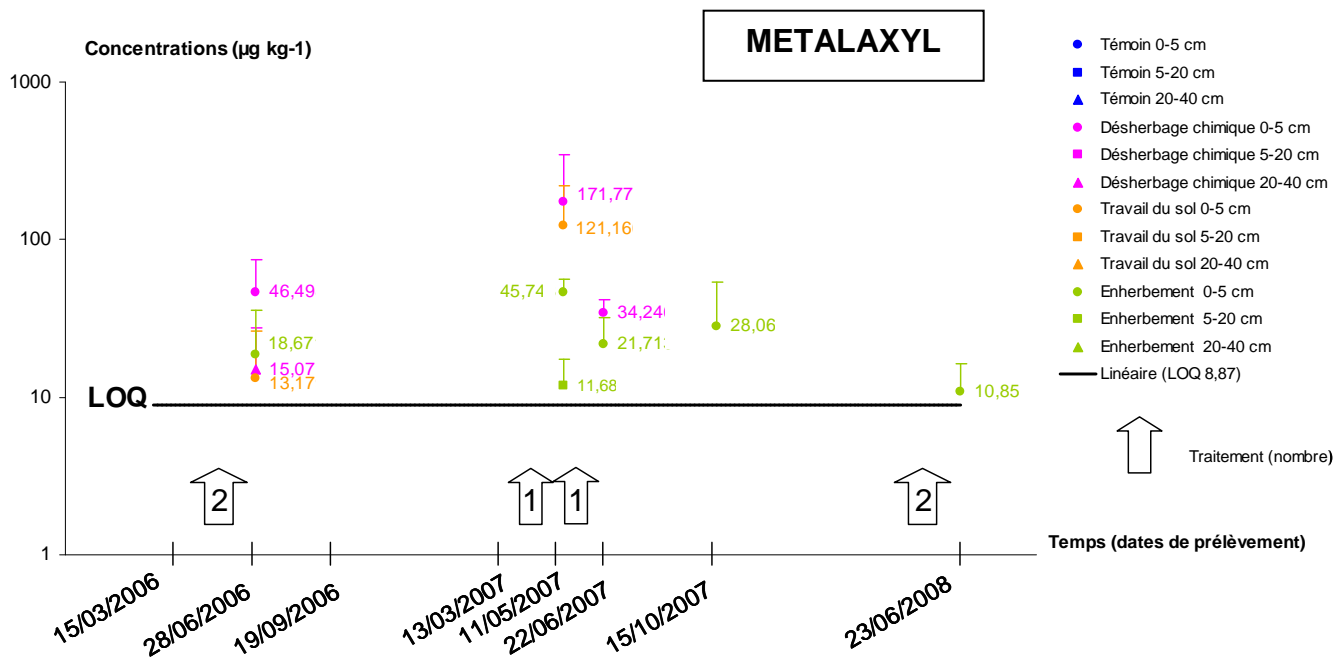


Figure 2.34 : Concentrations en fongicides métalaxyl et myclobutanil dans les sols des rangs de la parcelle

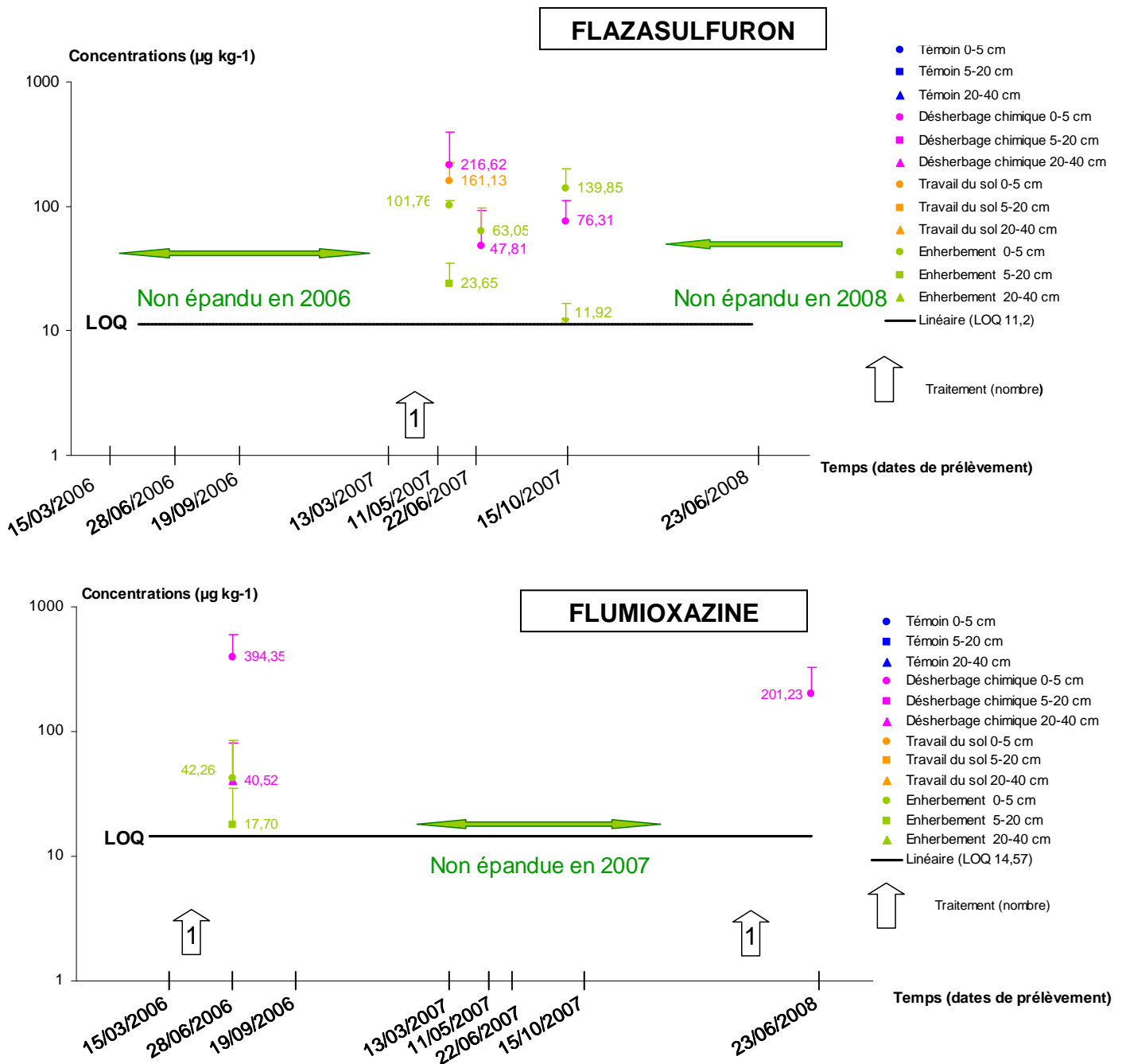


Figure 2.35 : Concentrations en herbicides flazasulfuron et flumioxazine dans les sols des rangs de la parcelle

La première des constatations faites à partir des figures 2.34 et 2.35 concerne l'importante **variabilité entre les répétitions au sein d'une même modalité**. Les erreurs standards sur les graphiques mettent en évidence une hétérogénéité importante de la contamination du sol dans une même modalité, à une profondeur donnée. Cette variabilité s'explique par le fait que souvent la molécule n'est détectée

que dans un seul échantillon des 3 répétitions, comme l'avait déjà observé **Guimont (2005)** dans ses travaux de thèse. Ainsi, une étude statistique des données par une analyse de variance (ANOVA à double entrée) serait inappropriée compte-tenu de cette variabilité intra-modalité. Nous nous contenterons dès lors de réaliser une **description des principales tendances dégagées**.

Le 28 juin 2006, les témoins sont contaminés en **myclobutanil**. Une pollution lors de l'épandage des fongicides semble être l'hypothèse la plus probable (contamination ponctuelle par la cuve, entraînement par le vent, etc). Ce phénomène de pollution éloignée du lieu d'application a déjà été constaté par **Hildebrandt et al. (2008)**.

Nous remarquons ensuite que, bien qu'il n'y ait pas de différence significative par rapport aux témoins, les fongicides sont retrouvés dans les premiers centimètres du sol sur les 3 modalités de l'étude deux semaines après le dernier épandage du printemps en 2006 et un jour après l'épandage du 10 mai en 2007. Comme le soulignent **Voltz et Louchart (2001)**, le risque maximal de contamination correspond au cas où une forte averse se produit peu de temps après application ou arrivée du produit au sol.

Les herbicides (**flazasulfuron et flumioxazine**) semblent être plus présents en profondeur, comme en témoigne les valeurs supérieures à la limite de quantification dans certains prélèvements jusqu'à 20 cm de profondeur. Ces herbicides ne sont que très rarement détectés dans la modalité travaillée. Il s'agit également de molécules ayant une plus grande persistance dans le sol au cours du temps : le flazasulfuron est encore détecté en fin de campagne (octobre) dans les sols.

Les insecticides **chlorpyrifos et λ -cyhalothrine** ne sont retrouvés que dans peu de prélèvements, suivant directement leur épandage, et à des teneurs très proches de leur limite de quantification (résultats et graphes non présentés). Ces molécules ont des valeurs de Koc très élevées, elles seraient donc adsorbées au sol sous forme de résidus liés non extractibles.

3.2.2 Au niveau des inter-rangs

Les figures 2.36 à 2.40 présentent les concentrations en pesticides dans les échantillons de sols prélevés sur l'**inter-rang** des 3 modalités de l'étude et dans la bande enherbée témoin, aux 3 profondeurs (0-5 ; 5-20 et 20-40 cm).

La forte variabilité intra-modalité est remarquable dans les graphiques de chacune des molécules. De la même façon que pour les rangs, les résultats constatés montrent une grande variabilité mais permettent toutefois d'extraire des tendances véhiculant des informations intéressantes.

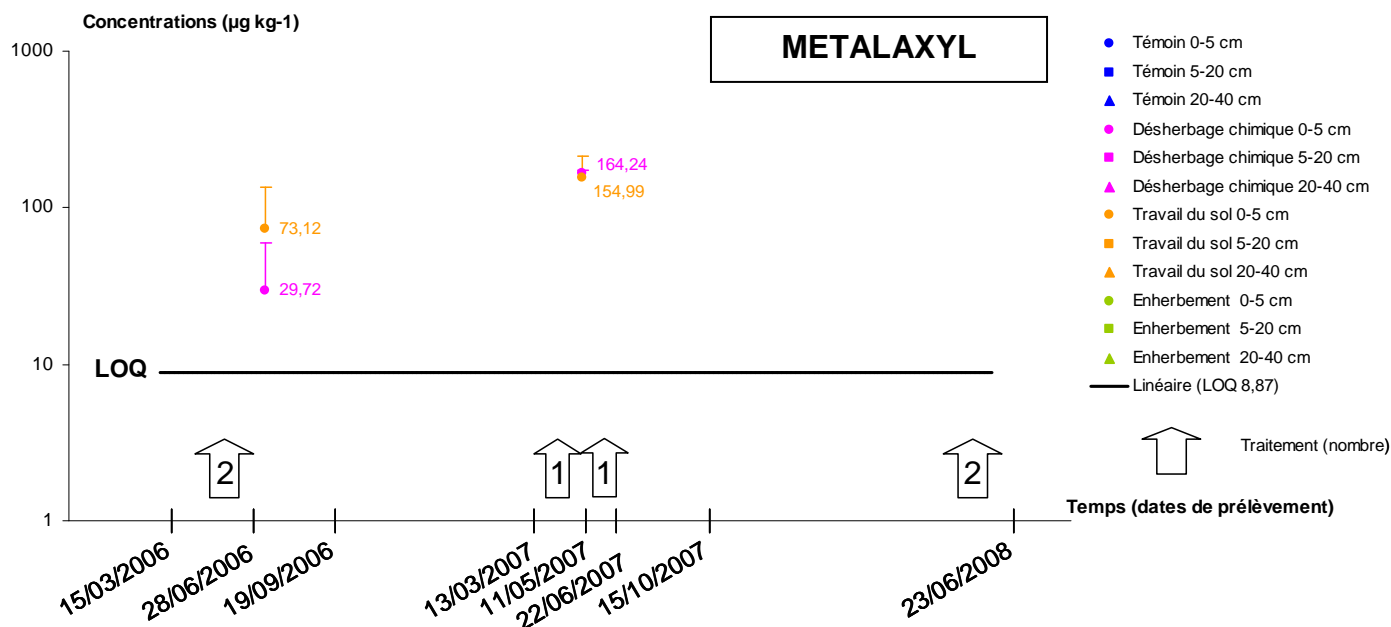


Figure 2.36 : Concentrations en métalaxyl dans les sols des inter-rangs de la parcelle

La figure 2.36 présente les concentrations en **métalaxyl** dans les sols de l'inter-rang des 3 modalités de l'étude et des témoins, pour les 3 profondeurs considérées. Une absence de donnée sur le graphique signifie que la valeur moyenne est inférieure à la limite de quantification (LOQ) pour la profondeur et la modalité étudiées.

Le 28 juin 2006, deux semaines après le second épandage de métalaxyl, la molécule est détectée à des valeurs supérieures à la LOD en surface sur les inter-rangs de la modalité dés herbée et de la modalité travaillée.

En 2007, le prélèvement du 11 mai 2007 a lieu un jour après l'épandage de la molécule. Comme en 2006, le métalaxyl est détecté dans 2 modalités de l'étude à des concentrations plus élevées du fait de la proximité avec l'application de la molécule sur la vigne.

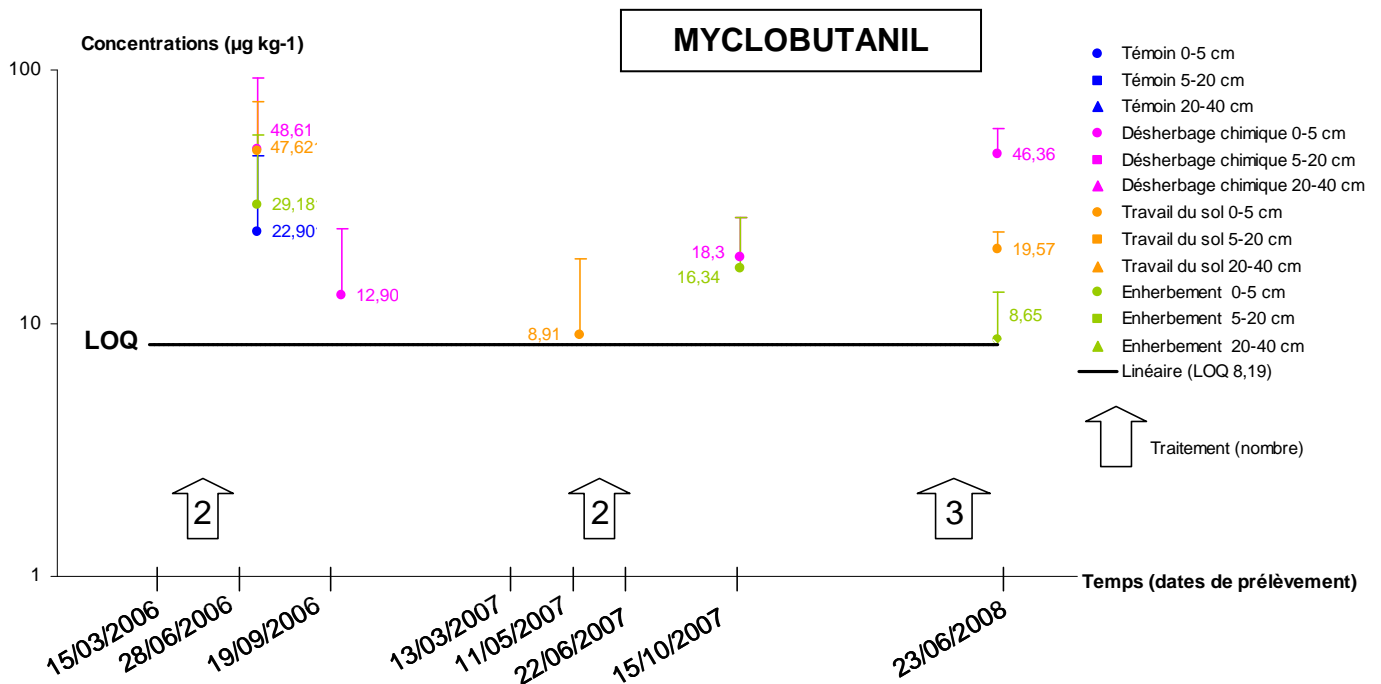


Figure 2.37 : Concentrations en myclobutanil dans les inter-rangs des sols de la parcelle

Les concentrations en **myclobutanil** dans les sols des inter-rangs sont présentées sur la figure 2.37.

Au printemps 2006, suite aux 2 applications sur la parcelle, la molécule est détectée dans les 3 modalités. Bien que facilement mobilisable, cette molécule est assez rémanente dans le sol comme en témoigne les prélèvements bilans de septembre 2006 et d'octobre 2007 et celui du 11 mai 2007 pour la modalité travaillée.

Le prélèvement de juin 2008 confirme la présence du fongicide dans les 3 modalités de la parcelle suite aux épandages de printemps.

Le **folpel** est le troisième fongicide suivi dans notre étude. Cette molécule s'avère indétectable dans les sols de la parcelle au niveau des inter-rangs.

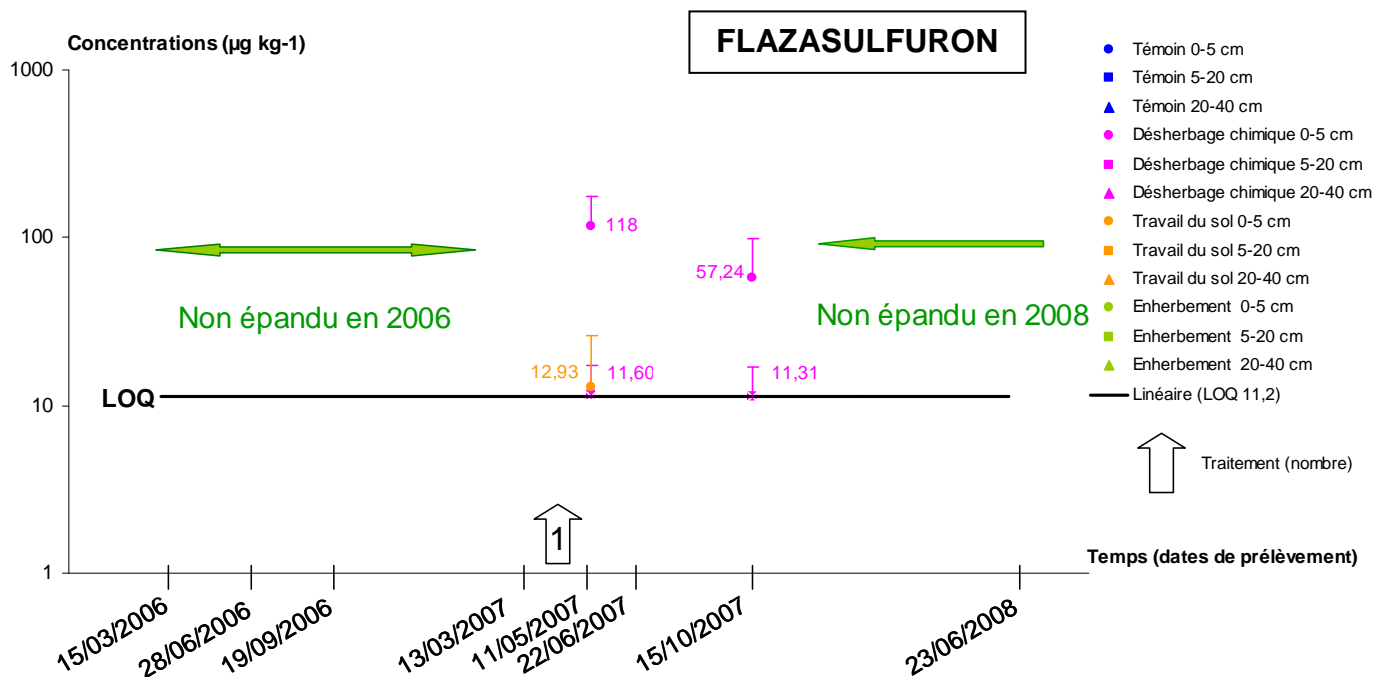


Figure 2.38 : Concentrations en flazasulfuron dans les inter-rangs des sols de la parcelle

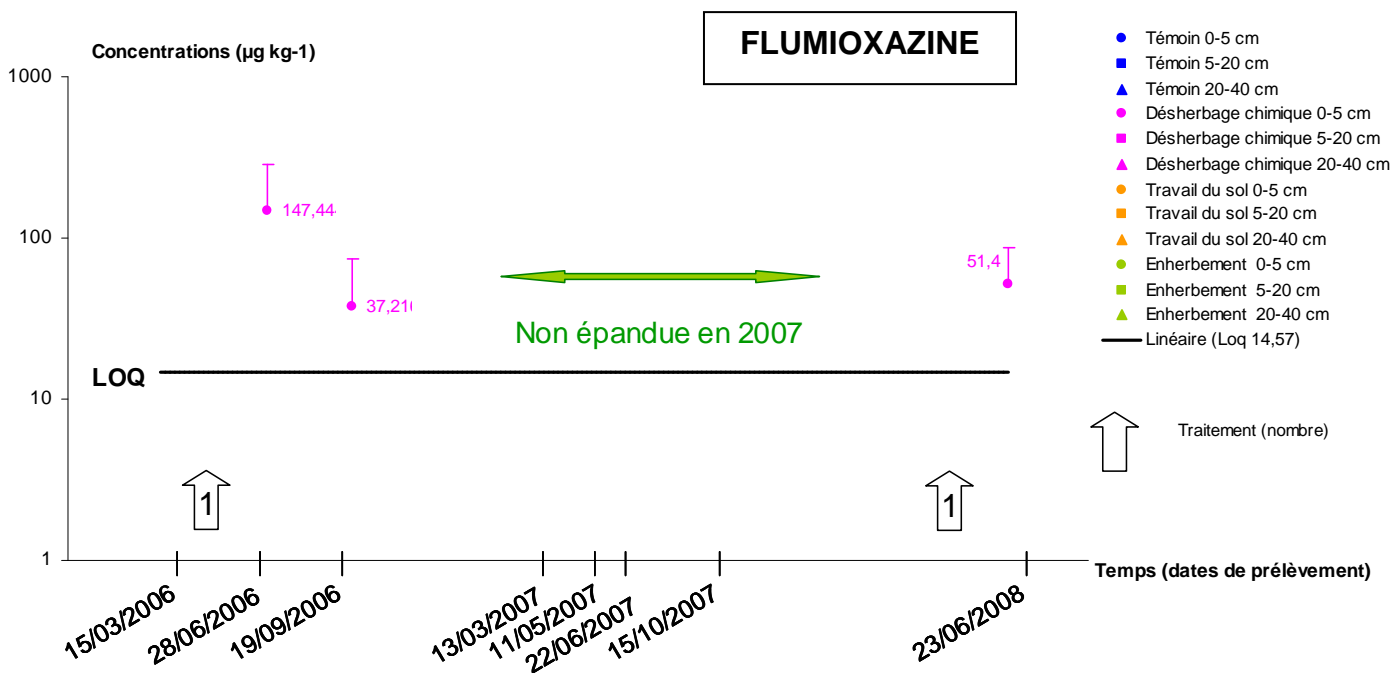


Figure 2.39 : Concentrations en flumioxazine dans les inter-rangs des sols de la parcelle

Les figures 2.38 et 2.39 présentent les concentrations en **flazasulfuron** et **flumioxazine** dans les sols. Ces herbicides sont épandus directement sur le sol en action de pré-levée. La modalité désherbée est traitée en plein : rang et inter-rang,

contrairement aux autres pour lesquelles l'herbicide n'est appliqué que sous le rang. Nous constatons alors logiquement la présence en plus grande quantité des 2 herbicides dans le sol de la modalité désherbée intégralement. Pour la flumioxazine, les seules concentrations détectables et quantifiables correspondent à cette modalité avec, après les épandages, des concentrations importantes qui diminuent ensuite, dans le temps.

Dans cette modalité désherbée, le flazasulfuron est détecté jusqu'à 20 cm de profondeur quasiment 6 mois après son application.

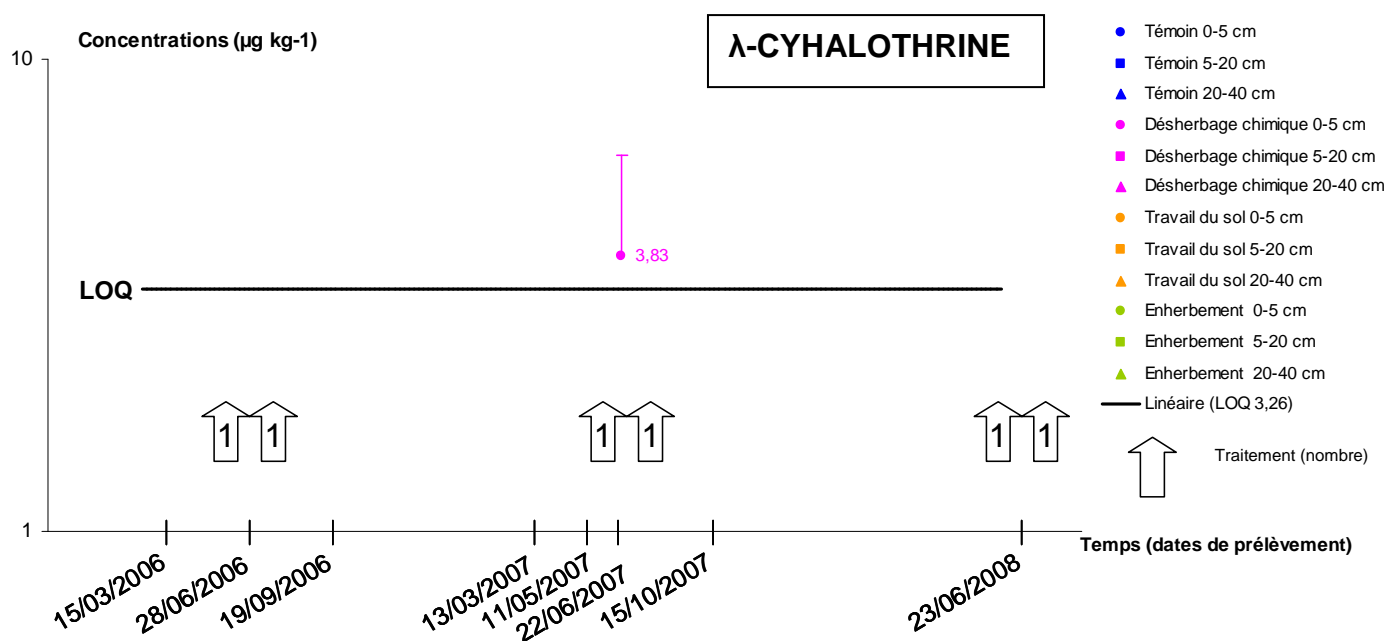


Figure 2.40 : Concentrations en λ -cyhalothrine dans les inter-rangs des sols de la parcelle

La figure 2.40 met en évidence l'absence de la λ -cyhalothrine dans les sols des inter-rangs des modalités de l'étude. En effet, elle n'est détectable que le 22 juin 2008, c'est-à-dire seulement 3 jours après son application sur la parcelle. Nous pouvons alors émettre les hypothèses selon lesquelles l'insecticide est dégradé rapidement sous l'effet de la lumière (photolyse), se dégrade dans le sol (biodégradations essentiellement car cette molécule est stable à pH 5-7) ou encore s'adsorbe au sol sous forme de résidus non extractibles par l'acétone (comme en témoigne son $K_{oc} = 157000$)... Par ailleurs, les insecticides sont appliqués directement sur la vigne en pulvérisation face par face, le sol ne devrait recevoir que quelques embruns. De plus, la λ -cyhalothrine est un insecticide de contact très peu soluble dans l'eau, ce qui pourrait expliquer sa forte adhésion aux plantes (gage

d'une meilleure action de protection contre les ravageurs), et de ce fait son absence dans le sol.

Les mêmes conclusions peuvent être tirées pour le **chlorpyrifos** qui est indétectable sur les échantillons de sol de la parcelle aux différentes dates et profondeur.

3.2.3 Discussion

La grande variabilité des données au sein d'une même modalité et l'absence fréquente de significativité statistique des résultats ne nous permettent pas de conclure quant à la pratique la plus polluante pour le sol. Nous pouvons toutefois émettre quelques éléments de discussion basés sur les tendances dégagées au cours de cette étude.

Les concentrations rencontrées au niveau des inter-rangs sont globalement plus faibles que celles des rangs pour une date de prélèvement et une molécule donnée. Les fongicides et insecticides sont appliqués directement sur la vigne par une pulvérisation en face par face.

Par ailleurs, nous remarquons qu'aucune molécule n'est détectée au-delà de 20 cm de profondeur. La détection et la concentration des matières par kg de terre diminuent avec la profondeur et l'éloignement des épandages dans le temps : seules les molécules les plus hydrosolubles (les fongicides métalaxyl et myclobutanil) restent détectables du fait de leurs propriétés physico-chimiques et de leurs seuils de détection des plus bas.

Le folpel ainsi que les insecticides λ -cyhalothrine et chlorpyrifos sont quasiment indétectables dans les sols de la parcelle (rangs et inter-rangs), quelle que soit la modalité d'entretien. Quasiment insolubles, les insecticides se dégradent dans le sol au cours du temps ($DT_{50} < 25$ jours ; biotransformations bactériennes ou métabolisation par les macroorganismes), et/ou s'adsorbent au sol, sous forme des résidus non extractibles. Très instable ($DT_{50} = 2$ jours), le folpel se dégrade rapidement et se volatilise dans l'air (**Bermudez-Couso et al., 2007 ; Agritox, 2008**). Les régions viticoles de France présentent en effet des concentrations élevées de folpel dans l'air ambiant (**Canal-Raffin et al., 2008**).

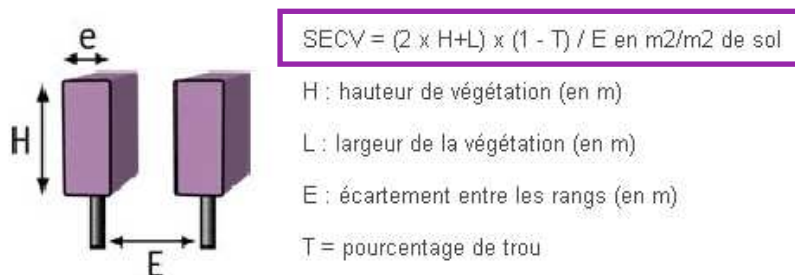
L'analyse des graphiques des inter-rangs peut nous permettre de dégager des tendances relatives à l'influence de l'entretien du sol. Bien souvent lorsqu'une molécule est détectable, les plus fortes concentrations sont retrouvées dans le sol de la modalité entièrement désherbée tandis que les concentrations les plus faibles (souvent inférieures à la LOQ) apparaissent pour l'enherbement.

La terre de la modalité désherbée chimiquement est chargée en molécules actives : celles-ci sont détectées en surface mais aussi un peu plus en profondeur, rapidement après les épandages. L'hypothèse d'un sol nu, sujet à une rapide exportation des pesticides par des infiltrations préférentielles à l'origine d'une pollution des eaux souterraines, précédemment émise concernant le fonctionnement hydraulique du sol, serait donc confirmée. Cette hypothèse a été validée également par les analyses des concentrations en pesticides dans les eaux de drainage.

La modalité travaillée mécaniquement présente des concentrations en pesticides plus faibles que la modalité désherbée. Il n'est pas rare de détecter des molécules en surface dans cette modalité même si pour la majorité des pesticides ces concentrations avoisinent les seuils de quantification.

Enfin, dans la modalité enherbée, aucune molécule détectée n'a pu être quantifiée, sauf le myclobutanil. Comme nous l'avons déjà évoqué, l'enherbement favorise l'infiltration (**Lacas et al., 2005**). Toutefois, le couvert végétal peut également favoriser la rétention des pesticides à la surface du dispositif enherbé ainsi que leur stabilisation sous forme de résidus non extractibles (à l'acétone) liés à la matière organique particulaire très abondante (**Madrigal, 2004**). Par ailleurs, l'enherbement crée des conditions favorables (humidité, matière organique) à la dégradation des pesticides par les microorganismes dans les horizons superficiels du sol (**Benoit et al., 2003**). L'ensemble de ces considérations pourrait expliquer l'impossibilité de détecter la majorité des molécules cibles dans cette modalité.

En outre, l'enherbement, concurrentiel de la vigne pour l'eau et les éléments nutritifs, diminue la surface foliaire. Cette diminution de la surface foliaire est constatée visuellement mais peut également être calculée. On détermine en effet la **surface externe du couvert végétal** (SECV) qui est la surface de feuilles sur vignes palissées susceptibles de capter le rayonnement lumineux mais aussi les traitements phytosanitaires appliqués sur le feuillage. Le calcul de cette SECV fait intervenir la hauteur et la largeur de végétation ainsi que le pourcentage de trous ou porosité du feuillage variables selon l'entretien du sol (Figure 2.41).



Source : ITV Midi-Pyrénées, fiches pratiques

Figure 2.41 : Formule de calcul de la surface externe du couvert végétal (SECV) de la vigne

La vigne enherbée possède une largeur de végétation plus faible et un pourcentage de trous plus important quel que soit son stade phénologique (par exemple au stade M (36) de la véraison : L = 45 cm et T = 15 % en enherbement tandis que L = 50 cm et T = 6,5 % pour la vigne sur les 2 autres modalités). Elle intercepte donc moins les traitements phytosanitaires qui de ce fait arrivent directement sur le sol.

Ainsi, lors des traitements sur feuillage, bien que la quantité de fongicide ou insecticide appliquée soit la même sur chacune des modalités, la quantité arrivée au sol est supérieure en enherbement du fait de la concurrence exercée par le couvert végétal sur la vigne. Bien que n'ayant pas de données chiffrées pour chacun des stades phénologiques corrélés à une application des pesticides, nous pouvons supposer que la modalité enherbée reçoit directement sur le sol une plus grande quantité de molécules actives non interceptées par le feuillage de la vigne. Il serait alors judicieux de diminuer les quantités de pesticides appliquées sur les vignes enherbées afin d'ajuster la dose à la surface foliaire et au stade de développement de la vigne atteint pour chacune des dates de traitement phytosanitaire. La pollution environnementale serait limitée, tout en conservant la même efficacité d'action phytosanitaire (programme OPTIDOSE de l'Institut Français de la Vigne et du Vin ; **Raynal, 2004**).

L'ensemble des hypothèses émises dans ce paragraphe quant au transfert des molécules vers les eaux de drainage devra être étayé par les résultats et conclusions tirées de l'analyse des teneurs en pesticides détectées dans ces eaux.

Résumé :

La grande variabilité des résultats ne nous permet pas de conclure quant à la persistance ou à la percolation des molécules en fonction de l'entretien des sols. Toutefois, les tendances dégagées montrent que les inter-rangs sont moins contaminés en molécules actives que les rangs de vigne. Les molécules les plus présentes au niveau des rangs et des inter-rangs sont celles qui se dégradent lentement ($DT_{50} < 21$ j). Elles sont peu adsorbées (Koc) sur la matière organique du sol ou facilement remobilisables : il s'agit des fongicides myclobutanil et métalaxyl. Le folpel, très instable ($DT_{50} = 2$ j) est rapidement dégradé et probablement volatilisé. Les herbicides sont largement détectés dans la modalité désherbée chimiquement du fait de leur application en plein (sous le rang et au niveau des inter-rangs). Les insecticides, quasiment insolubles dans l'eau, sont dégradés par la lumière et/ou adsorbés au sol sous forme de résidus non extractibles (Koc très élevés).

La modalité la plus polluée est la modalité désherbée chimiquement du fait des infiltrations préférentielles dans le sol nu. L'enherbement (bien que concurrentiel de la vigne et diminuant la surface foliaire interceptant les traitements phytosanitaires) pourrait participer à la rétention des pesticides sous forme de résidus non extractibles dans le sol ou à leur dégradation bactérienne dans la zone racinaire.

3.3 Teneurs en molécules actives dans les eaux de drainage

Les eaux de drainage collectées lors des campagnes 2006-2007 et 2007-2008 sont analysées au laboratoire par la méthode multirésidus en GC-MS. Les concentrations en pesticides ($\mu\text{g L}^{-1}$) sont alors déterminées pour chacun des échantillons. Au total, **135 analyses d'eau** ont été réalisées sur l'ensemble des années d'étude.

Les eaux ayant été collectées de façon ponctuelle, à pas de temps variable, nous présenterons les résultats sous forme de graphique exprimant les concentrations à un instant t dans les eaux d'infiltration en lien avec la pluviométrie. Le modèle **SIDRA**

nous a permis de penser que seulement 17% de la part d'eau infiltrée est récupéré par le système de drainage. Dans le cas des données ponctuelles présentées ci-après nous raisonnons en concentrations, les volumes écoulés et la part des flux récupérée ne sont donc pas pris en compte. Les volumes d'eau drainés seront présentés en corrélation avec les concentrations pour l'année 2008.

Les résultats sont présentés pour chacune des molécules, en comparant les 3 modalités entre elles afin de conserver une analogie avec les résultats des teneurs en pesticides dans les sols.

Les figures ci-après (2.42 à 2.45) présentent ces résultats en concentrations de molécules actives au cours du temps et en relation avec la pluviométrie.

Les histogrammes matérialisent la pluviométrie tandis que les points colorés représentent les concentrations en molécules en fonction de la modalité d'entretien des sols. Les points colorés sur l'axe des abscisses signifient l'existence d'un prélèvement d'eau avec des concentrations inférieures à la LOQ. Enfin, les flèches grisées représentent les traitements phytosanitaires sur la parcelle avec la molécule suivie.

Il est nécessaire de préciser également qu'en 2006, les écoulements de printemps s'étaient arrêtés avant les traitements fongicides et insecticides sur la parcelle, alors qu'en 2007 et 2008, les hivers secs et les pluies importantes du printemps ont décalé la saison de drainage vers la période estivale.

Les 2 molécules les plus souvent retrouvées dans les eaux d'infiltration sont les 2 fongicides **métalaxyl** et **myclobutanil**. Ces molécules sont épandues au printemps, lorsque le système de drainage fonctionne encore, ce qui contribue à leur exportation vers les eaux souterraines. Le flazasulfuron et le métalaxyl sont les plus exportés quantitativement par rapport à leur application sur la parcelle. Les propriétés physico-chimiques des molécules (Tableau 1.4) expliquent cette contamination des eaux.

METALAXYL

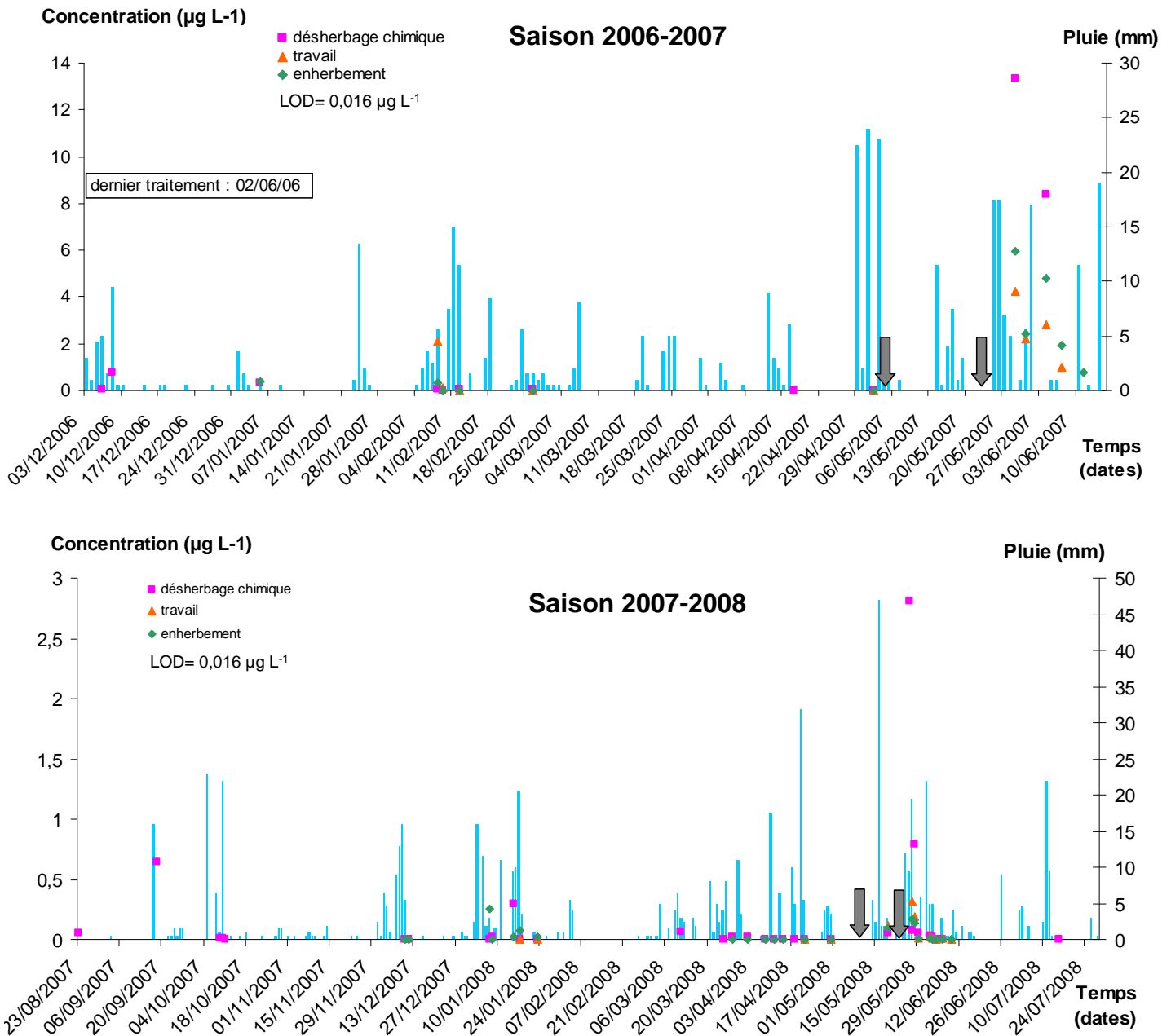


Figure 2.42 : Concentrations ponctuelles en métalaxyl dans les eaux d'infiltration des 3 modalités comparées en relation avec la pluviométrie (histogramme bleu).

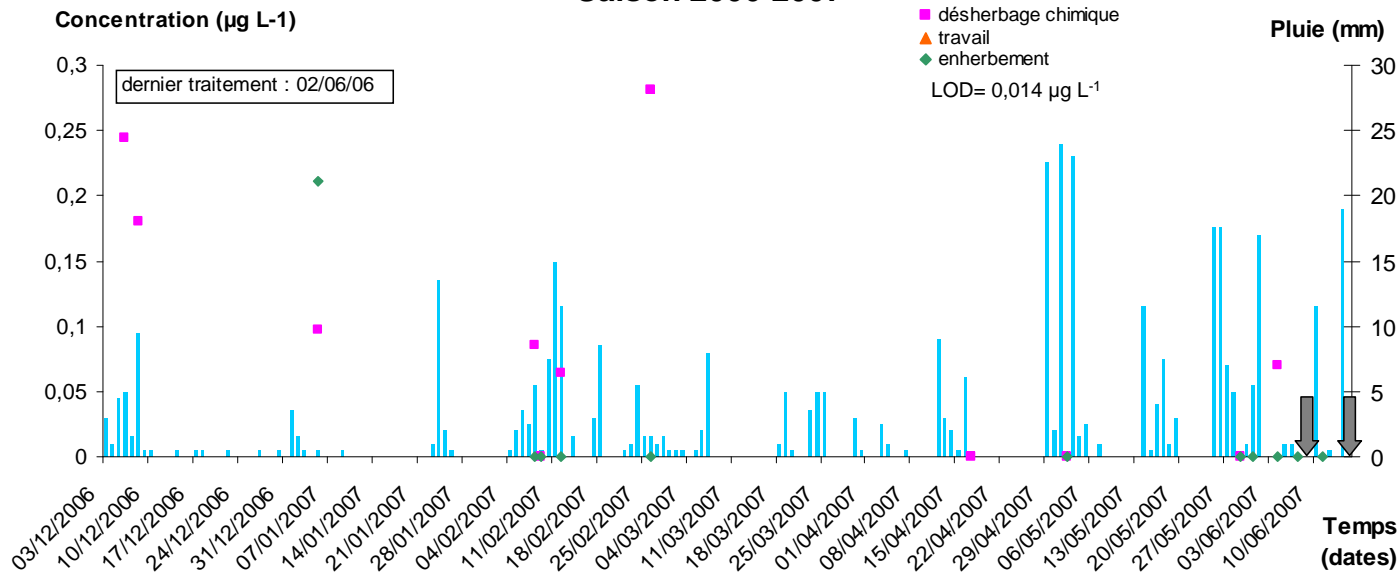
Le **métalaxyl** (Figure 2.42) est retrouvé dans les eaux d'infiltration tout au long de la campagne de drainage. En effet, nous constatons que les concentrations les plus élevées (jusqu'à $13,32 \mu\text{g L}^{-1}$) sont retrouvées dans les eaux collectées peu de temps après un épandage au mois de mai et juin (en 2007 mais également en 2008 dans des proportions plus faibles, du fait peut-être d'une pluviométrie moins

importante). Par ailleurs, les premières eaux de la campagne de drainage (automne et début d'hiver) sont également chargées en molécules actives.

La comparaison des modalités d'entretien du sol montre que la modalité désherbée est celle qui restitue le plus cette molécule, malgré un épandage équivalent aux autres. La modalité enherbée, qui a exporté en 2008 la plus grande quantité d'eau, relargue elle aussi des quantités non négligeables de cette molécule jusqu'au mois de janvier. Les concentrations retrouvées peuvent paraître assez élevées ; toutefois, comme le soulignent les récents travaux de **Hildebrandt et al. (2008)**, il est fréquent de retrouver du métalaxyl dans les eaux souterraines, jusqu'à des concentrations de l'ordre de $0,49 \mu\text{g L}^{-1}$ à 10 m de profondeur.

MYCLOBUTANIL

Saison 2006-2007



Saison 2007-2008

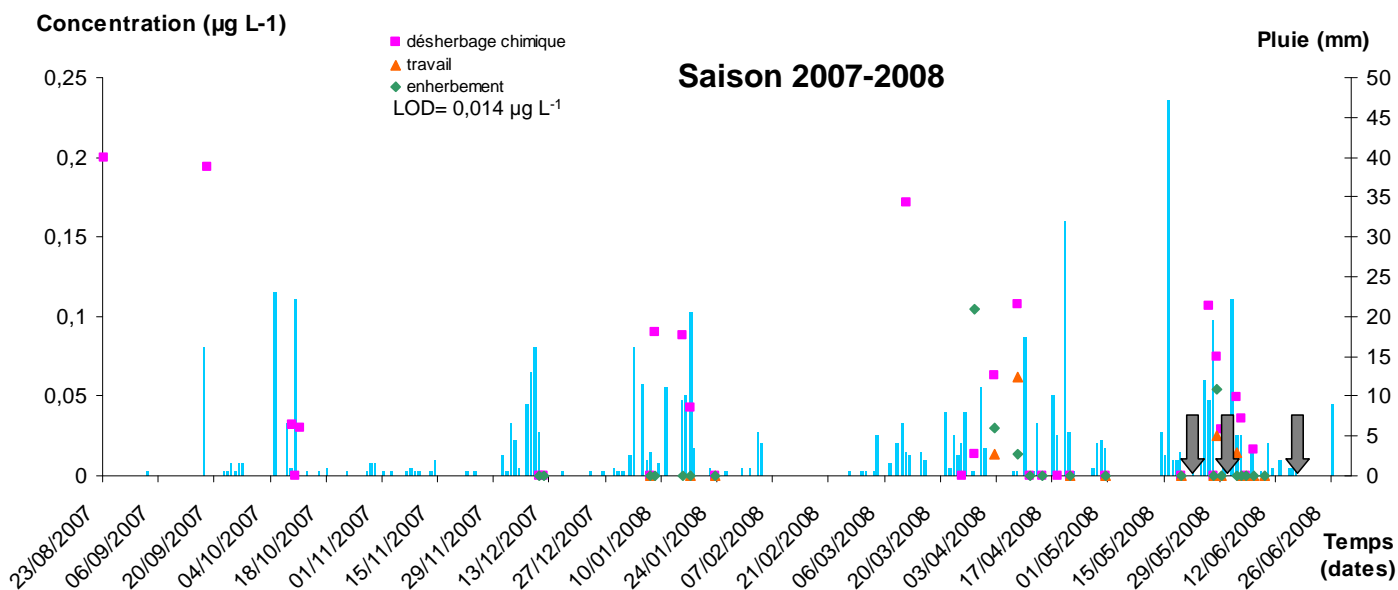


Figure 2.43 : Concentrations ponctuelles en myclobutanil dans les eaux d'infiltration des 3 modalités comparées en relation avec la pluviométrie (histogramme bleu).

Concernant le **myclobutanil**, les épandages sont assez tardifs dans la saison de drainage. Ainsi, ils ont peu d'effet sur les eaux collectées au printemps. Toutefois, les premières eaux collectées en début de saison de drainage (automne) sont chargées en molécule active comme le montre la Figure 2.43. Il est également intéressant de constater que cette molécule reste mobilisable plusieurs mois dans les sols quel que soit l'entretien pratiqué (comme en témoigne les concentrations retrouvées dans les

eaux du mois d'avril 2008). Comme pour le métalaxyl, la modalité dés herbée est celle qui exporte les plus grandes quantités de fongicide.

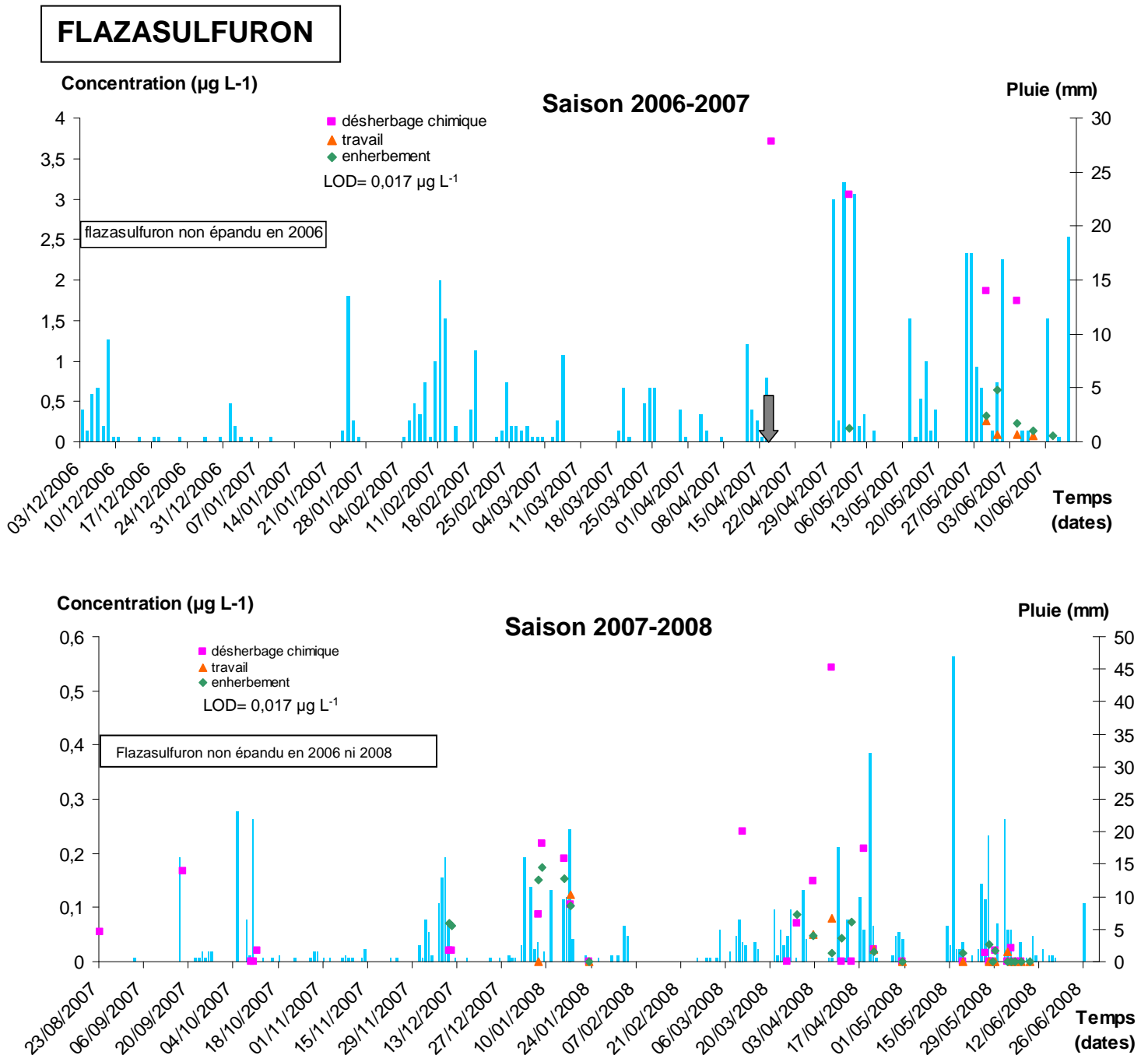


Figure 2.44 : Concentrations ponctuelles en flazasulfuron dans les eaux d'infiltration des 3 modalités comparées en relation avec la pluviométrie (histogramme bleu).

Le **flazasulfuron**, épandu une seule fois sur la parcelle en avril 2007, semble être très rémanent dans le sol, et rester mobilisable longtemps par les eaux d'infiltration

(Figure 2.44). En effet, la molécule est retrouvée à l'état de traces (concentrations de l'ordre de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$) dans les eaux de drainage un an après son épandage. L'étude des écoulements de printemps de l'année 2007, sur la première partie du graphique (2006-2007), montre un lien immédiat entre la dose appliquée et la contamination des eaux d'infiltration. En effet, cette molécule est un herbicide de pré-levée, directement appliquée sur le sol ; en plein pour la modalité désherbée chimiquement et uniquement sous le rang pour les 2 autres (soit une quantité 3 fois plus importante pour la modalité désherbée). Nous retrouvons alors dans les eaux de la modalité désherbée chimiquement des concentrations nettement plus élevées dans les jours qui suivent ce traitement phytosanitaire (50 g ha^{-1} appliqués sur la modalité désherbée chimiquement et $16,5 \text{ g ha}^{-1}$ sur les autres). Par la suite, cet effet dose s'estompe un peu.

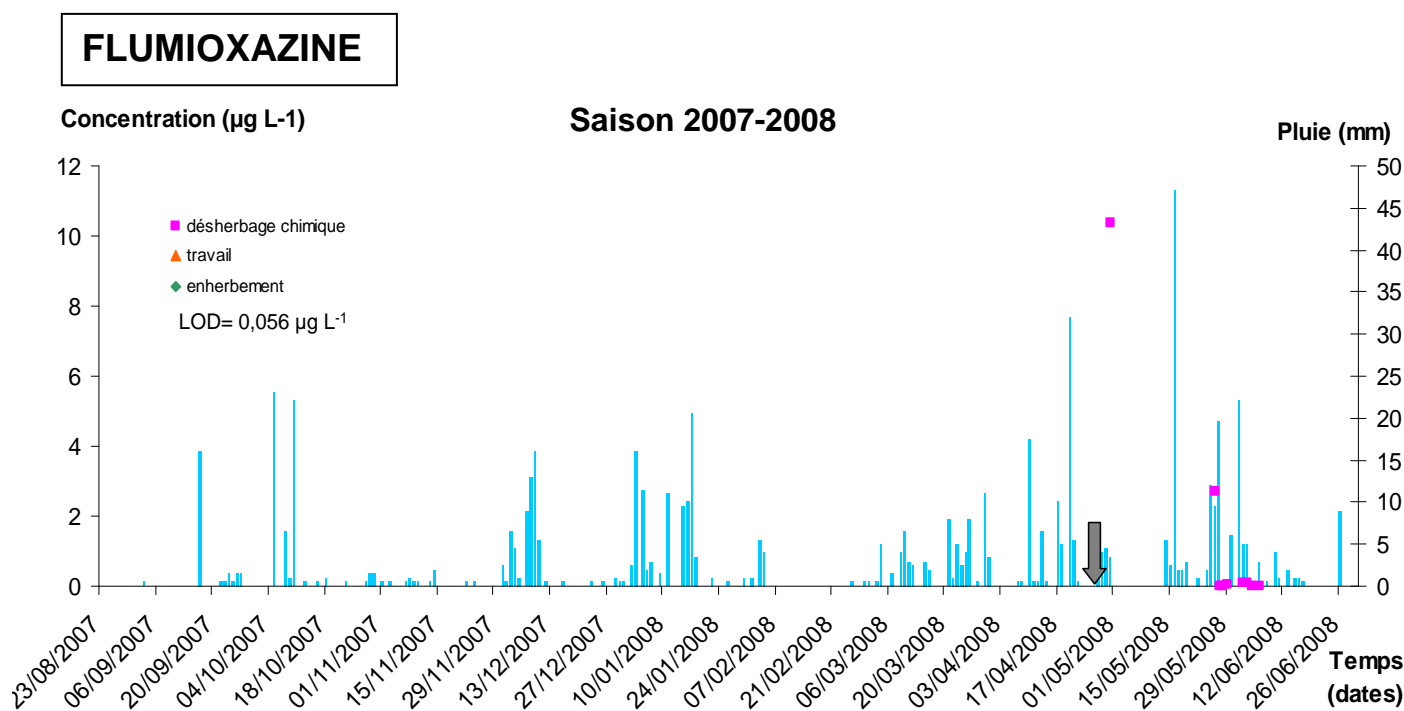


Figure 2.45 : Concentrations ponctuelles en flumioxazine dans les eaux d'infiltration des 3 modalités comparées en relation avec la pluviométrie (histogramme bleu)

La **flumioxazine**, second herbicide de pré-levée appliqué en alternance d'une année sur l'autre avec le flazasulfuron, a été épandue sur la parcelle en avril 2006 et 2008. Toutefois, la molécule n'a été détectée dans les eaux qu'en mai 2008 et seulement sur la modalité entièrement désherbée chimiquement qui a reçu une dose épandue 3

fois plus importante que les autres modalités (Figure 2.45). Par ailleurs, épandue le 29 avril, elle est détectée dans les eaux à une concentration assez élevée ($10,35 \mu\text{g L}^{-1}$) dès le lendemain, suite à une pluie de 5 mm. L'hypothèse des transferts préférentiels par des fentes de retrait dans la modalité désherbée semble alors être confortée par cette constatation. Ceci constituerait alors un risque non négligeable de contamination directe des eaux souterraines et des nappes profondes, par les herbicides car directement appliqués sur le sol.

Le **folpel** n'est jamais détecté dans les eaux d'infiltration, comme cela avait déjà été reporté par **Bermudez-Couso et al. (2007)** dans les sols et sédiments d'une rivière située en zone viticole. Cette molécule se dégrade rapidement avec un DT50 de l'ordre de quelques heures (**Agritox, 2008**). Par ailleurs, très volatile, la molécule de folpel est bien souvent retrouvée dans l'air aux dépens du sol ou de l'eau (**Canal-Raffin et al., 2008**).

Les insecticides **chlorpyrifos** et **λ -cyhalothrine** sont retrouvés dans les eaux lors de 3 prélèvements en décembre 2006 et à l'automne 2007 (premières eaux collectées en début de saison de drainage, après leur épandage estival). Les concentrations de ces molécules dans les eaux sont très voisines des limites de quantification, et ceci quelle que soit la modalité d'entretien des sols (résultats non montrés). Comme nous l'avons vu précédemment, ces molécules sont également faiblement détectées dans les échantillons de sols. Cette constatation peut être expliquée par le fait que ces molécules sont très peu solubles dans l'eau, dégradées par photolyse et fortement adsorbées aux colloïdes du sol. Par ailleurs, elles sont appliquées à des doses relativement faibles comparées aux herbicides ou fongicides.

Dans l'ensemble des graphiques présentés précédemment, les points des concentrations en molécules actives ne sont pas reliés car il s'agit de valeurs ponctuelles. Toutefois, nous pouvons distinguer une cinétique d'exportation des molécules phytosanitaires dans les eaux.

Nous constatons alors que les principaux événements pluvieux sont à l'origine des principaux épisodes de drainage et de ce fait de l'exportation des molécules actives. Il y a une bonne corrélation entre pluie, drainage et exportation des molécules. D'une manière générale, la cinétique de transfert décroît au cours du temps bien que certains événements drainants puissent remobiliser des molécules dans le système

sol. En effet, comme l'a souligné **Guimont (2005)**, l'exportation des molécules diminue lorsqu'on s'éloigne des épandages phytosanitaires. La disponibilité de la molécule baisse suite à une rétention accrue de l'analyte (résidu non extractible du sol) ou à sa dégradation biologique ou physico-chimique.

Toutefois, une pluie « efficace » peut favoriser à nouveau les échanges de matières entre la phase solide et la phase liquide du sol. Les exportations de molécules vers le drain peuvent à nouveau devenir plus régulière au fur et à mesure de la saturation du sol en eau comme le souligne l'exemple du flazasulfuron au printemps 2008.

En pleine saison de drainage, les substances phytosanitaires appliquées arrivent rapidement aux drains collecteurs. En effet, durant cette période, le sol est saturé en eau, chaque pluie fait réagir le système et entraîne avec elle par percolation les molécules épandues. Ceci s'avère d'autant plus remarquable pour la modalité désherbée chimiquement pour laquelle les macropores et le sol nu offrent des chemins préférentiels au transfert de l'eau. En dehors de la période des traitements phytosanitaires, il y a remobilisation d'une plus petite partie des molécules restantes dans les sols par l'eau de pluie (**Tournebize, 2001**) : c'est pourquoi les courbes d'exportation des molécules des figures 2.42 à 2.45 ne sont pas strictement décroissantes.

Une évaluation de l'influence de la pratique culturale sur les quantités exportées a été réalisée au cours de l'année 2008.

Les graphiques présentés ci-dessous mettent en évidence les volumes drainés pour chaque modalité d'entretien des sols (en L ha⁻¹). Les étoiles figurant sur ces courbes représentent les concentrations moyennes en pesticides relevées entre 2 collectes des eaux (échantillons composites).

Une absence de valeur à coté de l'étoile indique que le prélèvement a été effectué mais que la concentration est inférieure au seuil de quantification voire à la limite de détection (LOD) de la molécule considérée.

Les flèches noires présentent le moment des traitements phytosanitaires avec les molécules suivies (les traitements ayant lieu durant la saison printanière, les flèches sont absentes des premières parties des graphes lors des mois de fin d'hiver).

METALAXYL

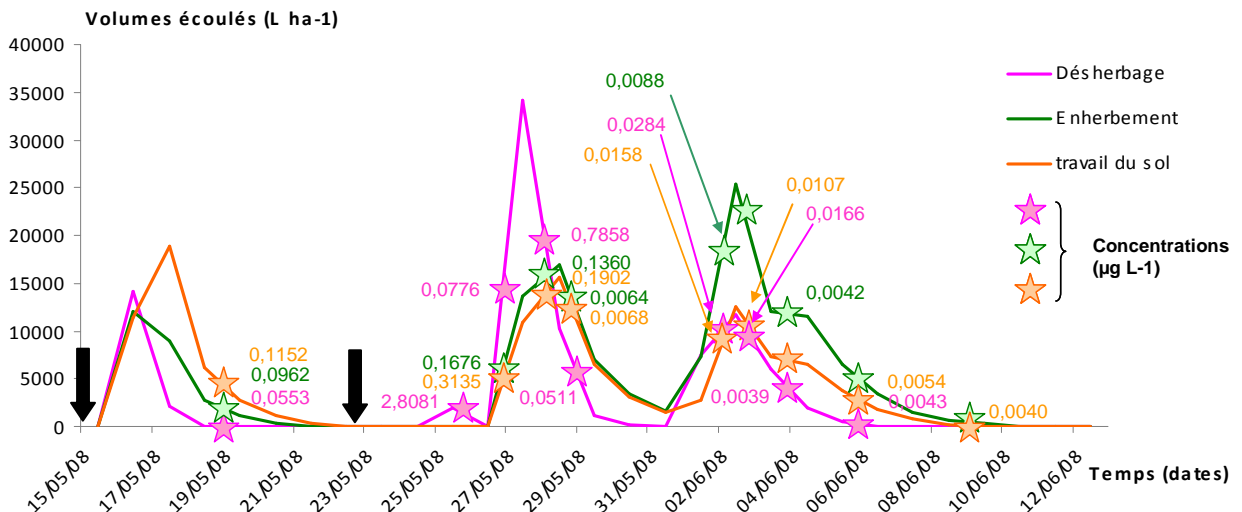
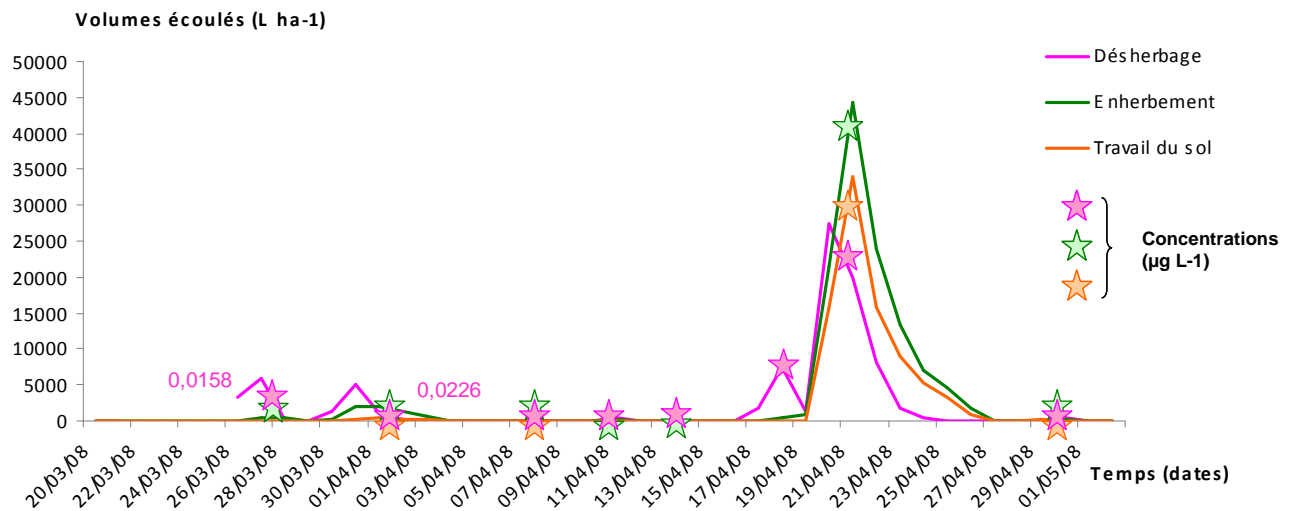
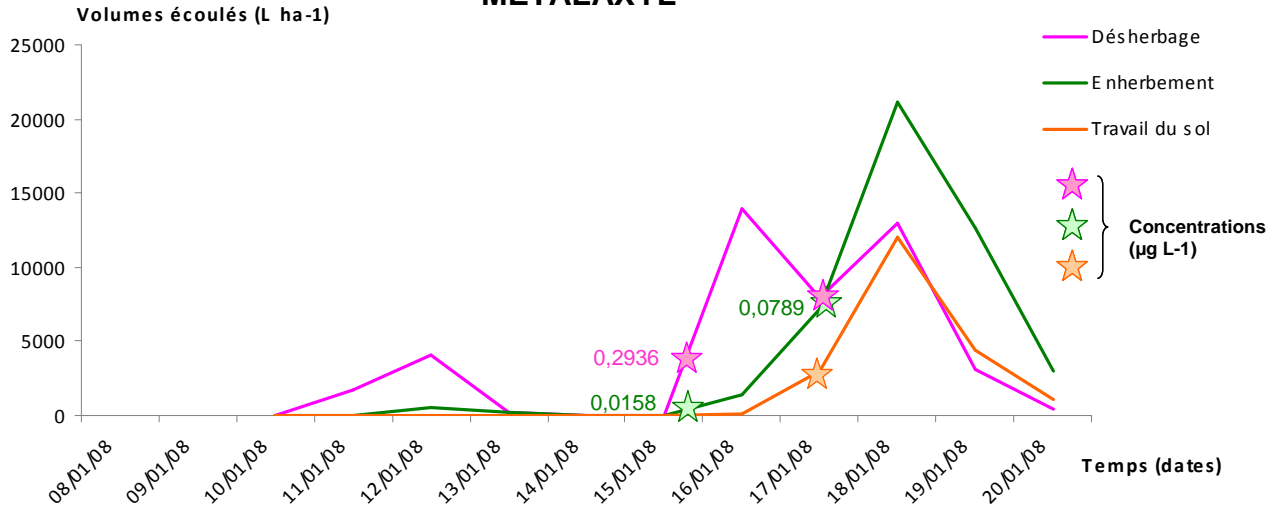


Figure 2.46 : Volumes écoulés et concentrations moyennes en métalaxyl dans les eaux de drainage en fonction de la modalité d'entretien du sol

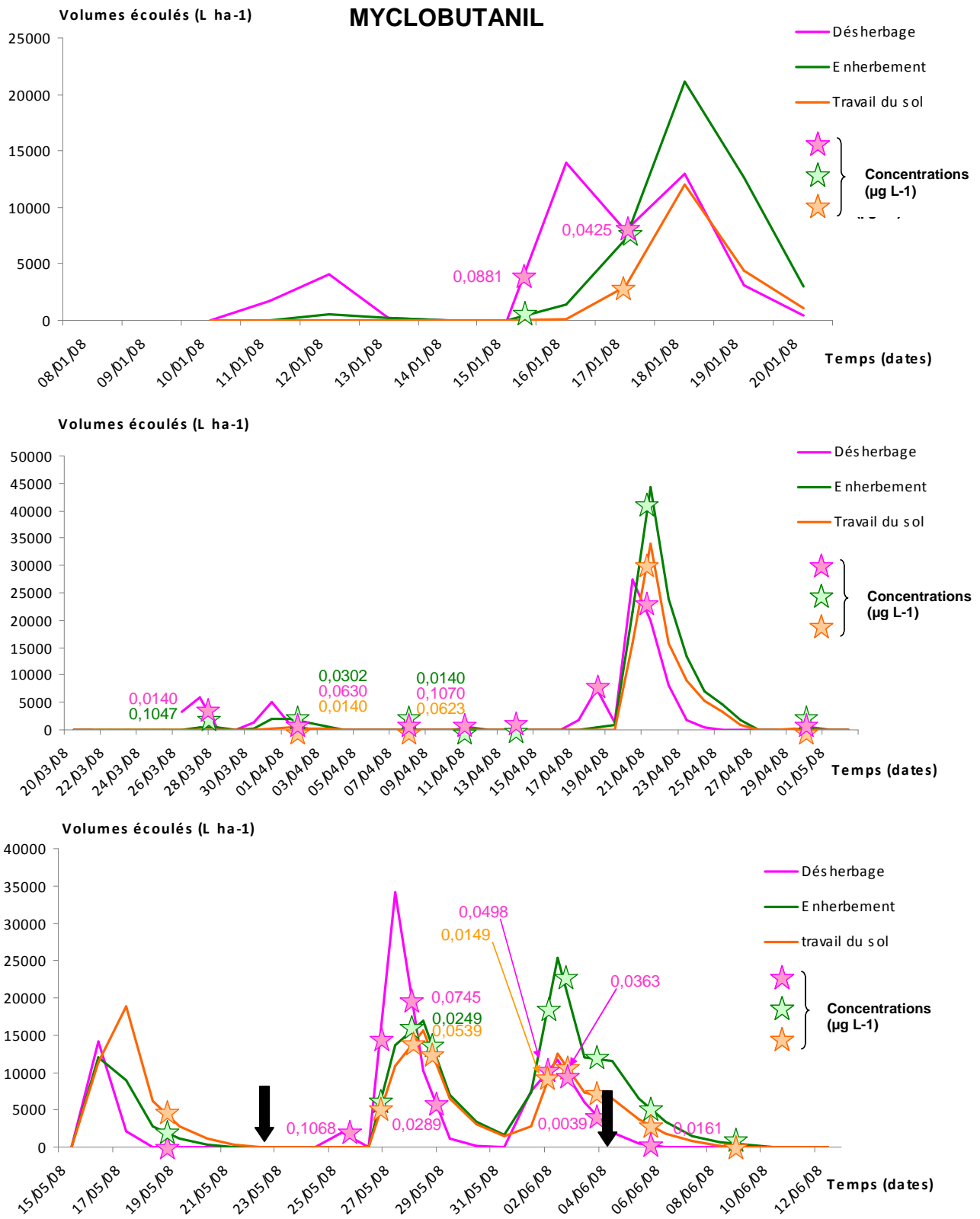
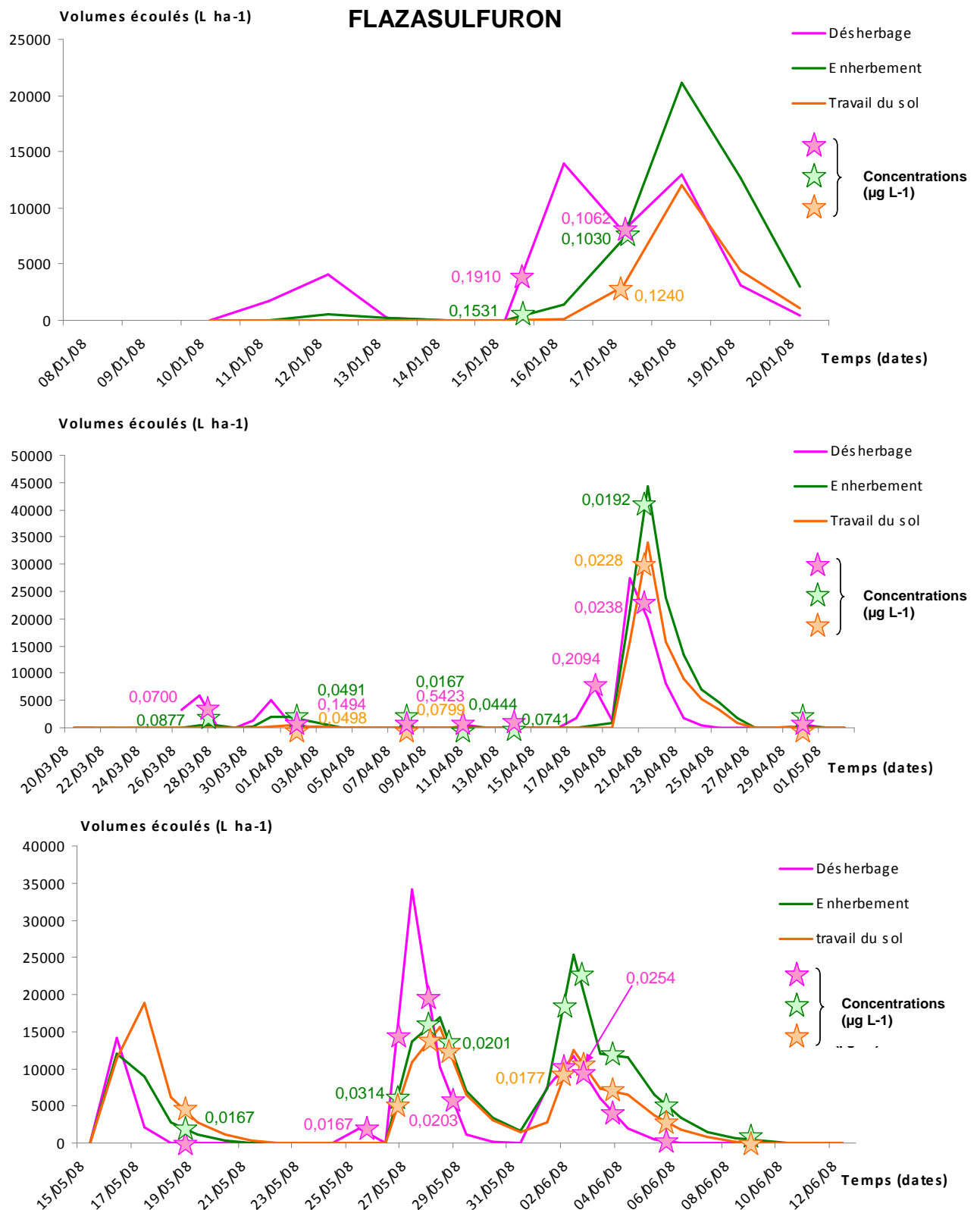


Figure 2.47 : Volumes écoulés et concentrations moyennes en myclobutanil dans les eaux de drainage en fonction de la modalité d'entretien du sol



FLUMIOXAZINE

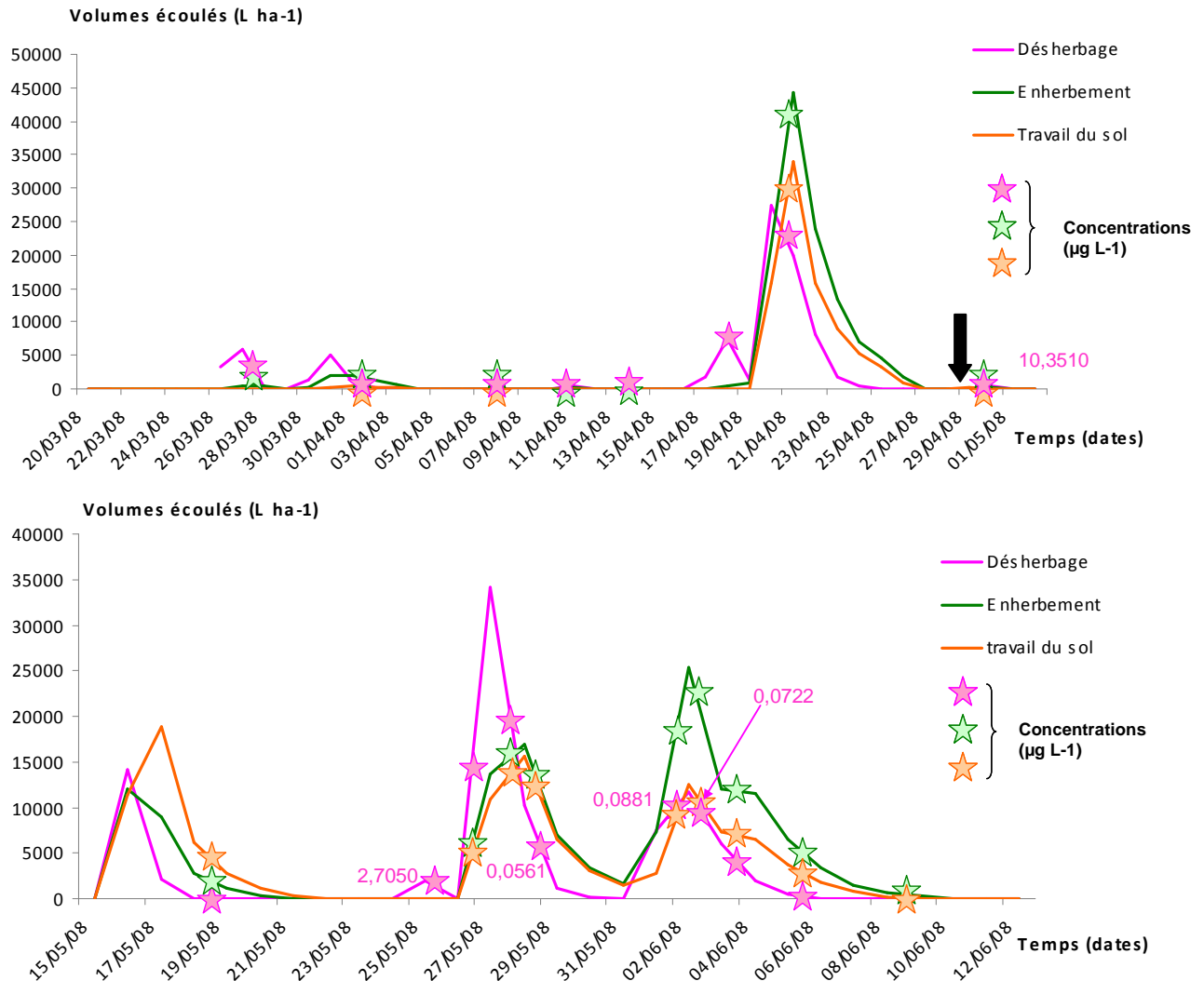


Figure 2.49 : Volumes écoulés et concentrations moyennes en flumioxazine dans les eaux de drainage en fonction de la modalité d'entretien du sol

L'ensemble de ces graphiques (Figures 2.46 à 2.49) montre que pour chacun des prélèvements seulement certaines molécules sont détectées. Cette détection dépend des caractéristiques physico-chimiques de la molécule qui la rendent plus ou moins dégradable ou mobilisable. Au cours de leur transfert, les pesticides sont soumis à un ensemble d'interactions avec les différentes fractions du sol qui modulent leur potentiel de pollution de l'eau. La détection d'une molécule dépend également du moment du prélèvement par rapport à l'épisode pluvieux. Bien souvent, s'agissant d'échantillon composite sur un événement drainant, la dilution rend la détection impossible (inférieure à la LOD).

Il est possible de mettre en relation le pic de concentration en pesticide avec le pic des volumes écoulés en L ha⁻¹. L'analyse d'une suite d'événements drainants (du 25 mai au 09 juin 2008) montre que le pic d'exportation des molécules précède celui des volumes écoulés, quelle que soit la modalité d'entretien du sol. Cette remarque reste valable pour toutes les molécules détectées dans les eaux d'infiltration comme le suggère la dernière période de drainage des figures 2.46 à 2.49. Les données collectées ne nous permettent pas de réaliser une cinétique détaillée de percolation, mais elles laissent toutefois penser que les premières eaux arrivées au drain sont les plus chargées en molécules actives (**Tournebize, 2001**).

Résumé :

La détection des pesticides dans les eaux de drainage est fonction des caractéristiques physico-chimiques des molécules (Koc, DT50 notamment) expliquant leur dégradation plus ou moins rapide, leur capacité de remobilisation par l'eau du sol. Tout comme dans le sol, le myclobutanil et le métalaxyl sont régulièrement détectés. Le flazasulfuron, peu documenté jusqu'à présent, est retrouvé dans les eaux plusieurs mois après son application. Les eaux de drainage de la modalité désherbée chimiquement sont les plus polluées.

L'exportation des molécules actives est régulière à mesure de la saturation du sol en eau puis elle diminue lorsqu'on s'éloigne dans le temps des applications phytosanitaires (diminution de la disponibilité du soluté, liaison au sol ou dégradation). Le pic de concentration des pesticides dans les eaux précède celui des volumes écoulés, quelle que soit la modalité d'entretien du sol.

3.4 Notion de transfert : exportation des pesticides vers les eaux de sub-surface

Afin de conclure ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la notion de transfert des pesticides vers les eaux d'infiltration. Nous souhaitons mettre en évidence pour un exemple concret la part des molécules épandues qui va contribuer d'une part à la pollution des sols et d'autre part à la contamination des eaux de sub-surface.

Pour cela, nous nous sommes focalisés sur l'exemple du printemps 2008. En effet, les données sur les volumes écoulés (nécessaire aux calculs des quantités de pesticides recueillies dans les eaux) n'étant connues que pour cette année, nous ne pouvons pas réaliser une synthèse pluriannuelle.

L'objectif est alors de suivre une chronologie du transfert depuis la date de la première application d'une molécule en 2008 jusqu'à la fin de la période drainante (le 23 juin 2008 qui est aussi la date du prélèvement et d'analyse des échantillons de sol). Nous connaissons la quantité de pesticides appliquée au champ (en g ha^{-1}) ainsi que la quantité de pesticide présente dans le sol de chaque modalité lors du prélèvement (g ha^{-1}) sachant que la densité apparente du sol a été évaluée à 1,5 ; que le rang représente un tiers de la surface et l'inter-rang les deux tiers et que les 5 premiers centimètres d'un hectare de sol correspondent à une masse de 750 t (2250 t pour 5-20 cm et 3000 t pour 20-40 cm). Enfin, nous connaissons les concentrations en pesticides dans les eaux pour la période d'écoulement définie. Les concentrations moyennes (en $\mu\text{g L}^{-1}$) sont exprimées alors en $\mu\text{g ha}^{-1}$ en considérant la somme des volumes écoulés pour chaque modalité.

Nous avons pris en compte le fait que seulement 17% des flux d'eau semblent contribuer au drainage et de ce fait aux quantités de molécules actives détectées dans les eaux. Cette hypothèse initiale nous conduit à maximiser potentiellement la contamination des eaux de drainage par les pesticides. Ainsi, en considérant que nous ne récupérons qu'une faible part des flux, nous avons déconvolué le signal pour estimer la part réelle des molécules actives exportée vers les eaux d'infiltration.

Ainsi, les figures ci-dessous (2.50 à 2.52) présentent ces résultats de transfert pour la période considérée du printemps 2008 sachant que l'épandage est maximisé. Nous considérons en effet que la totalité des doses épandues est disponible et mobilisable pour l'exportation et le transfert vers les eaux, bien que ce ne soit pas la réalité.

Les secteurs des graphiques ci-dessous matérialisent cette part du transfert pour le métalaxyl, le myclobutanil et la flumioxazine dans les 3 modalités de l'étude. La section « autres » des camemberts correspond à la part de la dose appliquée non retrouvée, ni dans les eaux d'infiltration ni dans le sol.

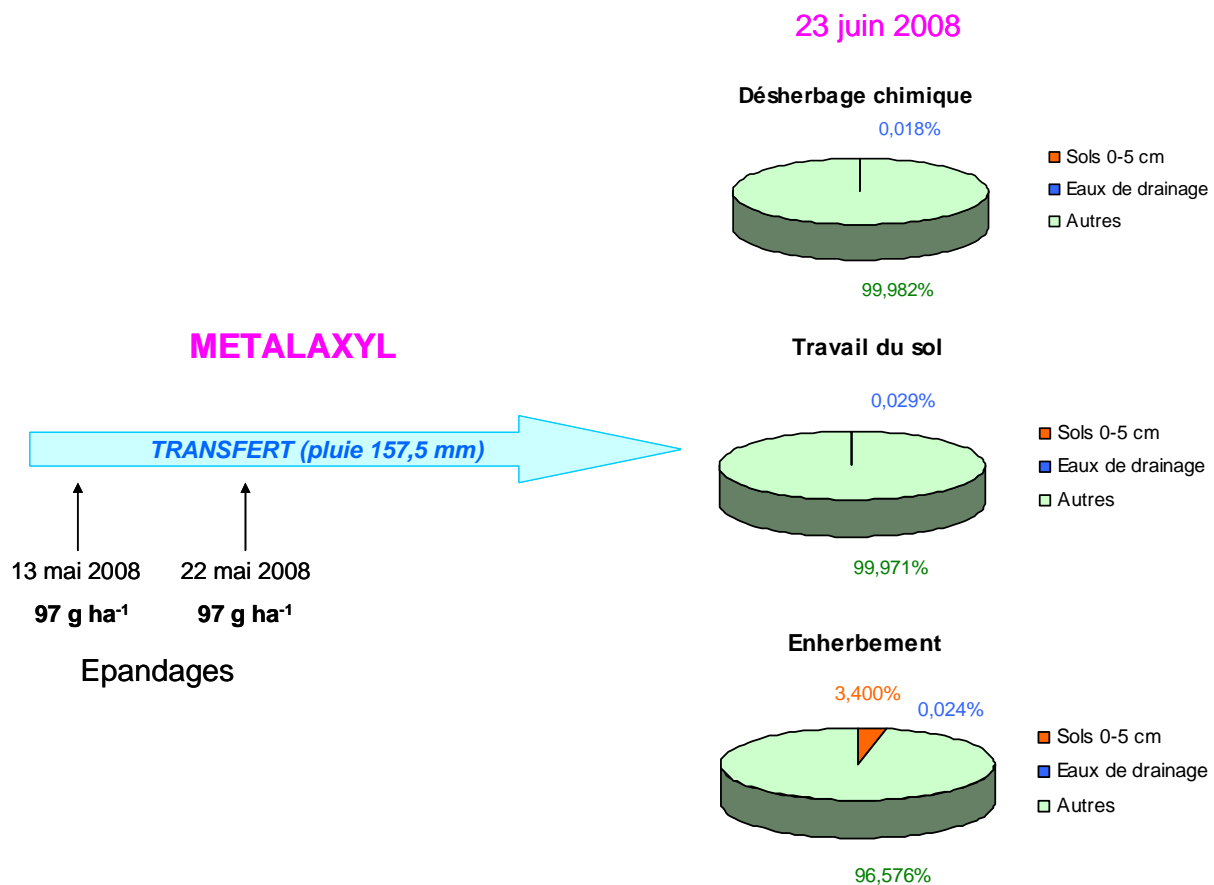


Figure 2.50 : Proportion de métalaxyl transférée vers le sol et les eaux d'infiltration par rapport aux quantités épandues en saison de drainage

La figure 2.50 montre que la part de **métalaxyl** transférée vers les eaux de drainage est infime : seulement 0,018 à 0,029% de la quantité épandue en fonction de la modalité. Il n'y a pas de différence significative quant au résultat du transfert entre ces 3 modalités pour la période considérée. Les caractéristiques de la dynamique du transfert sont peut-être variables mais n'ont pas fait l'objet de cette étude.

Sur la modalité enherbée, 3,4 % de la quantité épandue est retrouvée dans les premiers centimètres du sol un mois après le second épandage. Le métalaxyl semble être assez rémanent dans les sols viticoles. Cette molécule est à cette date absente des horizons de prélèvements plus profonds (5-20 et 20-40 cm) ou à l'état de traces sous la limite de détection. L'enherbement pourrait retenir une partie de la dose de fongicide épandue au niveau de la zone racinaire. En effet, cet « effet tampon » du couvert végétal, déjà mis en évidence par **Lacas et al. (2005)**, pourrait favoriser l'infiltration de l'eau mais limiter l'entraînement vertical des molécules par un phénomène de rétention racinaire.

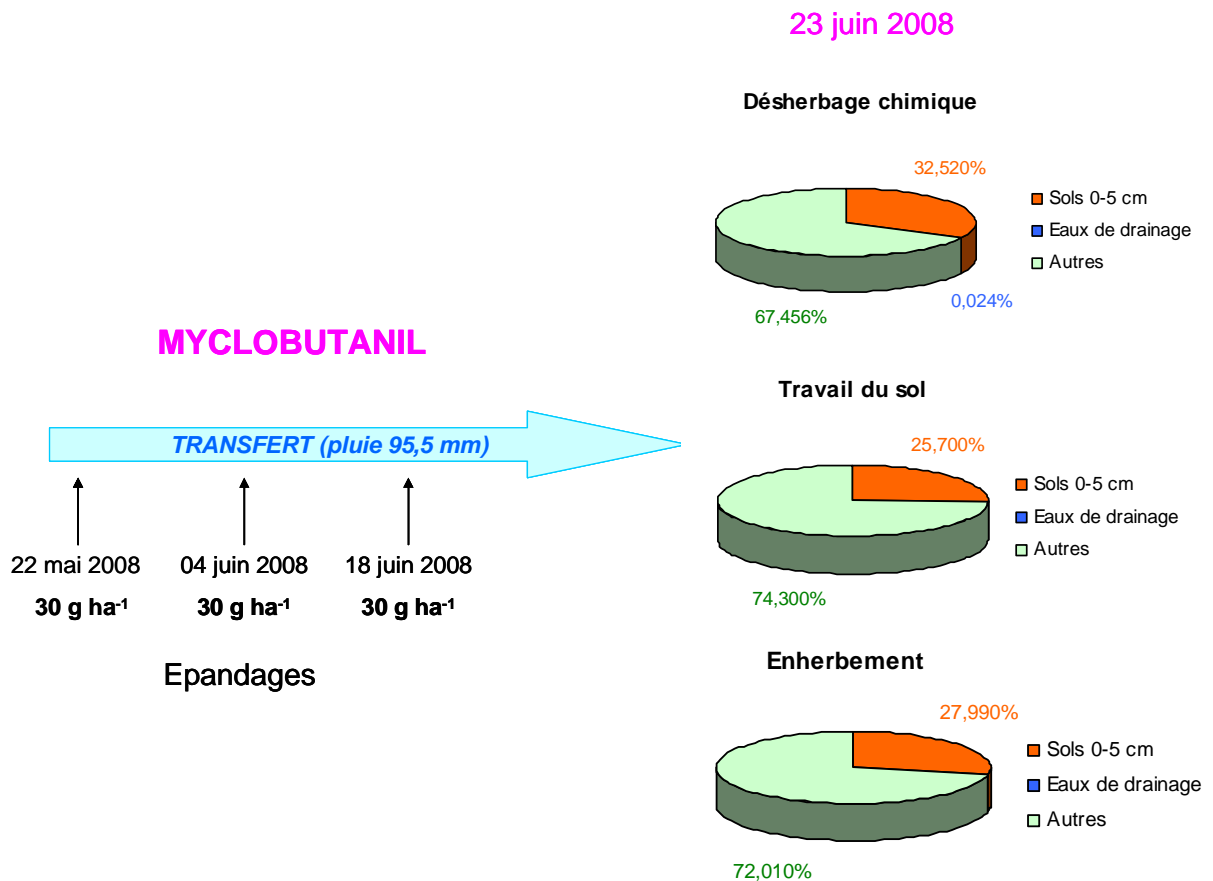


Figure 2.51 : Proportion de myclobutanil transférée vers le sol et les eaux d'infiltration par rapport aux quantités épandues en saison de drainage

Le second fongicide de notre étude, le **myclobutanil**, est retrouvé dans les sols (à une profondeur de 0-5 cm) en proportions équivalentes dans chacune des 3 modalités (Figure 2.51). En effet, le dernier épandage ayant eu lieu seulement 5 j avant le prélèvement des échantillons de sol, la majeure partie de la quantité appliquée est tombée au sol et de ce fait présente dans les premiers centimètres du sol. Toutefois, bien que le système de drainage ait fonctionné, la molécule n'est pas détectée dans les eaux d'infiltration (la pluie n'ayant peut-être pas été suffisamment « efficace » pour assurer ce transfert).

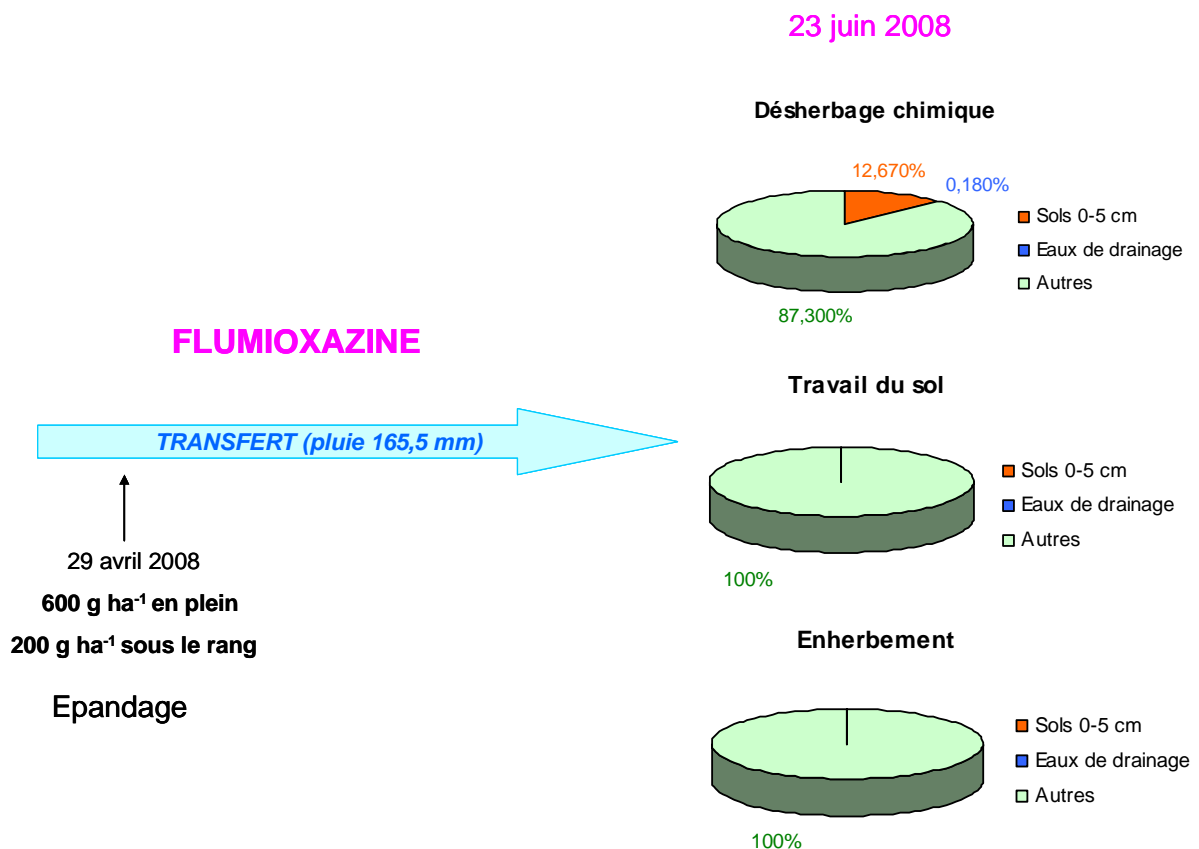


Figure 2.52 : Proportion de flumioxazine transférée vers le sol et les eaux d'infiltration par rapport aux quantités épandues en saison de drainage

La **flumioxazine** est un herbicide. Son application se fait donc directement sur le sol. En 2008, comme le souligne la Figure 2.52, le composé a été épandu le 29 avril, en plein sur la modalité désherbée chimiquement et uniquement sous le rang des autres modalités. 12,67 % de la quantité appliquée sont retrouvées dans les premiers centimètres du sol de la modalité désherbée intégralement chimiquement le 23 juin. Par ailleurs, l'herbicide n'est pas détecté après son épandage dans les prélèvements d'eau ni de sols des modalités travaillée et enherbée.

Quelle que soit la molécule considérée, la part exportée vers les eaux de drainage est faible (la valeur maximale retrouvée pour nos molécules est de 0,18%). **Voltz et Louchart (2001)** considèrent que la proportion de molécules actives entraînée par le drainage agricole atteint au maximum 3 % de la quantité épandue. **Boivin et al. (2003)** relatent dans leurs travaux des valeurs des parts exportées vers les eaux de drainage de 4,32 % à 0,176 % pour la bentazone et de 1,17 à 0,31 % pour l'isoproturon en fonction du type de sol, sur une culture de blé de printemps.

La plus grosse proportion des quantités épandues reste toutefois indétectable dans les matrices eau d'infiltration et sol (surface et profondeur) : il s'agit de la part appelé « **autres** » sur les figures. Nous pouvons penser que les pesticides subissent une dégradation physico-chimique ; une métabolisation par les microorganismes ou les populations macroscopiques du sol ; un entraînement horizontal par les eaux de ruissellement ; une adsorption sous forme de fraction non extractible du sol ; une dissipation dans l'atmosphère ou encore une absorption par la vigne et les adventices...

Le **folpel** et la **λ -cyhalothrine**, malgré leurs épandages durant la saison estivale et printanière ne sont pas retrouvés (ou à la limite de détection pour l'insecticide) dans les sols et les eaux de drainage. Au-delà de sa grande volatilité, le folpel se dégrade très vite (**Bermudez-Couso et al., 2007**) tandis que la λ -cyhalothrine pourrait rester fortement liée à la portion non extractible du sol. Dès lors, nous ne présentons pas de graphique évoquant la part de leur transfert.

De la même façon, le **flazasulfuron** n'a pas été épandu en 2008. Enfin, le **chlorpyrifos** est épandu chaque année à la fin du mois de juillet ; ainsi, le prélèvement du 23 juin 2008 ne nous permet pas de conclure quant à son transfert.

Toutefois, le fait de ne pas retrouver une molécule dans l'environnement ne signifie pas qu'elle n'est pas responsable d'une pollution. Les étapes de dégradation physico-chimique ou bactérienne conduisent à des métabolites souvent plus toxiques que la molécule-mère.

Cet exemple donne une idée de la part exportée de certaines molécules vers les eaux d'infiltration. Ces dispositifs nous permettent de comparer de façon réaliste, pour un contexte pédoclimatique donné et pour chacun des produits dans ses conditions habituelles d'utilisation en viticulture, le potentiel de contamination des eaux superficielles de chaque molécule. Toutefois, cet exemple ne peut pas, seul, servir de modèle à une évaluation du transfert. Il s'agit d'un cas d'étude particulier, correspondant à une analyse ponctuelle de la percolation des molécules à mi-campagne phytosanitaire. Il est à replacer dans le contexte d'un printemps pluvieux à la période des épandages, lorsque le sol est déjà saturé en eau. Par ailleurs, la réaction des sols de boubènes du Tarn à la pluie et de ce fait aux exportations des

molécules actives ne peut pas être généralisé à tous les terroirs. En effet, le type de sol influence beaucoup le transfert d'un pesticide donné vers les eaux de drainage (**Boivin et al., 2003**).

Résumé :

Le transfert vers les eaux d'infiltration ne représente qu'une faible part (de l'ordre de quelques centièmes de pourcentage) de la dose appliquée.

IMPACT DES PESTICIDES SUR LA POLLUTION DES SOLS EN RELATION AVEC LEUR ENTRETIEN : APPROCHE ECOTOXICOLOGIQUE

L'objectif de cette partie a été dans un premier temps de déterminer les protocoles à mettre en œuvre pour suivre l'impact des produits phytosanitaires et des pratiques culturales des inter-rangs en viticulture sur le fonctionnement biologique des sols. Après une approche microbiologique, l'impact sur les lombriciens est abordé selon deux thématiques : une expérimentation en laboratoire puis une étude de l'impact en champ. Enfin, les résultats seront présentés et discutés.

1 Matériels et méthodes

1.1 *Suivi de la biomasse microbienne*

Selon l'état du sol (pratique culturale, itinéraire phytosanitaire), la vie microbienne peut être plus ou moins favorisée. La comparaison de cette biomasse microbienne sur les différentes modalités d'entretien des sols pourra être un indicateur de l'effet de l'entretien du sol sur son fonctionnement biologique. Les pratiques culturales visant à augmenter le taux de matière organique dans le sol (exemple de l'enherbement) ont à priori tendance à accroître la biomasse microbienne.

Deux techniques sont envisagées pour mettre en évidence les variations de biomasse d'une modalité à l'autre : d'une part la mise en culture des microorganismes aérobies cultivables et le comptage des colonies et d'autre part, la mesure de la biomasse microbienne totale.

1.1.1 Mise en culture des microorganismes aérobies revivifiables

L'objectif de cette expérimentation est de mettre en évidence un effet de la pratique culturale sur le nombre de microorganismes aérobies revivifiables présents dans les 20 premiers centimètres du sol. Les microorganismes aérobies revivifiables ne constituent qu'une faible part de la diversité microbiologique des sols mais ils représentent la plus grande proportion de la biomasse des sols.

Chaque modalité ainsi que la bande enherbée témoin a fait l'objet de 5 prélèvements de sol par carottage à la tarière à une profondeur de 20 cm au niveau des inter-rangs (**McCarty et Meisinger, 1997**). Ces 5 prélèvements sont réalisés le même jour, selon un maillage systématique, comparable d'une modalité à l'autre. Dans chaque maille, le prélèvement est effectué au hasard. Ces 5 prélèvements sont ensuite « poolés » : mélangés dans un même récipient, ils sont alors homogénéisés en un seul échantillon composite de la modalité envisagée.

La mise en culture et le dénombrement des colonies ont été réalisés en collaboration avec le **Laboratoire départemental d'analyses du Tarn (Albi)**.

Le protocole expérimental débute par une pesée de 10 g de terre pour chaque modalité, mélangés ensuite à 90 mL d'une solution physiologique (dilution au dixième).

Cette solution est alors diluée en cascade jusqu'au 10 milliardième dans l'eau. Les extraits de sol dilués (dilutions -3 à -10) sont ensuite mis à incuber sur un milieu gélosé en boîte de Pétri.

Le milieu gélosé utilisé est un milieu « Plate Count Agar » (PCA) de gélose à l'extrait de levure. C'est un milieu ordinaire, sans inhibiteurs, le but étant de compter l'ensemble des bactéries capable de croître. Sa composition est donnée dans le tableau 3.1:

Tableau 3.1 : Composition du milieu gélosé PCA

Milieu gélosé PCA	
Tryptone	6 g
Extrait de levure déshydraté	3 g
Gélose en poudre	10 à 20 g (selon le pouvoir gélifiant souhaité)
Eau	1000 mL
pH 7,2 à 25°C à ajuster	

Le milieu de culture est acheté tout prêt et mis à fondre à 45°C puis coulé dans les boîtes de pétri en vue de l'ensemencement des extraits de sol dilués. La mise en culture se fait pendant 72 heures à 30°C. Ce choix de température favorise un développement rapide des microorganismes revivifiables sans inhiber la croissance des plus thermosensibles.

Après 72 heures, les colonies en présence sont comptées à l'œil nu par le même opérateur sur chaque dilution. On tient compte des boîtes de Pétri contenant un nombre de colonies compris entre 30 et 300.

1.1.2 Mesure de la biomasse microbienne totale

La mesure de biomasse la plus décrite dans la littérature et communément utilisée est la technique de « fumigation-extraction ». Cette méthode fut mise au point par **Vance et al., 1987**, adaptée ensuite par **Wu et al., 1990** pour des utilisations en routine. Elle est aujourd'hui largement décrite (**ISO, 1997 ; Carter et al., 1999**).

Cette technique d'évaluation de la biomasse totale a été confiée au **laboratoire d'analyse Celesta-Lab** situé à Mauguio et spécialisé dans l'étude des terrains viticoles.

Les mesures sont réalisées à partir d'un échantillonnage suggéré par le laboratoire d'analyse et par les travaux de **McCarty et Meisinger (1997)** : 3 échantillons de terre sont prélevés dans l'horizon de surface (20 cm de profondeur) pour chacune des modalités correspondant à une situation expérimentale donnée.

La méthode consiste ensuite à traiter le sol avec des vapeurs de chloroforme qui tuent la quasi-totalité des micro-organismes du sol. Leur contenu cellulaire se répand

dans le sol et le carbone organique correspondant peut alors en être extrait et mesuré. La différence de carbone organique soluble entre les échantillons non fumigés et les fumigés donne la quantité de carbone extractible d'origine microbienne. Cette quantité est directement proportionnelle à la biomasse. Le résultat de la mesure de la biomasse microbienne totale du sol pourra être exprimé en mg de C par kg de sol ou en pourcentage du carbone organique total du sol (**Fiche ITAB, Activité biologique des sols, 2003**). Cette méthode est applicable à tous les types de sol, et donne des résultats reproductibles.

1.2 Echantillonnage de lombriciens dans les sols

Dans le but de réaliser un dénombrement et une identification des vers présents sur la parcelle pour chacune des modalités d'entretien des sols, des échantillonnages sont réalisés.

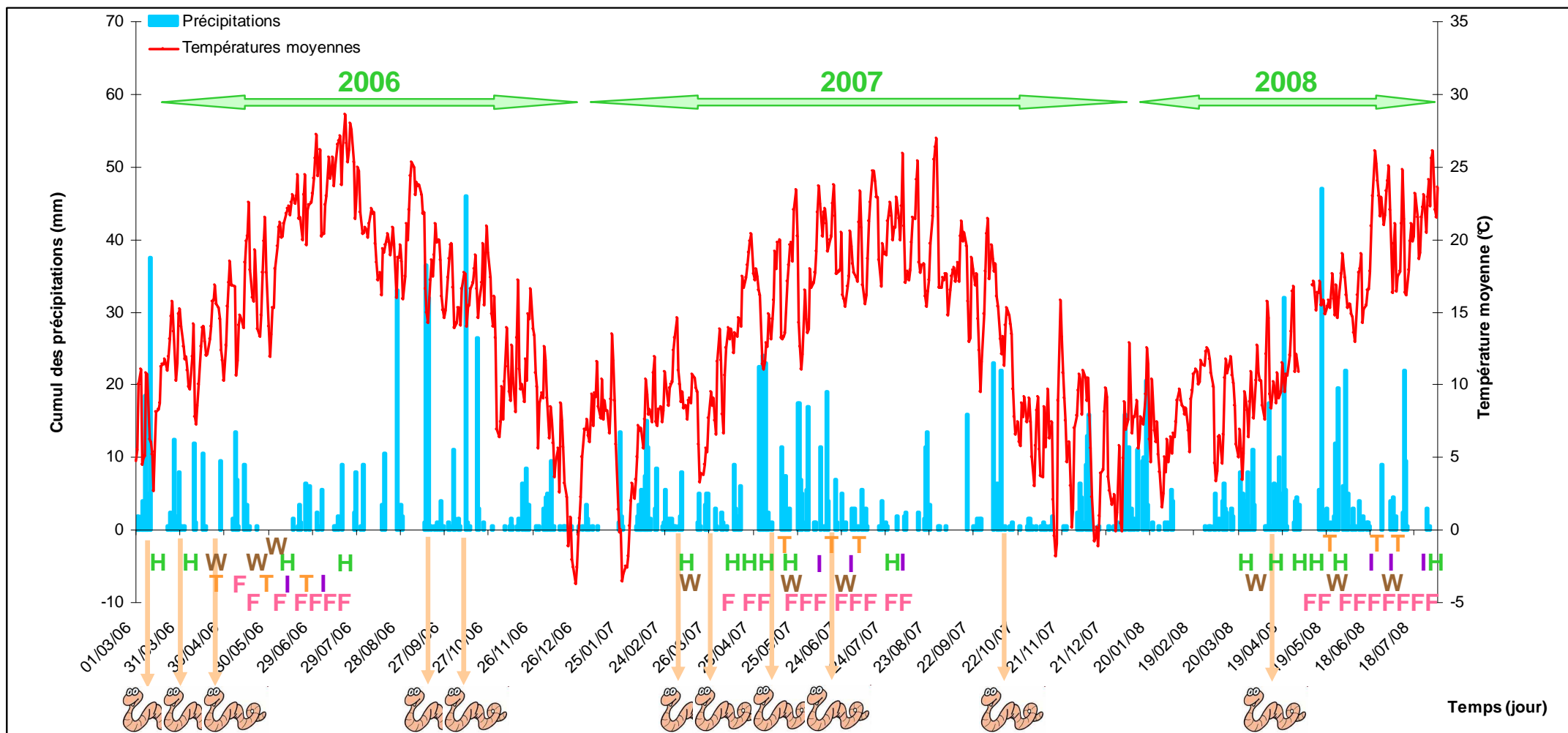
Deux types d'échantillonnage ont été réalisés dans le temps. Un échantillonnage qualifié de complet (10 points de prélèvement par modalité) visant à déterminer les genres en présence et à les dénombrer a été réalisé en octobre 2006 et en avril 2008.

Un échantillonnage plus restreint (seulement 3 points de prélèvement au hasard par type d'entretien du sol) est réalisé plus souvent dans le but d'identifier et de dénombrer les individus présents mais aussi dans l'objectif de réaliser un prélèvement de lombrics en vue d'une analyse écotoxicologique.

Les prélèvements de lombriciens sont réalisés selon le même plan expérimental que les échantillons de sol (systématique et au hasard), à chaque fois que les conditions expérimentales le permettent.

Onze prélèvements ont été réalisés au total durant les 3 années de l'expérimentation : 5 en 2006, 5 en 2007 et 1 au printemps 2008 (Figure 3.1). En 2006 et 2007, un prélèvement « témoin » a été réalisé en début de campagne, avant tout traitement phytosanitaire. Ensuite, les prélèvements ont été réalisés de façon ponctuelle au cours de chaque campagne, en fonction des conditions climatiques. En 2006, les prélèvements nécessaires au dénombrement et à l'identification des vers ainsi qu'aux suivis des biomarqueurs enzymatiques ont été réalisés essentiellement en début et fin de campagne phytosanitaire. En effet, en 2006, les conditions de


sécheresse de la période estivale ont rendu impossible les expérimentations sur les lombrics (difficultés à creuser les trous, lombrics en diapause ou enfouis en profondeur...). Les 2 premiers prélèvements permettent toutefois la mise en évidence d'un possible effet de l'épandage des herbicides tandis que les 2 prélèvements finaux représentent un bilan de la campagne phytosanitaire. Le prélèvement du 27 mars 2007 permet de suivre l'effet du travail du sol et du traitement herbicide de post-levée. Par ailleurs, les 2 collectes suivantes ont été réalisées en plein cœur de la saison d'épandage : elles favorisent ainsi l'étude d'un possible effet des insecticides et fongicides ainsi que des herbicides et du labour en fonction de la modalité. Ces prélèvements sont complétés par un bilan effectué en octobre. Enfin, en 2008, au vue des données collectées les années précédentes, un seul prélèvement a été réalisé. Son objectif est essentiellement un comptage des genres de vers en présence pour une étude de la dynamique de population.



Légende : H herbicides en plein sur la modalité désherbée et sur le rang des autres

W travail du sol sur l'inter-rang de la modalité labourée

F fongicides sur les rangs (toutes les modalités)

 prélèvement de lombrics

T tonte de l'inter-rang des modalités enherbées (boulbènes et graves)

I insecticides sur les rangs (toutes les modalités)

Figure 3.1 : Positionnement dans le temps des prélèvements de lombrics par rapport aux traitements phytosanitaires de la parcelle et au climat (température et pluviométrie).

L'échantillonnage du sol en vue de l'extraction des lombrics a fait l'objet de multiples publications au cours des 10 dernières années (**Fiedler, 1997; Coleman et al., 1999 ; ISO, 2004 ; Römcke et al., 2005**).

Comme les rangs et inter-rangs ne subissent pas les mêmes traitements, un double échantillonnage est réalisé à chacune des dates de prélèvement.

Différentes techniques de prélèvement ont pu être testées :

- une **extraction au formol** dilué à 0.5% (25 mL de formol (37%) dans 5 L d'eau) est réalisée d'après le protocole décrit par **Römcke et al., 2005**. Cette opération d'extraction est répétée 4 fois (consommant ainsi 20 L d'eau). Les lombrics sortent de la terre et sont récupérés durant les lavages et durant les 30 min qui suivent le dernier volume de solution ajouté. Toutefois, le formol est toxique et pourrait être à l'origine d'une perturbation induisant un biais de l'analyse écotoxicologique ultérieure des lombrics. Par ailleurs cette méthode consomme une grande quantité d'eau, difficile à apporter sur la parcelle viticole, et qui s'infiltre très laborieusement dans un sol très sec et argileux durant la période estivale où ont lieu certains des prélèvements.
- Une **extraction à la moutarde** (**Lawrence et al., 2002**) qui s'avère très urticante pour les vers suite à sa pénétration par le tégument de ces invertébrés. Elle entraîne ainsi une remontée des vers à la surface du sol. Toutefois cette méthode a du être abandonnée pour les mêmes raisons que la technique utilisant le formol. Par ailleurs elle est souvent controversée et se montre parfois inappropriée (**Bartlett et al., 2006**).
- Une **extraction par tri manuel des mottes de terre** (**Reinecke et Reinecke, 2007**). Cette méthode de prélèvement par tri manuel reste la plus fiable, facile à mettre en œuvre et reproductible. C'est donc cette méthode que nous avons choisie pour notre étude.

La méthode du tri manuel du sol s'avère être également la moins perturbante pour les vers. Il s'agit toutefois de faire attention à ne pas « abîmer » les vers lors de leur extraction des mottes de terre (Figure 3.2).

Une buse est placée sur le sol de façon à délimiter un diamètre d'échantillonnage de 30 cm puis un trou est creusé jusqu'à 25 cm de profondeur.

Pour les prélèvements de plus grande envergure (10 points par modalités), des trous d'une surface d'un m² et de 25 cm de profondeur sont réalisés.



Figure 3.2 : Extraction de la terre et tri manuel du sol



Figure 3.3 : Extraction de la terre et isolement des lombriciens après émiettement des mottes de terre

La terre est retournée sur une bâche et chaque motte émietlée afin d'en extraire la totalité des lombriciens présents. Ceux-ci sont alors récupérés dans une boîte en plastique remplie ensuite de terre (Figure 3.3).

Les vers vivants sont pesés au laboratoire juste après leur extraction (poids total de l'ensemble des vers d'un même échantillonnage). Les lombrics sont ensuite mis à jeûner durant 2 à 3 jours dans une chambre à +14°C, et à l'obscurité puis à nouveau

pesés mais de façon individuelle et répertoriés (genre, aspect) avant d'être congelés à -80°C (Figure 3.4).

L'identification des lombrics a fait l'objet d'une étude approfondie menée avec l'aide de 2 spécialistes : **Narcisse Giani** (Professeur des Universités, Toulouse) et **Yvan Capowiez** (Chercheur INRA - Ecologie des Invertébrés, Laboratoire de Toxicologie Environnementale, Avignon). Les genres et espèces les plus caractéristiques ont été identifiés vivants ou après conservation de quelques jours dans du formol (4%). L'identification s'est basée sur des critères de morphologie (**Bouché, 1972**).



Figure 3.4 : Les étapes du traitement des vers en laboratoire après la phase de jeûne : identification, pesée et congélation à - 80°C dans des tubes annotés en attendant l'analyse biomarqueurs

Les prélèvements de l'automne 2006 et du printemps 2008 correspondant à une multiplication des répétitions (10 points au lieu de 3 par modalité) ont été réalisés dans l'objectif de permettre une quantification de la variabilité spatiale naturelle des populations sur la parcelle.

1.3 Expérimentation en conditions contrôlées

Les effets nocifs des molécules actives sur les populations lombriciennes du vignoble peuvent être évalués par différents paramètres. L'utilisation de biomarqueurs est désormais une référence (**Lukkari et al., 2004**) pour l'évaluation des effets neurotoxiques et des processus de métabolisation et détoxification. Afin d'évaluer l'impact des molécules utilisées au vignoble sur les lombriciens, une étude préalable a été réalisée en conditions contrôlées.

1.3.1 Principe et objectifs

Une expérimentation en conditions contrôlées a donc été mise en place afin d'évaluer l'impact des molécules utilisées dans le vignoble sur les lombriciens. Des vers sont exposés durant 34 jours aux molécules actives (insecticides et fongicides en cocktail) à des concentrations environnementales proches de celles appliquées sur la parcelle.

L'objectif de cette expérimentation est alors de mettre en évidence un possible effet neurotoxique des pesticides sur les vers par le suivi de l'activité cholinestérase (ChE, biomarqueur d'exposition aux polluants). D'autre part elle permet de suivre, par des biomarqueurs de la voie de biotransformation des molécules, la métabolisation des toxiques (activité glutathion-S-transférase GST) et la prise en charge des radicaux libres issus de la biotransformation (activité catalase CAT). Les activités de ces 3 biomarqueurs sont mesurées après 3, 7 et 14 jours d'exposition sur 10 vers par condition expérimentale.

Un dernier axe vise à étudier la potentielle détoxification du sol par les populations de lombriciens en suivant les concentrations en molécules actives présentes dans des terraria en présence ou absence de vers de terre.

Le suivi des populations de la parcelle au cours de cet essai apporte une dimension appliquée au travail expérimental réalisé au laboratoire.

1.3.2 Matériels et méthodes

Matériel biologique

Les vers *Aporrectodea caliginosa nocturna* sont prélevés sur une prairie non traitée chimiquement depuis plusieurs années. Après le prélèvement, ils sont mis à jeûner durant 4 jours sur du papier absorbant maintenu humide, dans une chambre froide (13°C, obscurité). Durant cette période, les vers vidant leur tube digestif et sont alors prêts à être mis en expérimentation.

La terre est prélevée dans la zone « témoin » non contaminée de la parcelle expérimentale du DEVT. Après séchage durant une semaine, 6 kg de terre bien effritée sont introduits dans chacun des terraria de l'étude. 50 vers par terrarium sont nécessaires à la conduite de l'expérimentation et un ver nécessite 100 g de terre pour survivre durant un mois, il faut donc au moins 5 kg de terre par terrarium de 50 vers (**Capowiez**, communication personnelle)

Protocole de contamination

Pour chacun des terraria, la terre est réhumidifiée avec 600 mL (V_{solution} en mL = 10 % M_{terre} en kg) de solution contaminée ou d'eau et solvants de dissolution (témoin). Cette contamination se fait dans un grand bac, afin de bien malaxer et mélanger la terre avec la solution, pour garantir une homogénéité de la contamination dans le terrarium.

Au total, l'expérimentation compte 12 terraria. Il s'agit de 6 modalités correspondant chacune à 2 terraria identiques pour faciliter la mise en œuvre de l'expérimentation.

Sur la parcelle, les pesticides (fongicides et insecticides) sont appliqués directement sur les feuilles de la vigne (la dose appliquée est donnée en g ha^{-1}). Dans le cas de notre contamination en terrarium, nous avons considéré que la totalité de ce qui est appliqué par ha tombait au sol. La dose appliquée prend pour référence la surface de dessus du terrarium, mais le traitement est ensuite homogénéisé à toute la terre du terrarium afin d'avoir des conditions homogènes.

Dès lors, les expositions sont maximisées par rapport à la réalité de la parcelle. Il s'agit en effet d'une extrapolation de la « réalité » même si les doses employées restent des doses homologuées.

Les modalités sont les suivantes :

- Terraria 1 et 2 : **bacs témoins** (6 kg de terre humidifiée par 600 mL d'eau distillée)
- Terraria 3 et 4 : bacs contaminés par une solution d'insecticides en mélange : **chlorpyrifos + λ -cyhalothrine à la dose appliquée pour un traitement** sur la parcelle
- Terraria 5 et 6 : bacs contaminés par une solution d'insecticides en mélange : **chlorpyrifos + λ -cyhalothrine à la dose maximale** appliquée (= somme de tous les traitements insecticides appliqués au cours d'une campagne phytosanitaire)
- Terraria 7 et 8 : bacs contaminés par une solution de fongicides en mélange : **folpel + myclobutanil + métalaxyl-M + fosétyl-aluminium à la dose appliquée pour un traitement** sur la parcelle
- Terraria 9 et 10 : bacs contaminés par une solution de fongicides en mélange : **folpel + myclobutanil + métalaxyl-M + fosétyl-aluminium à la dose maximale appliquée** (= somme de tous les traitements fongicides appliqués au cours d'une campagne phytosanitaire)
- Terraria 11 et 12 : bacs contaminés par une solution d'insecticides et de fongicides en mélange : **chlorpyrifos + λ -cyhalothrine + folpel + myclobutanil + métalaxyl-M + fosétyl-aluminium à la dose maximale** appliquée (= somme de tous les traitements appliqués au cours d'une campagne phytosanitaire)

Un terrarium supplémentaire (13) est dédié à l'étude de la détoxification potentielle des sols par les lombrics. Il s'agit d'un terrarium identique aux 2 précédents mais dans lequel aucun ver n'est introduit afin de suivre le devenir des molécules actives en absence de lombrics.

Cette expérimentation de contamination en laboratoire est réalisée avec les produits phytosanitaires utilisés en molécules pures (pureté > 98%).

Tableau 3.2 : Doses (en mg) de molécules actives introduites dans les 6 kg de terre des terraria

Pesticide	Dose par traitement sur parcelle (g/ha)	Dose maximale sur parcelle (g/ha)	Dose par traitement en $\mu\text{g kg}^{-1}$ de sol en terrarium	Dose maximale en $\mu\text{g kg}^{-1}$ de sol en terrarium
Chlorpyrifos-éthyl	200	200	0,168	0,168
λ -cyhalothrine	12,5	25	0,010	0,020
Folpel	960	1920	0,805	1,610
Myclobutanil	30	60	0,025	0,050
Métalaxyl	116,4	232,8	0,098	0,196
Fosétyl-aluminium	1400	6300	1,175	5,288

Des solutions stocks concentrées de pesticides (Tableau 3.2) sont alors préparées pour les besoins de l'expérimentation dans un mélange acétone-éthanol afin de faciliter la solubilité de tous les produits phytosanitaires (lipophiles et polaires). Ces solutions stock sont ensuite diluées dans un volume de 600 mL d'eau en vue de la contamination du sol du terrarium.

Les mêmes quantités de solvant organique sont ajoutées dans tous les terraria, y compris les témoins afin de ne pas créer un biais ou un stress dû à une plus grande quantité de solvant dans un des bacs. Ces volumes restent négligeables (1 mL dans 600 mL d'eau).

Les terraria sont placés en conditions contrôlées : 13°C, obscurité. Les vers ayant jeûné 4 jours sont placés en surface (Figure 3.5). Ils s'enfouissent ensuite dans la terre. L'humidité des terraria est régulée pour éviter un dessèchement des bacs (vaporisation d'eau distillée en surface).



Figure 3.5 : Expérimentation de contamination de lombriciens en conditions contrôlées

L'expérimentation s'étale ainsi sur 34 jours.

Chaque jour, les vers morts en surface sont comptés et enlevés. La même opération est effectuée au moment des prélèvements mais sur tout le volume de terre.

L'activité des vers est surveillée par l'observation des individus (vivacité, mobilité, entrée en diapause, taux de mortalité...) mais aussi de l'état des terraria (galeries, trous, tassement de la terre).

Des prélèvements de lombrics sont effectués régulièrement au cours de l'expérimentation afin d'analyser par la suite d'une part la concentration en pesticides dans ces organismes et d'autre part, les activités enzymatiques des biomarqueurs suivis :

- à $t=0$: congélation de 10 vers après le jeûne ; mise en conditions contrôlées en terrarium des autres lombriciens
- à $t = 3$ jours
- à $t = 7$ jours
- à $t = 14$ jours
- à $t = 34$ jours

Huit vers sont prélevés dans chacune des 2 répétitions de chaque modalité : 3+3 font l'objet d'une étude chimique (analyse des teneurs en pesticides) et 5+5 font l'objet d'une étude écotoxicologique (tests biomarqueurs) (Figure 3.6).



Figure 3.6 : Prélèvement des lombriciens par tri manuel de la terre

Une fois prélevés, les vers (exposés et témoins) sont placés durant 2 jours (**Reinecke and Reinecke, 2007**) en chambre froide sur du papier absorbant (pour une étape de jeûne) afin qu'ils vident leur tube digestif de la terre, ce qui rend d'une part le broyage plus facile et qui enlève tout pesticide contenu dans la terre (élimination du biais terre pour le dosage des produits phytosanitaires accumulés dans le corps des lombrics). Après cette période de jeûne, les vers sont congelés à -80°C en attendant leur analyse chimique ou biochimique (Figure 3.7).



Figure 3.7 : Congélation individuelle des vers après le jeûne

1.4 Suivi écotoxicologique : dosages des activités enzymatiques

Les protocoles de dosage des activités enzymatiques ont été établis à partir de méthodologies décrites dans la littérature sur des invertébrés marins (**Bocquené et al., 1990 ; Geret et al., 2002 ; Roméo et al., 2006**) ou des lombrics (**Saint-Denis et al., 1998 ; Ribera et al., 2001 Brown et al., 2004**).

1.4.1 Mise au point du protocole d'extraction protéique

La première étape du dosage nécessite un broyage individuel des lombrics dans un tampon d'extraction des protéines. L'un des premiers travaux réalisés dans cette étude a donc été la mise au point et la validation de l'efficacité d'un tampon permettant en un seul broyage d'extraire les enzymes d'intérêt et de les conserver dans des conditions favorables en vue de leur dosage ultérieur.

Ces travaux ont donné lieu à la rédaction d'un article accepté pour publication dans *Ecotoxicology and Environmental Safety* :

Schreck E, Geret F, Gontier L, Treilhou M, 2008. ChE, GST, CAT: Evaluation of the efficiency of a combined buffer for protein extraction.

Ce protocole est réalisé sur des vers congelés à -80°C après une période de jeûne. Le ver à broyer est sorti du congélateur (-80°C) et immédiatement placé dans la glace. Son poids est noté (en g) : P_{ver} .

Le broyage du ver se fait alors dans le tampon mixte d'homogénéisation (Tm) supplémenté d'un cocktail inhibiteur de protéases (Tableau 3.3) dont les volumes sont proportionnels au poids du ver.

Tableau 3.3 : Composition du tampon mixte d'homogénéisation (pour 500 mL d'eau distillée)

Tampon Mixte d'homogénéisation (500 mL)	
NaCl 0,15 mol L ⁻¹	4,38 g
Tris 0,05 mol L ⁻¹	3,027 g
Sucrose 0,3 mol L ⁻¹	51,35 g
EDTA 1 mmol L ⁻¹	0,19 g
NaH ₂ PO ₄ 0,02 mol L ⁻¹	1,2 g
0,1 % Triton X100	500 µL
Eau distillée	QSP 500 mL

Le **pH** du Tm est abaissé à **7,2** par ajout de quelques gouttes de HCl concentré 37 %. Ces quelques gouttes sont sans effet significatif sur la molarité.

Calcul du volume de Tm et de cocktail inhibiteur de protéases à ajouter :

$$V_{Tm} \text{ (en mL)} = 3 \times P_{\text{ver}} \text{ (en g)}$$

$$V_{\text{cocktail}} \text{ (en } \mu\text{L)} = 30 \times P_{\text{ver}} \text{ (en g)}$$

Le broyage du ver (préalablement coupé en morceaux) est réalisé avec un homogénéiseur Polytron PT 1300D (Kinematica, Bioblock, France) à 12000 rpm, durant 1 min environ dans la glace. Toute l'expérimentation doit se dérouler dans la glace afin de ne pas dénaturer les enzymes.

Le broyat est ensuite **séparé en 3 fractions de volume identique** (dans des tubes eppendorfs) :

- 1 fraction GST dans laquelle est **ajouté le dithiothréitol DTT 100 mmol L⁻¹** (dénaturation, rupture des ponts disulfures) à 100 mmol L⁻¹

$$V_{DTT} \text{ (en } \mu\text{L)} = 10 \times V_{GST} \text{ (en mL)}$$

- 1 fraction ChE
- 1 fraction CAT dans laquelle est **ajoutée 0,4 % du détergent triton X100** à laisser agir pendant 20 min puis à passer à la **sonication pendant 10 min** (bain ultra-sons).

Une étape de **centrifugation (9000 g, 25 min, 4°C)** permet la récupération des surnageants de chaque fraction.

Le surnageant de la fraction GST doit être conservé à 4 °C : l'enzyme est en effet dégradée par la congélation. Les surnageants ChE et CAT peuvent eux être congelés à -80°C.

L'efficacité de ce protocole a ensuite été évaluée sur 10 vers et comparée à celle des tampons spécifiques de chacune des enzymes suivies.

Les résultats de cette expérimentation (**Schreck *et al.*, article accepté**) montrent que l'efficacité de ce tampon mixte est comparable à celle d'un tampon spécifique en ce qui concerne l'extraction des enzymes de notre étude (CAT, GST et ChE). Son utilisation permet ainsi un gain de temps et une économie du matériel biologique considérables puisqu'en un seul broyage du ver de terre, il est possible de récupérer simultanément les protéines et de procéder ensuite au dosage individuel de chaque enzyme. Les activités enzymatiques dosées sont identiques que l'on utilise ce tampon d'homogénéisation mixte ou un tampon spécifique à l'enzyme d'intérêt. C'est donc ce protocole qui a été utilisé tout au long de cette étude.

Article accepté pour publication dans *Ecotoxicology and Environmental Safety*

ChE, GST and CAT: Evaluation of the efficiency of a combined buffer for protein extraction

E. Schreck^{1,2}, F. Geret¹, L. Gontier², M. Treilhou¹

¹ Laboratoire Chimie et Biochimie des Interactions, Université de Toulouse - Centre universitaire JF Champollion, Place de Verdun, 81012 Albi, France

² IFV France - ITV-ENTAV - Station régionale Midi-Pyrénées, V'innopôle, BP 22, 81310 Lisle sur Tarn, France

ABSTRACT

Toxicity and biotransformation of several earthworm contaminants are widely evaluated nowadays using biochemical biomarkers. Many investigations track enzyme activities as biomarkers of neurotoxicity (cholinesterase (ChE)), metabolism (glutathione-S-transferase (GST)) and oxidative stress (catalase (CAT)). This study proposes an evaluation of the use of a combined buffer, to extract proteins from earthworms and then analyse the 3 biomarkers. The method provides good results and allows protein extraction and quantitative determination of biomarkers with the same efficiency as the enzyme specific buffers. It decreases preparation time and permits a study of the biomarkers on the same individual with only one homogenisation.

Key Words Protein extraction; Combined buffer; Earthworm homogenisation; Biomarkers; Cholinesterase; Glutathione-S-transferase; Catalase

INTRODUCTION

It is widely accepted that contaminants such as pesticides, heavy metals, pharmaceutical drugs and endocrine disruptors pose severe risks and damage the environment (Committee on Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments 2003). Invertebrates such as earthworms play a key role (Römbke et al., 2005) in the soil ecosystem; impact on soil structure, decomposition activity, nutrient mineralization. They are naturally in contact with the solid and aqueous soil phases, ingest large amounts of soil and are therefore exposed to contaminants.

Toxicity and harmfulness of pollutants to earthworms can be evaluated using a variety of biological parameters. The use of biochemical biomarkers to investigate the contaminant neurotoxicity or metabolism and detoxification in earthworms is nowadays becoming current practice (Brown et al., 2004; Lukkari et al., 2004; Denoyelle et al., 2007; Reinecke and Reinecke 2007). Cholinesterase activity inhibition is studied as a biomarker for pollutant exposure (Denoyelle et al., 2007; Reinecke and Reinecke 2007) and allows identification of a neurotoxic effect. The metabolism of pollutants is often investigated in order to determine the biotransformation process and discover a potential role of earthworms in soil detoxication. For this, two enzymes were studied: GST, involved in the phase II metabolism process (Lukkari et al., 2004) and CAT, an antioxidant enzyme that takes part indirectly in the contaminant metabolism by targeting reactive oxygen species H₂O₂ (Brown et al., 2004). Ribera et al. (2001) also studied these 2 enzymes

in the earthworm *Eisenia fetida andrei* because the pollutants might affect either the biotransformation or oxidative stress defence systems.

Therefore, studies focusing on several biomarkers analysed collectively are becoming current practice, and some use a homogenisation buffer in order to extract all the proteins for biomarker analysis, simultaneously (Saint-Denis et al., 1998; Ribera et al., 2001; Geret et al., 2002; Brown et al., 2004). Thus, this paper focuses on a new combined buffer and its use in extracting the enzymes ChE, GST and CAT, widely studied as biomarkers. We propose an evaluation of the efficiency of this combined buffer by comparing it with the use of separate, biomarker specific buffers.

MATERIALS AND METHODS

All the solvents and reagents (dithiothreitol (DTT), triton X100, dithiobisnitrobenzoate (DTNB), acetylthiocholine, protease inhibitor cocktail, reduced glutathione (GSH), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), hydrogen peroxide (H₂O₂), Bradford reagent and bovine serum albumin) were purchased from Sigma-Aldrich Chimie S.A.R.L. (Saint Quentin-Fallavier, France).

The earthworms used for the experiment were *Aporrectodea caliginosa nocturna*. They were adults with a similar size (14.8 ± 1.6 cm). They were collected in autumn from an untreated meadow in the Gaillac vineyard area (South West France). Before experimental analysis, all invertebrates were conserved at -80 °C.

The aim of the study was to evaluate the efficiency of a combined buffer for protein extraction and biochemical responses (activity), compared with using a specific buffer for each enzyme. The combined buffer was made up using the composition of the 3 target enzyme specific buffers, and Table 1 gives these constituents.

Table 1. Composition of the different buffers for protein extraction and biomarker analysis.

Homogenisation buffer (in distilled water)			
CAT buffer	GST buffer	ChE buffer	Combined buffer
pH 7.4	pH 7.4	pH 7	pH 7.2
TRIS 50 mmol L ⁻¹ Sucrose 0.3 mol L ⁻¹ EDTA 1 mmol L ⁻¹	TRIS 50 mmol L ⁻¹ NaCl 0.15 mol L ⁻¹	NaH ₂ PO ₄ 0.02 mol L ⁻¹ triton X100 0.1%	TRIS 50 mmol L ⁻¹ NaCl 0.15 mol L ⁻¹ Sucrose 0.3 mol L ⁻¹ EDTA 1 mmol L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ 0.02 mol L ⁻¹ triton X100 0.1%
<i>Geret et al., 2002</i>	<i>Roméo et al., 2006</i>	<i>Bocquené et al., 1990</i>	

Ten earthworms were treated using the same experimental protocol. Each invertebrate was cut into fragments and separated into 4 homogenous fractions. Each fraction was homogenised with one of the different buffers (ChE buffer, GST buffer, CAT buffer, combined buffer). Figure 1 gives an overview of the experimental protocol set up to evaluate the efficiency of the combined buffer. Homogenisation was performed using a Polytron PT 1300D homogenizer (Kinematica, Bioblock, France) (12000 rpm, 4°C), and after centrifugation, the supernatants were collected from each fraction in order to determine specific activities of the different biomarkers and quantify protein extraction.

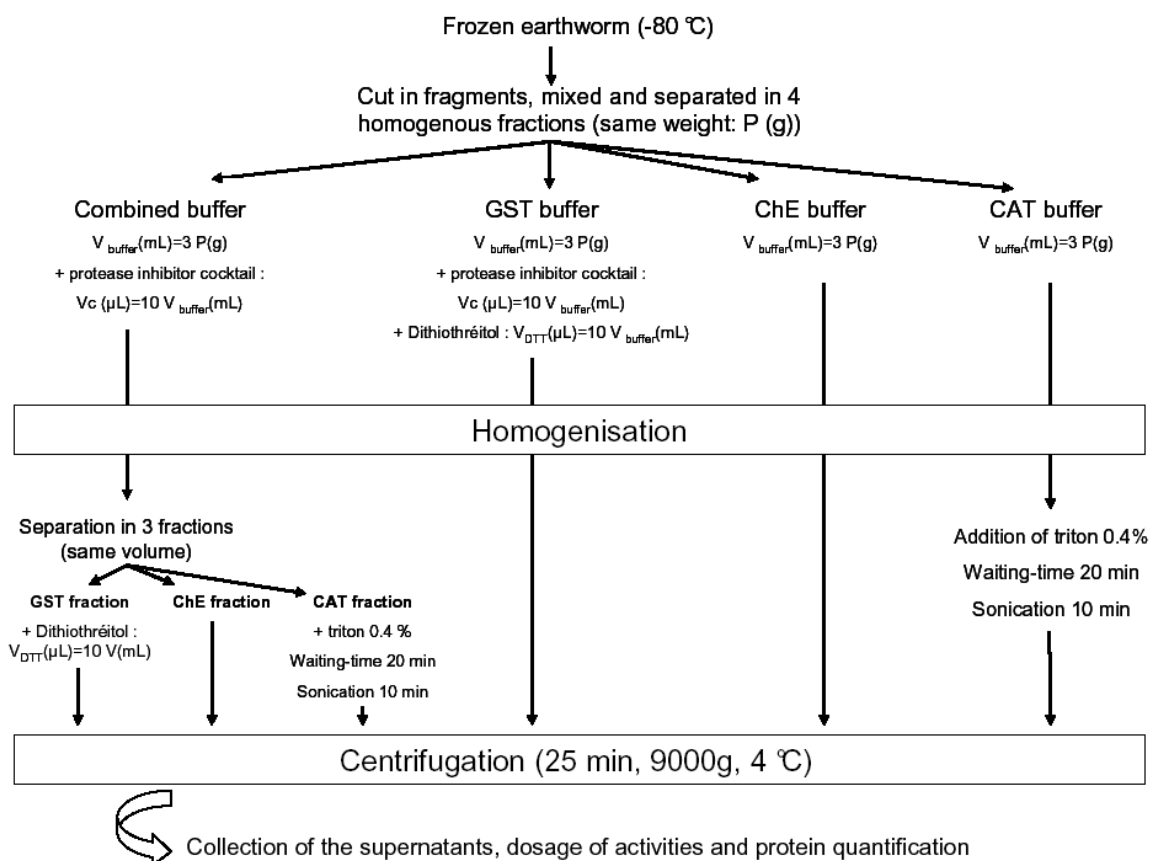


Figure 1. Overview of the experimental protocol for evaluation of combined buffer efficiency.

A test was made in order to check the effect of freezing on enzyme activity results. Each supernatant was separated into 2 fractions, one analysed directly (at 4 °C), and the other kept at -80 °C for one week before analysis.

ChE activity was measured using the method described by Ellman et al. (1961). Acetylthiocholine iodide was used as substrate and DTNB as chromogen, and activity was studied spectrophotometrically at 412 nm. In each spectrophotometer cuvette, were added successively 680 μL of phosphate buffer (0.02 mol L⁻¹, pH 7, Triton X100 0.1 %), 40 μL of DTNB (0.01 mol L⁻¹), 20 μL of earthworm homogenate and 20 μL of acetylthiocholine to start the enzymatic reaction. Rather than follow the enzyme progress curve, this analyse of enzyme kinetic follow the initial velocity of the enzyme reaction during 30 s by studying the variation of optical density (OD) with the spectrophotometer.

Glutathione-S-transferase activity was measured using the method described by Habig et al. (1974) with CDNB as substrate for spectrophotometrical measurement at 340 nm and 37°C. In each UV cuvette, were added successively 840 μL of phosphate buffer (0.1 mol L⁻¹, pH 6.5), 50 μL of CDNB (20 mmol L⁻¹), 10 μL of earthworm supernatant and 100 μL of glutathion. The OD variation was followed during 30s.

Catalase activity was determined by measuring the rate of hydrogen peroxide reduction at 240 nm (Saint-Denis et al., 1998), during 30 s. Actually, the UV cuvette were filled up by 990 μL of phosphate buffer (0.1 mol L⁻¹, pH 7.5), 10 μL of earthworm homogenate and 500 μL of H₂O₂ (0.5 %).

For each enzyme activity, a blank was performed for spectrophotometer calibration (without the earthworm homogenates). The OD variation of blank was measured to evaluate the spontaneous reaction. Actually, in each reaction, there is negligible creation of product without enzyme. All the measurements of OD variations were done in triplicate for each earthworm sample and each blank.

Total protein contents in the different fractions were determined using the Bradford method (Bradford, 1976). The Bradford assay relies on the binding of the dye Coomassie Blue G-250 to protein at 595 nm. The increase of absorbance at 595 nm is proportional to the amount of bound dye, and thus to the amount (concentration) of protein present in the sample. A dilution of the tissue samples was necessary before analysis (1:100). Thus, the quantity of protein can be estimated in the earthworm homogenate by comparison with a standard solution of bovine serum albumin (BSA). The enzyme activities were expressed as $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of proteins. All measurements were made in triplicate.

All values for specific activities and protein concentrations are the means of 10 replicates \pm SD. Values measured in the combined buffer fractions were compared with the values obtained for each specific buffer. The statistical difference between the specific buffer and the combined buffer was tested using the Wilcoxon test; $P < 0.05$ was accepted as significant (SPSS program (standard version 11.0, SPSS Inc.)). Tests for data normality and analyses of variance were carried out beforehand.

RESULTS

Total protein content in each supernatant was assessed in order to evaluate the enzyme extraction efficiency of each buffer. Figure 2 shows the protein concentration in each earthworm homogenate, and we can see that there is no significant difference between the combined buffer and the enzyme specific ones (Table 2).

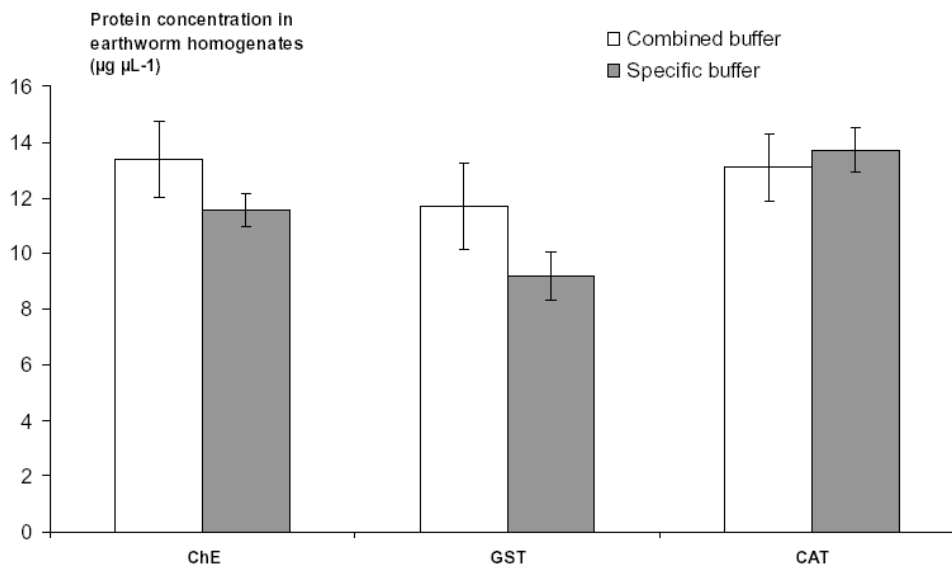


Figure 2. Comparison of buffer efficiency in protein extraction. Bars are the mean of ten replicates (\pm SD). Data are not significantly different at $P < 0.05$ (Wilcoxon Test, SPSS Program).

The specific activities of ChE, GST and CAT were determined for each earthworm in the respective supernatants obtained by the combined buffer and the specific one. Enzymatic kinetic was followed with the OD variation (δOD) during the 30 first seconds of the reaction (initial velocity). The Figure 3 gives an overall picture of the spectrophotometrical kinetic of the 3 enzymes extracted from the same earthworm with the combined buffer. Kinetic measures done in triplicate were reproducible and good R^2 values were obtained (Figure 3).

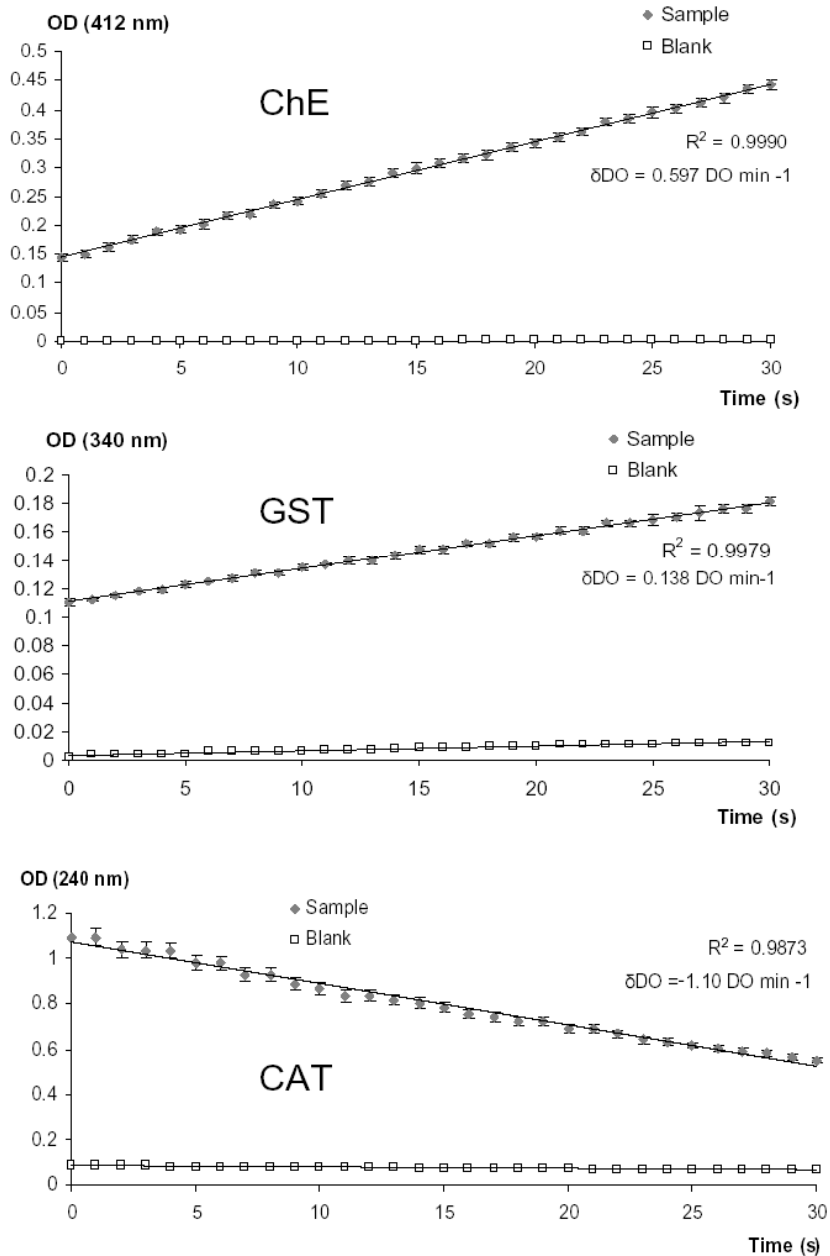


Figure 3. Spectrophotometrical kinetic of the 3 enzymes (Cholinesterase: ChE, Glutathion-S-transferase: GST and Catalase: CAT) extracted from the same earthworm with the combined buffer.

Table 2. Results of the Wilcoxon test for specific activities and protein concentrations.

Wilcoxon Test	Protein Extraction			Specific Activity		
	ChE	GST	CAT	ChE	GST	CAT
p-value	0.386	0.114	0.508	0.285	0.646	0.169
Combined buffer - Specific buffer						

CAT and ChE supernatants were not affected by storing at -80 °C before analysis, whereas the GST supernatant needed to be analyzed directly. Results of the freezing tests are not presented here, but they clearly show a decrease in the GST activity result when the supernatants are stored at -80 °C for one week (with the 2 homogenisation buffers).

Figure 4 gives a comparison of the enzyme activity results with the 2 buffers. There was no significant difference: for each enzyme, the mean value of activity does not differ according to the homogenisation buffer (Wilcoxon test, $P > 0.05$, Table 2).

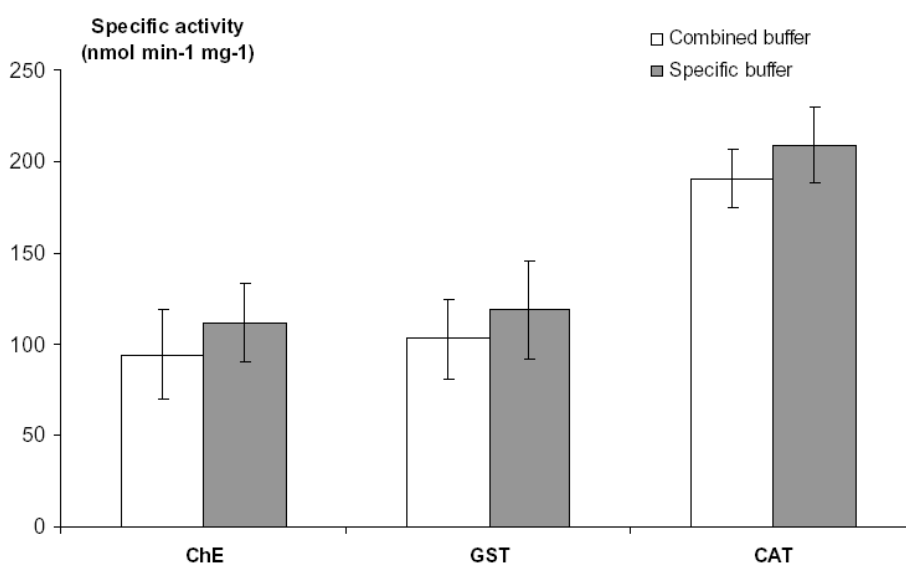


Figure 4. Influence of the buffer in determination of specific enzyme activities. Bars are the mean of ten replicates (\pm SD). Data are not significantly different at $P < 0.05$ (Wilcoxon Test, SPSS Program).

DISCUSSION

First of all, the use of a specific homogenisation buffer for the simultaneous extraction of the 3 targeted proteins cannot be seriously considered because the enzyme activities may be dramatically changed by the interaction with the buffer components. For example, the DTT used in the GST specific buffer contains thiols that can react with the chromogen DTNB and change the results of the ChE activity studies. Moreover, the use of a buffer without DTT (as the ChE specific buffer) for GST extraction is not recommended. Actually, DTT (Cleland's reagent) is used to quantitatively reduce disulfide bonds and maintain monothiols in a reduced state (Cleland, 1964). So, it stabilizes GST enzyme before the dosage of its activity. Then, in order to save time, the use of a combined buffer could be considered, but an adapted composition is necessary for the simultaneous enzyme extraction in order to

check their activity. So, the comparison of the specific buffer and the combined one was made for each enzyme.

The combined buffer had the same protein extraction efficiency. Moreover, the results suggest that the use of a combined buffer is very efficient, and comparable to the use of an enzyme specific buffer for biomarker analysis. Actually, as reported by several authors (Saint-Denis et al., 1998; Ribera et al., 2001; Brown et al., 2004; Lukkari et al., 2004), it is necessary to have an overall view of contamination impacts by studying several biochemical responses (as neurotoxicity and metabolism) to contaminated soil exposure. This study then showed that the combined buffer can act as a substitute for the specific buffers when the experiment requires the analysis of several biomarkers from the same individual. Thus, the experimental protocol using the combined buffer (Figure 1) is validated for earthworms. Then, the use of this combined buffer means a real simplification in methodology: the 3 different biomarkers can be analysed from the same earthworm with only one homogenisation. This is a significant saving in time and biological material.

In conclusion, this paper shows a new and rapid methodology that could be largely used in environmental and toxicological studies to investigate the contaminant neurotoxicity or metabolism and detoxification in earthworms.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the IFV, Institut Français de la Vigne et du Vin, and the Centre Universitaire de Formation et de Recherche d'Albi. The technical assistance of Mr Jean-Luc Carayon is acknowledged. We are very grateful to Adrian Pavely for reviewing the language of this paper.

REFERENCES

- Bocquené, G., Galgani, F., Truquet, P., 1990. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* 30, 75- 89.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brown, P.J., Long, S.M., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Hankard, P.K., 2004. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere* 57, 1675-1681.
- Cleland, W.W., 1964. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* 3, 480-481.
- Committee on Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments, National Research Council, 2003. *Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments: Processes, Tools, and Applications*. In: The National Academies Press, Washington, D.C.
- Denoyelle, R., Rault, M., Mazzia, C., Mascle, O., Capowiez, Y., 2007. Cholinesterase activity as a biomarker of pesticide exposure in *Allolobophora chlorotica* earthworms living in apple orchards under different management strategies. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 2644-2649.
- Ellman, G., Courtney, K., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., Bebianno, M.J., 2002. Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussates*. *Mar. Environ. Res.* 54, 413-417.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.

Lukkari, T., Taavitsainen, M., Soimasuo, M., Oikari, A., Haimi, J., 2004. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier metal exposure. *Environ. Pollut.* 129, 377-386.

Reinecke, S.A., Reinecke, A.J., 2007. Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 92-101.

Ribera, D., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Saint-Denis, M., 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1123-1130.

Romeo, M., Gharbi-Bouraoui, S., Gnassia-Barelli, M., Dellali, M., Aïssa, P., 2006. Responses of *Hexaplex (Murex) trunculus* to selected pollutants. *Sci. Total Environ.* 359, 135-144.

Römbke, J., Jänsch, S., Didden, W., 2005. The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62, 249-265.

Saint-Denis, M., Labrot, F., Narbonne, J.F., Ribera, D., 1998. Glutathione, glutathione related enzymes and catalase activities in the worm *Eisenia fetida*. *Arch Environ. Con. Tox.* 35, 594-606.

1.4.2 Dosage des activités enzymatiques

Le protocole d'extraction des protéines et de dosage des activités enzymatiques spécifiques a été initialement établi en cuvette pour un dosage au spectrophotomètre UV/visible (modèle 6505 ; Jenway). Toutefois, pour un dosage plus rapide, l'étude spectrophotométrique a été également réalisée sur un lecteur de microplaque (96 puits) à monochromateurs (Infinite 200 ; Tecan).

Les données obtenues sur 3 répétitions montrent des résultats comparables en cuvettes et microplaques (pas de différence significative, $p < 0,05$).

Ainsi, les méthodologies décrites dans les paragraphes suivants (dosage des activités enzymatiques et de la quantité de protéines extraites) peuvent être suivies sans discernement en cuvette ou microplaque.

1.4.2.1 *Dosage de l'activité GST*

Le dosage de l'activité GST doit obligatoirement être fait sur un broyat frais.

La mesure de l'activité GST consiste à fournir à l'enzyme un substrat (le chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB), qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST) et du glutathion. La réaction de conjugaison de ces deux produits catalysée par la GST entraîne la formation d'une molécule nouvelle, qui absorbe la lumière à 340 nm de longueur d'onde (Figure 3.8). Ce produit de conjugaison est le 1-glutathion-2,4-dinitrobenzène (GS-DNB). La valeur de densité optique mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formée, elle-même liée à l'intensité de l'activité GST. Cette méthode est adaptée du protocole décrit par **Habig et al. (1974)**.



Figure 3.8 : Principe du dosage de la GST

Ce dosage nécessite la préparation des réactifs et tampons :

- **Tampon Phosphate** à pH 6,5 et $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (à conserver à 4°C)

Nécessite : KH_2PO_4 à $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $M=136,09 \text{ g mol}^{-1} \rightarrow 3,4 \text{ g}$ dans 250 mL d'eau

$\text{K}_2\text{HPO}_4, 3\text{H}_2\text{O}$ à $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $M=228,22 \text{ g mol}^{-1} \rightarrow 5,7 \text{ g}$ dans 250 mL d'eau

A 100 mL de K_2HPO_4 : ajouter la quantité suffisante de KH_2PO_4 pour obtenir un pH de 6,5.

- **CDNB** (1-chloro-2,4 dinitrobenzène) à 20 mmol.L^{-1}

A préparer extemporanément et à conserver à l'abri de la lumière, $M=202,6 \text{ g.mol}^{-1}$

Peser 40,52 mg dans 10 mL d'éthanol

- **GSH** (Glutathion) à $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

A préparer extemporanément, $M=307,3 \text{ g mol}^{-1}$

Peser 153,5 mg dans 5 mL d'eau distillée

Les solutions préparées ainsi que les extraits de ver à doser sont placés au **bain-marie à 37°C** .

Le dosage s'effectue en suivant la cinétique de la réaction pendant 30 s à 340 nm dans des cuves en quartz ou des microplaques au spectrophotomètre (Tableau 3.4).

Tableau 3.4 : Volumes de tampon, réactif, substrat et échantillon pour le dosage de l'activité GST

DOSAGE DE LA GST en cuvettes		
	Blancs	Echantillons
CDNB (μL)	50	50
Tampon Phosphate (μL)	850	840
Echantillon (μL)	0	10
GSH (μL)	100	100

DOSAGE DE LA GST en microplaques		
	Blancs	Echantillons
CDNB (μL)	15	15
Tampon Phosphate (μL)	255	252
Echantillon (μL)	0	3
GSH (μL)	30	30

Agiter par des allers-retours de pipette après l'ajout du GSH

La calibration se fait sur le blanc. Puis l'analyse du blanc est lancée pendant 30 s : on en déduit la variation de densité optique du blanc pendant 30s (ΔDO_B). Ce blanc permet d'évaluer la vitesse de la réaction spontanée qui n'est pas négligeable.

On analyse ensuite l'échantillon pendant 30 s : on en déduit la variation de densité optique de l'échantillon (ΔDO_E) correspondant à la vitesse initiale de la réaction.

Le blanc ainsi que les échantillons sont mesurés au moins en double.

Le protocole en microplaques consiste en un chauffage de l'appareil pour un déroulement de la réaction à 37°C.

Les échantillons et les blancs sont disposés sur la plaque selon le schéma suivant (Figure 3.9).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL1 1/2	BL1 2/2	SM1_1 1/2	SM1_1 2/2	SM1_2 1/2	SM1_2 2/2	SM1_3 1/2	SM1_3 2/2	SM1_4 1/2	SM1_4 2/2	SM1_5 1/2	SM1_5 2/2
B	SM1_6 1/2	SM1_6 2/2	SM1_7 1/2	SM1_7 2/2	SM1_8 1/2	SM1_8 2/2	SM1_9 1/2	SM1_9 2/2	SM1_10 1/2	SM1_10 2/2	SM1_11 1/2	SM1_11 2/2
C	SM1_12 1/2	SM1_12 2/2	SM1_13 1/2	SM1_13 2/2	SM1_14 1/2	SM1_14 2/2	SM1_15 1/2	SM1_15 2/2	SM1_16 1/2	SM1_16 2/2	SM1_17 1/2	SM1_17 2/2
D	SM1_18 1/2	SM1_18 2/2	SM1_19 1/2	SM1_19 2/2	SM1_20 1/2	SM1_20 2/2	SM1_21 1/2	SM1_21 2/2	SM1_22 1/2	SM1_22 2/2	SM1_23 1/2	SM1_23 2/2
E	SM1_24 1/2	SM1_24 2/2	SM1_25 1/2	SM1_25 2/2	SM1_26 1/2	SM1_26 2/2	SM1_27 1/2	SM1_27 2/2	SM1_28 1/2	SM1_28 2/2	SM1_29 1/2	SM1_29 2/2
F	SM1_30 1/2	SM1_30 2/2	SM1_31 1/2	SM1_31 2/2	SM1_32 1/2	SM1_32 2/2	SM1_33 1/2	SM1_33 2/2	SM1_34 1/2	SM1_34 2/2	SM1_35 1/2	SM1_35 2/2
G	SM1_36 1/2	SM1_36 2/2	SM1_37 1/2	SM1_37 2/2	SM1_38 1/2	SM1_38 2/2	SM1_39 1/2	SM1_39 2/2	SM1_40 1/2	SM1_40 2/2	SM1_41 1/2	SM1_41 2/2
H	SM1_42 1/2	SM1_42 2/2	SM1_43 1/2	SM1_43 2/2	SM1_44 1/2	SM1_44 2/2	SM1_45 1/2	SM1_45 2/2	SM1_46 1/2	SM1_46 2/2	SM1_47 1/2	SM1_47 2/2

Figure 3.9 : Schéma de lecture en microplaques. Chaque échantillon ainsi que le blanc est dupliqué

La lecture de la plaque se fait puits après puits.

Pour chaque puits :

- injection de 30 μ L de GSH (préparation de l'injecteur, amorçage, volume minimal à préparer compte tenu du volume mort : 1,6 mL).
- agitation orbitale de 3 mm pendant 3 secondes
- lecture de cinétique de variation d'absorbance à 340 nm pendant 30 s (intervalle de lecture de A : 1 seconde).

Que le protocole soit réalisé en cuvettes ou en microplaques, la moyenne de variation de DO des blancs est ensuite soustraite à la variation de DO de chaque échantillon ($\Delta DO_E - \Delta DO_B$).

1.4.2.2 Dosage de l'activité CAT

La catalase est une des enzymes les plus importantes intervenant dans le système de défense contre les radicaux libres. L'étude de l'activité de la catalase s'effectue par des mesures spectrophotométriques. L'activité, présente dans l'échantillon, est calculée en mesurant la vitesse de disparition du peroxyde d'hydrogène à une longueur d'onde de 240 nm (Saint-Denis *et al.*, 1998). L'H₂O₂ possède en effet un pic d'absorption dans l'UV (entre 230 et 250 nm). Cette absorption est facilement

mesurable. La décomposition de l' H_2O_2 par la catalase se traduit par une diminution de densité optique et l'activité enzymatique peut ainsi être mesurée (Figure 3.10).



Figure 3.10 : Principe de dosage de la catalase

Ce dosage nécessite la préparation des réactifs et tampons :

- **Tampon Phosphate** à pH 7,5 ; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (à conserver à 4°C)

Nécessite :

KH_2PO_4 à $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $M=136,09 \text{ g mol}^{-1} \rightarrow 6,8 \text{ g}$ dans 500 mL d'eau \rightarrow pH 4,32

$\text{K}_2\text{HPO}_4, 3\text{H}_2\text{O}$ à $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $M=228,22 \text{ g mol}^{-1} \rightarrow 11,4 \text{ g}$ dans 500 mL d'eau \rightarrow pH 9,06

A 125 mL de K_2HPO_4 ajouter environ 25 mL de KH_2PO_4 pour obtenir un pH de 7,5.

- **H_2O_2** (peroxyde d'hydrogène)

Diluer $1,7 \text{ mL}$ de H_2O_2 (30 %) dans 100 mL de tampon phosphate (éprouvette graduée). A conserver à l'abri de la lumière et à 4°C .

Les solutions préparées, ainsi que les extraits de ver à doser, sont conservés dans la glace (4°C).

Le dosage s'effectue en suivant la cinétique de la réaction pendant 1 min à 240 nm dans des cuves UV en quartz au spectrophotomètre (Tableau 3.5).

Tableau 3.5 : Volumes de tampon, substrat et échantillon à introduire dans les cuvettes pour le dosage de l'activité CAT

DOSAGE DE LA CAT en cuvettes		
	Blancs	Echantillons
Tampon Phosphate (μL)	1490	990
Echantillon (μL)	10	10
H_2O_2 (μL)	0	500
Agiter par des allers-retours de pipette après l'ajout de H_2O_2		

DOSAGE DE LA CAT en microplaques		
	Blancs	Echantillons
Tampon Phosphate (μL)	200	198
Echantillon (μL)	0	2
H_2O_2 (μL)	100	100

La lecture de la plaque se fait puits après puits.

Pour chaque puits :

- injection de 100 μL de H_2O_2 (préparation de l'injecteur, amorçage, volume minimal à préparer compte-tenu du volume mort : 1,6 mL).
- agitation orbitale de 3 mm pendant 3 secondes
- lecture de cinétique de variation d'absorbance à 240 nm pendant 60 s (intervalle de lecture de A : 1 seconde).

Les tests d'adaptation du protocole en microplaques ont démontré l'importance de l'application d'un facteur de correction pour obtenir des valeurs cohérentes et comparables à celles lues en cuvettes. Les données de ΔDO en microplaques sont divisées par 2 (facteur de correction du à un trajet optique en microplaques différent de 1 cm).

1.4.2.3 Dosage de l'activité ChE

Plusieurs méthodes de dosage de l'activité cholinestérase sont décrites dans la littérature mais la méthode spectrophotométrique de **Ellman et al. (1961)** est

aujourd'hui la plus pratiquée. Cette méthode mesure le produit de l'hydrolyse d'un substrat synthétique – l'acétylthiocholine- suivant la cinétique suivante (Figure 3.11).

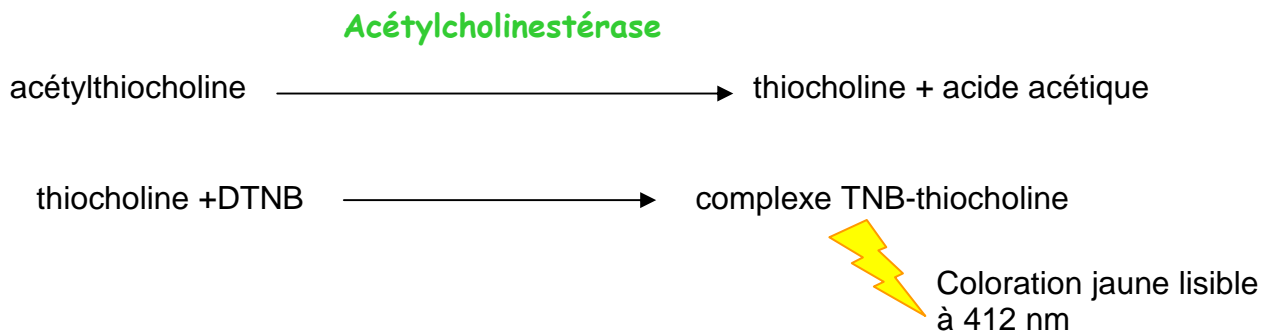


Figure 3.11 : Principe du dosage de la ChE

Dans des conditions d'excès de substrat, l'apparition de la thiocholine est proportionnelle à l'activité enzymatique puisqu'on travaille à la vitesse maximale. La fixation de l'ion dithiobisnitrobenzoate (DTNB) sur les groupements thiols -SH- de la thiocholine provoque l'apparition d'une coloration jaune dont l'intensité est fonction de l'activité ChE.

Ce dosage nécessite la préparation des réactifs et tampons :

- **Tampon Phosphate de Na** à pH 7 et $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ + **0,1 % de triton X100** (à conserver à 4°C)

Nécessite : Na_2HPO_4 à $0,02 \text{ mol L}^{-1}$; $M=141,56 \text{ g mol}^{-1} \rightarrow 1,42 \text{ g}$ dans 500 mL d'eau

NaH_2PO_4 à $0,02 \text{ mol L}^{-1}$; $M=120 \text{ g mol}^{-1} \rightarrow 1,2 \text{ g}$ dans 500 mL d'eau

Les solutions sont mélangées de façon à obtenir un pH de 7, à $0,02 \text{ mol L}^{-1}$. Ajouter ensuite 0,1 % de triton X100 (agitateur magnétique).

- **DTNB** (ion dithiobisnitrobenzoate) à $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$

40 mg dans 10 mL de tampon phosphate de Na à pH 8 et $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ (préparé à partir des solutions précédentes et sans ajouter le triton X100)

A préparer extemporanément et à conserver à l'abri de la lumière, $M=396 \text{ g.mol}^{-1}$

- **Acétylthiocholine** à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$

A préparer extemporanément, $M=289 \text{ g.mol}^{-1}$; Peser 29 mg dans 1 mL d'eau distillée

Les solutions préparées ainsi que les extraits de ver à doser sont conservés dans la glace (4°C).

Le dosage s'effectue en suivant la cinétique de la réaction pendant 30 s (valeur de temps donnant la plus forte vitesse initiale) à 412 nm au spectrophotomètre (Tableau 3.6).

Tableau 3.6 : Volumes de tampon, réactif, substrat et échantillon à introduire dans les cuvettes pour le dosage de l'activité ChE

DOSAGE DE LA ChE en cuvettes		
	Blancs	Echantillons
DTNB (µL)	40	40
Tampon Phosphate (µL)	700	680
Echantillon (µL)	20	20
Acétylthiocholine (µL)	0	20
Agiter par des allers-retours de pipette après l'ajout de l'acétylthiocholine		

DOSAGE DE LA ChE en microplaques		
	Blancs	Echantillons
DTNB (µL)	20	20
Tampon Phosphate (µL)	350	340
Echantillon (µL)	0	10
Acétylthiocholine (µL)	10	10

La lecture de la plaque se fait puits après puits.

Pour chaque puits :

- injection de 10 µL d'acétylthiocholine (préparation de l'injecteur, amorçage, volume minimal à préparer compte-tenu du volume mort : 1,6 mL).
- agitation orbitale de 3 mm pendant 3 secondes
- lecture de cinétique de variation d'absorbance à 412 nm pendant 30 s (intervalle de lecture : 1 seconde).

1.4.2.4 Dosage des protéines

La mesure de la concentration en protéines dans l'extrait se fait selon la méthode spectrophotométrique de **Bradford (1976)** utilisant le bleu de Coomassie. Elle mesure une quantité de protéines présente dans un extrait par rapport à une gamme étalon, établie à partir d'une solution de Sérum Albumine Bovine BSA. Cette mesure permet ensuite de déterminer l'activité spécifique des enzymes.

➤ **Elaboration de la gamme étalon :**

Une solution stock de BSA est préparée à 1 mg.mL^{-1} dans l'eau distillée. Une solution diluée est ensuite préparée à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ en vue de réaliser la gamme étalon.

Une gamme étalon à 8 points peut être établie (Tableau 3.7).

Tableau 3.7 : Réalisation de la gamme étalon de BSA en vue du dosage des protéines en cuvettes

Volume de BSA à $0,1 \text{ } \mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$ (μL)	0	20	40	60	80	100	120	140
Volume d'eau (μL) QSP 200μL	200	180	160	140	120	100	80	60
Quantité de BSA (μg)	0	2	4	6	8	10	12	14
Réactif de Bradford (μL) (à utiliser tel quel après agitation)	560	560	560	560	560	560	560	560
Concentration BSA dans la cuve ($\mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$) → Volume final cuve = 760 μL	0	0,0026	0,0053	0,0079	0,01	0,013	0,016	0,018
DO lue								

Lorsque l'ensemble des réactifs a été introduit dans la cuve, une coloration bleue se développe. L'absorption est lue à 595 nm au bout d'une quinzaine de minutes (figure 3.12).

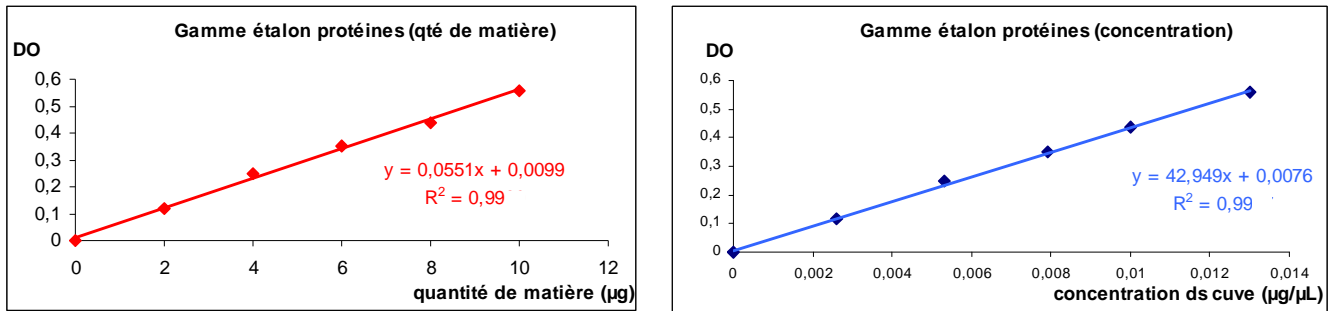


Figure 3.12 : Courbes étalon types (quantité de matière et concentration) établies pour le dosage des protéines

Les gammes étalon sont réalisées en double pour chaque dosage, qu'il soit réalisé en cuvettes ou en microplaques.

➤ **Dosage des protéines dans l'extrait :**

Chaque extrait est dilué dans l'eau afin que la concentration en protéines de l'extrait se situe dans l'intervalle des concentrations de la gamme étalon. Par ailleurs, le Triton X100 présent dans le tampon d'homogénéisation interfère avec le réactif de Bradford. Une dilution de l'extrait dans l'eau s'avère donc indispensable.

L'expérience a montrée que la dilution appropriée pour les extraits de lombrics broyés est une **dilution au 1/100**. Puis, on introduit dans les cuves :

- 50 µL d'extrait dilué
- 150 µL d'eau distillée
- 560 µL de réactif de Bradford

→ $V_{\text{extrait introduit}} = 0,5 \mu\text{L}$ et $V_{\text{final dans la cuvette}} = 760 \mu\text{L}$

L'absorption est lue à 595 nm au bout d'une dizaine de minutes.

La concentration en protéines dans l'extrait est déterminée à partir de la gamme étalon en prenant en compte le volume de l'extrait dilué et le facteur de dilution, d'après la loi de Beer-Lambert : **$A = \epsilon I C$**

➤ **Adaptation en microplaques :**

Le protocole est sensiblement le même que celui du dosage en cuvettes.

Une gamme étalon à 8 points est établie dans les puits ($V = 380 \mu\text{L}$) à partir de la solution diluée de BSA à $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tableau 3.8).

Tableau 3.8 : Réalisation de la gamme étalon de BSA en vue du dosage des protéines en microplaques

Volume de BSA à 0,1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (μL)	0	10	20	30	40	50	60	70
Volume d'eau (μL) QSP 100μL	100	90	80	70	60	50	40	30
Quantité de BSA (μg)	0	1	2	3	4	5	6	7
Réactif de Bradford (μL) (à utiliser tel quel après agitation)	280	280	280	280	280	280	280	280
Concentration BSA dans la cuve ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) → Volume final cuve = 380 μL	0	0,0026	0,0053	0,0079	0,01	0,013	0,016	0,018
DO lue								

Chaque extrait est dilué au 1/100 dans l'eau avant le dosage.

Les échantillons et les blancs sont disposés sur la plaque selon le schéma suivant (Figure 3.13).

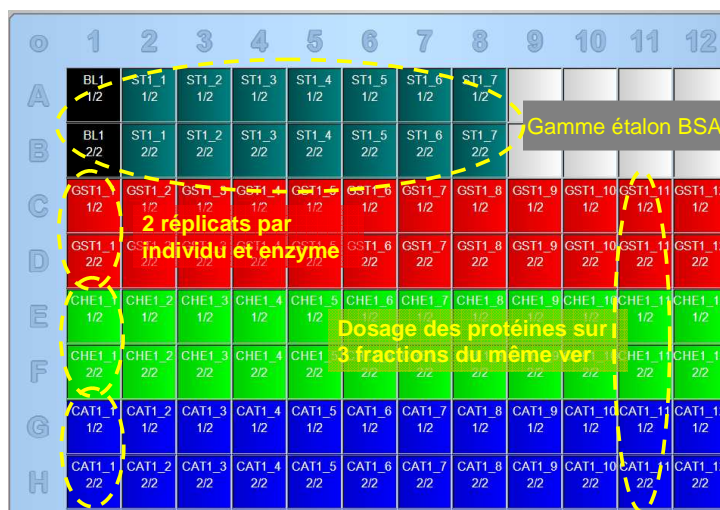


Figure 3.13 : Schéma de lecture du dosage des protéines en microplaques

Les échantillons (ainsi que les blancs et la gamme étalon) sont dupliqués sur la microplaque (Figure 3.13). Les protéines sont dosées dans chaque fraction de chaque individu (GST, ChE et CAT). Chaque fraction ayant subi un traitement différent, les taux de protéines extraites ne seront pas totalement identiques.

La microplaque est insérée dans le lecteur pour une agitation orbitale (3 mm) durant 10 s. Elle ressort ensuite du lecteur pour un temps d'attente de 15 min. L'absorbance est alors lue à 595 nm.

La concentration en protéines dans l'extrait est déterminée à partir de la gamme étalon en prenant en compte le volume de l'extrait dilué et le facteur de dilution.

1.4.3 Calcul de l'activité volumique et de l'activité spécifique de chaque enzyme

L'activité volumique d'une enzyme s'exprime en $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$.

$$AV = [(\Delta DO_E - \Delta DO_B) \times V_{\text{réaction(cuve)}} \times V_{\text{homogénéisation}}] \times I / (V_{\text{prise essai}} \times \epsilon)$$

en $\mu\text{mol.min}^{-1} .\text{mL}^{-1}$

Avec :

$\Delta DO_E - \Delta DO_B$ = moyenne des densités optiques de l'échantillon par minute – moyenne des densités optiques des blancs par minute

$V_{\text{réaction(cuve)}}$ = Volume total dans la cuve ou le puits en microplaques

$V_{\text{homogénéisation}}$ = Volume initial pour le broyage

I = trajet optique de la cuve en cm ($I = 1 \text{ cm}$; un facteur de correction est toutefois appliqué pour le dosage de l'activité CAT en microplaques du fait d'un volume final de 300 μL qui correspond à un trajet optique inférieur à 1)

$V_{\text{prise essai}}$ = Volume d'échantillon introduit dans la cuve ou le puits

ϵ = coefficient d'extinction molaire en $\text{mmol.L}^{-1} .\text{cm}^{-1}$ de la substance absorbante à la λ donnée

L'activité spécifique d'une enzyme se calcule en rapportant l'AV à la concentration en protéines de l'échantillon. Elle s'exprime en $\text{nmol.min}^{-1} .\text{mg}^{-1}$ de protéines.

$$AS = (AV \times 1000) / \text{qté prot}$$

en $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de protéines

Avec :

$\times 1000$ = pour avoir l'activité en nmol

Qté prot = quantité de protéines dans extrait global ($V_{\text{homogénéisation}}$) = $C_{\text{extrait}} \times V_{\text{homo}}$

Remarque : l'activité EROD (éthoxyresorufine-O-diéthylase) a également été envisagée comme biomarqueur pour un suivi de la phase 1 du système de métabolisation des toxiques. Le protocole du dosage de ce biomarqueur est décrit en **Annexe 2**. Toutefois, les études de dosages enzymatiques (décrites ultérieurement) ont montré qu'aucune activité EROD n'était détectable sur les vers de l'expérimentation. D'après **Rodriguez-Castellanos et Sanchez-Hernandez (2007)**, l'activité EROD est très faible chez les lombrics. Ainsi, l'EROD n'a pas été retenue pour la suite des études et des dosages enzymatiques (**Brown et al., 2004 ; Schreck et al., 2008 b**).

1.5 Extraction et dosage des molécules actives potentiellement bioaccumulées dans les lombrics

En parallèle des analyses de biomarqueurs, les lombrics ayant été exposés aux pesticides dans l'expérimentation en conditions contrôlées, sont soumis à une analyse chimique visant à déterminer la quantité de molécules phytosanitaires qu'ils ont potentiellement bioaccumulées. Deux techniques sont testées :

1.5.1 Broyage et extraction à l'homogénéiseur

6 vers préalablement congelés à -80°C sont coupés en morceaux, « poolés » et broyés à l'homogénéiseur (Polytron PT 1300D) à 12 000 rpm en solution dans l'acétate d'éthyle ($V_{\text{acétate d'éthyle}} \text{ (mL)} = 3P\text{(g)}$). Le surnageant est récupéré et le culot lavé 2 fois à l'acétate d'éthyle. Les surnageants sont alors filtrés puis concentrés par évaporation à sec dans un évaporateur rotatif. Après lavage puis concentration sous courant d'azote dans un pilulier, l'extrait est repris dans 50 µL de dichlorométhane pour une analyse multi-résidus en GC-MS (injection manuelle, TIC + appel d'ions).

1.5.2 Extraction Liquide Pressurisée

6 vers préalablement congelés à -80°C sont coupés en morceaux, « poolés » et broyés dans 1,2 fois leur poids de cérite dans un mortier avec un pilon. Le broyat est alors extrait sous PLE en introduisant dans l'ordre dans une cellule ASE de 33 mL :

- 2 filtres de cellulose
- une fine couche de sable de Fontainebleau
- le broyat de vers dans la cérite
- une fine couche de sable de fontainebleau

L'extraction est effectuée par l'acétone sous fortes températures et pressions en Pressurized Liquid Extraction (ASE 100 Dionex ; 100°C ; temps statique = 2 min ; flush volume = 60 % ; temps de purge = 120 s ; 3 cycles). L'extrait est évaporé à sec avant d'être repris dans 50 µL de dichlorométhane et analysé en GC-MS (méthode similaire à l'extraction des échantillons de sol).

1.6 *Traitement des données*

Suite à une analyse de variance (ANOVA) réalisée avec le logiciel SPSS (version standard 11.0, SPSS Inc.), le test de Tukey a été utilisé pour comparer les différences entre les modalités ou traitements et les témoins. L'homogénéité des variances est vérifiée par le test de Levene. Si les variables dépendantes ne sont pas homogènes (même après une transformation logarithmique), les tests non paramétriques de Kruskal-Wallis et Mann-Whitney sont appliqués au lieu de l'ANOVA. Une différence significative est testée au seuil de 5% soit un niveau de probabilité $p < 0,05$ (ou $p < 0,1$ pour certaines données précisées). Toutes les valeurs présentées dans les résultats seront sous la forme d'une moyenne des réplicats \pm erreur standard (SD).

2 Résultats et discussion

2.1 *Etude de la biomasse microbienne*

Cette étude a été réalisée par deux approches différentes : la quantification des microorganismes aérobies revivifiables d'une part et la mesure de la biomasse microbienne totale d'autre part, afin de mettre en évidence une influence de la pratique agricole.

Ces deux approches ont été choisies puisque lorsqu'il y a des changements culturaux, la biomasse microbienne évolue vers un nouvel équilibre (Ritz *et al.*, 1997). Nous avons donc voulu connaître les spécificités de cet équilibre en lien avec l'itinéraire d'entretien du sol de la modalité concernée.

2.1.1 Quantification du nombre de microorganismes revivifiables

On observe sur le milieu des colonies bactériennes et parfois des moisissures. Chaque colonie provient d'une Unité Formant Colonie (UFC), c'est-à-dire que la colonie est issue d'une bactérie ou d'un spore qui a germé, ou encore d'un amas de bactéries si serrées qu'elles forment une seule colonie.

L'analyse bactériologique révèle un nombre de microorganismes revivifiables à 30°C variable selon la modalité d'entretien du sol. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.9.

Tableau 3.9 : Comptage des bactéries revivifiables à 30°C en 72 heures (en UFC par gramme de sol) – Mise en évidence d'un effet de l'entretien du sol des inter-rangs

	Témoin	Désherbage	Travail du sol	Enherbement
Bactéries aérobies revivifiables à 30°C en 72 heures (UFC g ⁻¹)	45.10 ⁴	12.10 ⁴	17.10 ⁴	40.10 ⁴

Le comptage des colonies a été réalisé selon les méthodes préconisées par la **norme NF EN ISO 6222** (Qualité de l'eau - Dénombrement des micro-organismes revivifiables - Comptage des colonies par ensemencement dans un milieu de culture

nutritif gélose). Cette analyse normée donne alors une valeur de colonies moyennes dans les boîtes de Pétri de chaque modalité.

Ces résultats ne sont que partiels : ils présentent le nombre de bactéries revivifiables du sol avec l'incertitude de mesure spécifique à la microbiologie.

Nous constatons cependant que ces tests révèlent des tendances, sur l'influence de l'entretien du sol agricole, conformes aux données de la littérature.

La prairie témoin, exempte de pesticides, présente un nombre d'UFC par gramme de sol élevé par rapport au sol nu désherbé chimiquement ou travaillé. En effet, une prairie présente généralement une biomasse et une activité bactérienne plus importantes qu'en terres cultivées (**Dick, 1992 ; Robertson et Morgan, 1996**). Les inter-rangs enherbés ont un nombre de colonies voisin de celui des témoins. Comme le soulignent les travaux de **Stark et al. (2006)**, les populations bactériennes se développent mieux sous l'effet de la flore et des exsudats racinaires. Par ailleurs, le couvert végétal augmente la matière organique du sol, ce qui favorise le développement des microorganismes du sol (**Wander et al., 1995 ; Shannon et al., 2002 ; Stark et al., 2006**). Le labour, lui, semble avoir un effet perturbateur sur la biomasse microbienne (**Salinas-Garcia et al., 1997**). Ceci explique la valeur des UFC g⁻¹ comptées pour la modalité travaillée, sensiblement inférieure à celle des témoins et des inter-rangs enherbés. Enfin, le nombre de colonies comptées est le plus faible pour la modalité désherbée chimiquement. Nous pouvons tout d'abord penser à un effet néfaste de l'application des herbicides sur les populations bactériennes (**Harden et al., 1993**). Par ailleurs, il nous semble également intéressant de suggérer aussi un effet agronomique plutôt que toxicologique à l'origine de cette perturbation bactérienne. En effet, un sol nu, exempt d'exsudats et de matière organique est peu propice au développement bactérien (**Stark et al., 2006**). L'effet agricole d'un itinéraire cultural de désherbage total pourrait venir compléter l'effet néfaste des produits chimiques.

2.1.2 Biomasse microbienne totale

Ces analyses ont été confiées au **laboratoire Celesta-Lab**.

Les sols de la parcelle expérimentale présentent des niveaux de biomasse microbienne compris entre 101,2 ± 12,2 et 165,4 ± 25,7 mg de C par kg de sol. Ces

valeurs, faibles dans l'absolu, ne sont cependant pas étonnantes pour les sols limoneux et acides que sont les bouldènes.

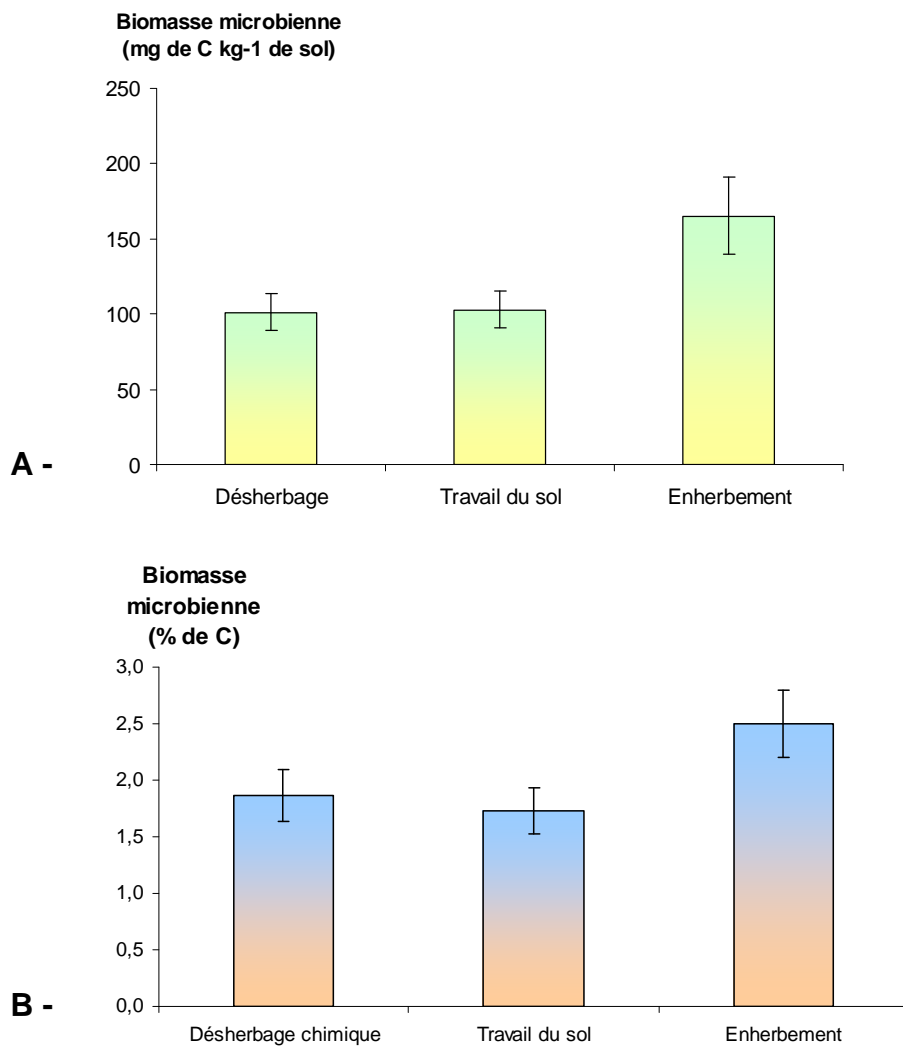


Figure 3.14 : Résultats de la quantification de la biomasse microbienne des sols de la parcelle expérimentale en fonction de l'entretien des inter-rangs

A – Biomasse microbienne en mg de C par kg de sol

B – Biomasse microbienne en pourcentage de C organique total

La figure 3.14 montre qu'en terme de biomasse microbienne, il n'y a pas de différence significative entre les différentes modalités d'entretien du sol des inter-rangs sur un même type de sol (bouldènes) (test de Kruskal-Wallis, seuil de 5 %, $p < 0,05$) que la biomasse soit exprimée en mg de C par kg de sol ou pourcentage du carbone organique total du sol. Toutefois, cette figure suggère que l'enherbement favoriserait le développement de la biomasse microbienne (test de Kruskal-Wallis,

P<0,1). Cette tendance vient confirmer les hypothèses émises suite à la quantification du nombre de microorganismes revivifiables quant à l'enherbement. La présence d'un couvert végétal favoriserait donc le développement des microorganismes (**Wander et al., 1995 ; Shannon et al., 2002**). En effet, les travaux de **Laumonier (1995)** montrent que la matière organique (apportée par l'enherbement) joue un rôle bénéfique sur l'activité microbiologique du sol.

Résumé :

Ces expérimentations ne nous ont pas clairement permis de mettre en évidence un effet de la pratique culturale sur le nombre de bactéries aérobies revivifiables des sols. Nous constatons simplement que la présence d'un couvert végétal, source d'éléments nutritifs (flore et exsudats racinaires, matière organique en décomposition, fertilisation azotée naturelle du sol, etc.), favorise la vie bactérienne. A l'inverse une terre nue, traitée chimiquement ou régulièrement labourée perturbe la biomasse bactérienne d'un sol.

2.2 Expérimentation en conditions contrôlées ; suivi écotoxicologique

Ces résultats ont fait l'objet de la **publication d'un article dans la revue Chemosphere**.

L'objectif de cette expérimentation était de mettre en évidence un **possible effet neurotoxique des pesticides sur les vers *Aporrectodea caliginosa* par le suivi de l'activité cholinestérase** (ChE, biomarqueur d'exposition aux polluants). D'autre part elle a permis de suivre, par des biomarqueurs de la voie de biotransformation des molécules, la **métabolisation des toxiques** (activité glutathion-S-transférase GST) et la **prise en charge des radicaux libres** (activité catalase CAT) potentiellement produits au cours de la métabolisation. L'étude de l'activité EROD basée sur le cytochrome P450 a été initialement envisagée comme biomarqueur de la phase 1 du système de métabolisation des toxiques. Toutefois, l'activité EROD ne

peut être détectée ni dans les vers témoins ni dans les vers exposés. Le cytochrome P450-1a est peut-être absent chez *A. caliginosa* ou alors ce test de l'EROD n'est pas adapté à une détection de l'activité enzymatique chez cette espèce (**Brown et al., 2004 ; Schreck et al., 2008 b**).

Les activités des autres 3 biomarqueurs ont été mesurées après 3, 7 et 14 jours sur 10 vers par condition expérimentale :

- exposition aux insecticides à la dose appliquée sur la parcelle lors d'un traitement
- exposition aux insecticides à la dose maximale appliquée sur la parcelle, c'est-à-dire au cumul de l'ensemble des traitements d'une campagne d'épandage
- exposition aux fongicides à la dose appliquée sur la parcelle lors d'un traitement
- exposition aux fongicides à la dose maximale appliquée sur la parcelle, c'est-à-dire au cumul de l'ensemble des traitements d'une campagne d'épandage
- exposition au cocktail insecticides + fongicides à la dose maximale.

Les résultats (figures de l'article ci-joint) montrent alors que GST et CAT appartenant directement ou indirectement au système de métabolisation ont une évolution conjointe, d'allure similaire. Les légères variations d'activités chez les témoins peuvent s'expliquer par les variations d'état physiologique au cours du déroulement de l'expérimentation en chambre froide (**Arnaud et al., 2000**).

À J+3, on note une augmentation de l'activité CAT sous l'effet des fongicides qui témoigne d'une prise en charge de la production de radicaux libres (H_2O_2). Par contre, il n'y a pas de réelle augmentation de l'activité GST: il ne semble donc pas y avoir de métabolisation de phase 2 pour ce type de molécules (peut-être une métabolisation de phase 1). D'autres analyses pourraient être envisagées afin de mettre en évidence une métabolisation de phase 1 : les tests éthoxycoumarine O-diéthylase (ECOD) et pentoxyrésorufine O-dialkylase (PROD) pourraient faire l'objet de nouvelles investigations. Les insecticides n'induisent pas d'augmentation d'activité CAT à J+3. Celle-ci a peut-être déjà eu lieu puisqu'il y a métabolisation de phase 2 (GST activée) ou la métabolisation ne provoque pas de production de radicaux libres. Après 7 jours d'exposition, les activités GST et CAT des vers exposés rejoignent le niveau de base des témoins. CAT et GST sont ensuite inhibées à J+14 chez les vers soumis à un traitement insecticide et/ou fongicide à fortes doses. Il est remarquable de constater la nette inhibition de la catalase sous l'effet des insecticides et des fongicides aux doses maximales. Les glutathion S-

transférases présentent une forte inhibition, mais seulement sous l'effet des insecticides (qui avaient provoqué leur activation à J+3). Cette inhibition est peut-être due au stress toxique. En effet, selon **Cossu (1997)**, lorsque l'induction des enzymes antioxydantes est suffisante, elle permet l'adaptation des individus et le retour à la normale. Par contre, des toxicités trop importantes entraînent leur inhibition. Par ailleurs, la baisse d'activité de la CAT chez les F max pourrait être expliquée par la présence d'espèces réactives de l'oxygène $O_2^{\cdot -}$ normalement pris en charge par la superoxyde dismutase mais inhibiteurs de la catalase lorsqu'ils sont présents en fortes quantités (**Kono et Fridovich, 1982**). Un fort stress oxydatif ou une métabolisation insuffisante pourrait alors inhiber la catalase. Les fongicides seraient moins toxiques (inhibition moins intense des enzymes).

L'étude de l'activité ChE permet de suivre le possible effet neurotoxique des pesticides sur les populations de vers.

Les insecticides (et les fongicides à la dose maximale épandue) ont un effet neurotoxique pour les lombrics à 3 jours d'exposition. La fonction inhibitrice de la ChE par des organophosphorés chez les insectes semble prendre effet aussi sur les vers de terre. L'inhibition n'est toutefois pas observée pour les individus soumis au cocktail IF max, peut-être s'agit-il d'un effet antagoniste des insecticides et fongicides à fortes doses...

A J+7, nous remarquons une acclimatation aux conditions et un retour de l'activité au niveau basal. Par contre, après 14 jours, le phénomène observé peut être relié aux fortes inhibitions également constatées pour les autres biomarqueurs (CAT et GST): il y a alors à cette date un **important stress toxique** qui entraîne un possible **dysfonctionnement cellulaire** qui a déjà été constaté par **Brown et al., 2004** et une apoptose (symptômes de forte tétanie, fonctionnement cellulaire perturbé : on se retrouve proche du seuil de létalité pour les lombriciens).

Après 34 jours d'exposition, les vers sont amaigris et beaucoup moins actifs. Par ailleurs, la quantité de protéines extraites des vers exposés durant 34 jours est sensiblement inférieure aux quantités de protéines extraites des vers au cours des 14 premiers jours de l'expérimentation.

Une perturbation physiologique des lombrics en terraria est notable à cette date ; elle semble importante chez les lombrics exposés aux pesticides (notamment aux insecticides) : un **arrêt des synthèses protéiques** a peut-être lieu chez les vers

exposés trop longtemps ? Les fortes inhibitions des 3 activités enzymatiques chez les vers exposés à J+14 pourraient être une première manifestation de ces perturbations ...

L'analyse chimique des lombriciens a révélé une **très faible voire inexistante bioaccumulation de pesticides** dans les organismes, même pour les individus exposés aux plus fortes teneurs environnementales durant les plus longues périodes. En effet, quelle que soit la technique d'extraction envisagée, l'analyse chimique des vers de terre en terraria montre que, si elle a lieu, la bioaccumulation des molécules actives dans ces organismes se fait à des teneurs inférieures aux seuils de détection des appareils analytiques. Par ailleurs, nous pouvons également envisager que les molécules aient été rapidement dégradées dans le sol des terraria ; les lombrics ayant potentiellement accumulé leurs métabolites.

Toutefois, la comparaison des quantités de molécules actives restantes dans les terraria après 34 jours a montré que les vers participent à la dégradation des substances phytosanitaires dans les sols. Les lombriciens pourraient, de façon indirecte, contribuer (par leur activité de creusage couplée à des effets de bioturbation, par leurs déjections acidifiant le milieu...) à une accélération des dégradations des molécules dans les sols. Toutefois, après 34 jours, le pH_{eau} du sol n'ayant pas varié dans les terraria, il n'est pas exclu de penser à un **potentiel rôle des vers de terre dans la détoxification des milieux** par la métabolisation directe des molécules mères...

Résumé :

A J+3, nous constatons une augmentation de l'activité catalase sous l'effet des fongicides essentiellement et une activation de la GST sous l'effet des insecticides. La ChE est inhibée à 3 jours d'exposition. Ensuite, ces enzymes retrouvent chez les lombrics exposés aux toxiques depuis 7 jours un niveau d'activité proche de celui des témoins, c'est-à-dire un niveau basal dans ces conditions contrôlées. Enfin, après 14 jours d'exposition, une inhibition des activités enzymatiques suggère un important stress toxique à l'origine d'une perturbation cellulaire.

Par ailleurs les lombriciens pourraient jouer un rôle dans la détoxification des sols en stimulant la dégradation bactérienne ou physico-chimique ou en participant activement à la métabolisation des pesticides.

L'ensemble de ces résultats et discussions est présenté dans l'article ci-joint :

Schreck E, Geret F, Gontier L, Treilhou M, 2008 b. Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. Chemosphere 71, 1832-1839.

Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*

E. Schreck^{a,b}, F. Geret^a, L. Gontier^b, M. Treilhou^a

^a *Laboratoire de Chimie et Biochimie des Interactions, Université de Toulouse, Centre Universitaire JF Champollion, Place de Verdun, 81012 Albi, France*

^b *IFV France – ITV-ENTAV, Station Régionale Midi-Pyrénées, V'innopôle, BP 22, 81310 Lisle sur Tarn, France*

Received 19 October 2007; received in revised form 28 January 2008; accepted 1 February 2008

Available online 17 March 2008

Abstract

The effects of a mixture of insecticides and/or fungicides at different environmental concentrations were investigated on a *Aporrectodea caliginosa nocturna* population. This laboratory experiment was carried out in order to reproduce Gaillac (France) vineyard conditions.

Neurotoxicity (cholinesterase), metabolism (glutathione-S-transferase) and oxidative stress (catalase) enzymes were studied as biomarkers in earthworms after short-term exposure in terraria. The aim was to observe the global effects of pesticide exposure, as in a vineyard, rather than focus on each isolated biomarker variation, or on each compound's impact.

ChE activity was inhibited after a few days of insecticide and/or fungicide exposure, indicative of a neurotoxic effect in earthworms. The significant increase in GST and CAT activities revealed the metabolism of these products resulting in the production of reactive oxygen species. After a long period of exposure or high concentrations, earthworms were physiologically damaged: they could not cope with the high toxicity (cellular dysfunction, protein catabolism...).

Chemical analysis showed that pesticide bioaccumulation in earthworm tissues, even in those exposed to the highest concentrations and for the longest periods, was very low (under LOD) or absent. However, the study of pesticide residues in terraria after 34 days in a climate chamber suggested that earthworms participate in soil pesticide breakdown.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Pesticides; Earthworms; Biomarkers; Glutathione-S-transferase; Catalase; Cholinesterase

1. Introduction

Pesticides such as insecticides and fungicides are widely sprayed on agricultural land, especially in wine-growing areas, to control pests (insects and fungi). However, these compounds may accumulate in the soil and subsurface water (Jacobson et al., 2005), where they could become a toxicological risk for invertebrates such as earthworms that ingest large amounts of soil and play a key role in soil biol-

ogy. Earthworms are a key species (Römbke et al., 2005) in the soil ecosystem (impact on soil structure, decomposition activity, and nutrient mineralization). They are naturally in contact with the solid and aqueous soil phases, and so directly exposed to pesticides, thus it is interesting to use them to estimate pesticide effects.

In this study, we focus on pesticide pollution caused by two insecticides (chlorpyrifos-ethyl and λ -cyhalothrin) and four fungicides (folpet, myclobutanil, metalaxyl and fose-tyl-Al) that are commonly used in wine-growing in the south of France.

Chlorpyrifos-ethyl is an organophosphate insecticide used to control Coleoptera, Diptera, Homoptera and Lepidoptera in soil or on foliage. Its mode of action is non-systemic, and exposure of insects to the active component (via

Corresponding author. Address: Laboratoire de Chimie et Biochimie des Interactions, Université de Toulouse, Centre Universitaire JF Champollion, Place de Verdun, 81012 Albi, France. Tel.: +33 5 63 48 17 00; fax: +33 5 63 48 64 33.

E-mail address: eva.schreck@univ-jfc.fr (E. Schreck).

contact, ingestion and/or respiration) affects the nervous system by inhibiting acetylcholinesterase activity.

λ -Cyhalothrin is a synthetic pyrethroid insecticide and acaricide used to control a wide range of pests by contact or ingestion in a variety of crops, especially vines. It acts on sodium channels within the nerve cells, disrupting proper functioning and causing “knock down” of the pest.

Folpet is a protective leaf-fungicide, an anti mildew treatment. It inhibits normal cell division and spore germination in a wide range of microorganisms.

Metalaxyl-M is also a systemic anti mildew. It inhibits RNAr synthesis in several fungi such as phytophthora or plasmopora that cause severe damage to vines.

Fosetyl-Al is a systemic fungicide used to control damping-off and rot of plant roots, stems and fruit. It is applied as a dip treatment and acts by stimulating the plant's natural defenses.

Myclobutanil is a systemic fungicide. It is a sterol demethylation inhibitor that cures several vine diseases (oïdium, botrytis, and black-rot).

Toxicity and harmfulness of these pesticides to earthworms in vineyard soil can be evaluated using a variety of biological parameters. Using biomarkers to investigate the effects of contaminant toxicity on metabolism and detoxification is becoming current (Lukkari et al., 2004), and so this study focused on three biochemical biomarkers in earthworms exposed to pesticides.

Cholinesterase (ChE) activity was studied as a biomarker for pollutant exposure (Denoyelle et al., 2007; Reinecke and Reinecke, 2007a,b). Acetylcholinesterase enables hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine at the synapses. Toxic molecules, especially organophosphates, inhibit this enzyme and are responsible for an over-accumulation of acetylcholine causing tetanus and death (Day and Scott, 1990; Stenersen et al., 1992; Jemec et al., 2007; Reinecke and Reinecke, 2007a,b).

It is generally thought that exposure to pesticides initiates a metabolism process (Saint-Denis et al., 1998). In eukaryotes, this usually occurs in two phases of which the second involves conjugation enzymes such as glutathione-S-transferase (GST) which attach a polar compound to the toxic molecules, promoting elimination by excretion. Thus, the increase of GST activity was evaluated to quantify the metabolism process induced by pesticides.

Moreover, the metabolism phase can imply the production of reactive oxygen species (ROS), whose effects are countered in organisms by antioxidant enzymes (Saint-Denis et al., 1998). One of them is catalase (CAT). The latter is responsible for breaking down the hydrogen peroxide free radical (H_2O_2) into water and molecular oxygen (Brown et al., 2004). So, an increase in its activity should indirectly indicate the metabolism of pesticides leading to soil detoxification.

Biomarker responses were measured on a *Aporrectodea caliginosa nocturna* population (from the Gaillac area) exposed to environmental pesticide concentrations in terraria under laboratory conditions.

In addition, we investigated the fate of chemicals in soil containers with and without earthworms to evaluate pesticide absorption and the detoxification role of the invertebrates.

2. Materials and methods

2.1. Earthworms

The earthworms *A. caliginosa nocturna* were collected in autumn from an untreated meadow in the Gaillac vineyard area. Adults and juveniles were used unselectively for the laboratory experiments to reproduce natural conditions.

2.2. Chemicals

All pesticides were purchased from Promochem (purity $\geq 98\%$). Syngenta Agro supplied two compounds: λ -cyhalothrin and metalaxyl. Reagents and solvents were obtained from Sigma–Aldrich.

2.3. Laboratory experiment set-up

The objective of the laboratory experiment was to reproduce earthworm exposure to a cocktail of insecticides and fungicides in the Gaillac wine-growing area. The experiment focused on 6 experimental conditions, using plastic terraria, each receiving 50 earthworms and 6 kg of Gaillac soil, wetted with 600 ml of pesticide solution. Each terrarium was duplicated, i.e. split in two (6 identical pairs to simplify experimental handling) and kept in a climate chamber (14 °C, darkness). Two terraria (1&2) were controls: they contained 50 earthworms each, in a non-polluted wetted soil. The other containers (3–12) were contaminated with insecticides (*I*) and/or fungicides (*F*) at environmental concentrations, i.e. the concentration applied in the vineyard for one treatment (*I* treatment, *F* treatment) or the concentration applied for a whole summer, i.e. a maximal dose (*I* max, *F* max, *IF* max), (Table 1). The concentrations were chosen relative to the normal application rate in wine-growing areas and calculated for each terrarium by assuming a homogeneous distribution in the first 5 cm of soil, no crop interception and similar soil density. To be sure that all the earthworms would be exposed to the pesticide cocktail, we mixed the soil carefully with the 600 ml of contaminated solution and the initial concentration in pesticides was checked by GC–MS (see Section 2.5). The terrarium lids were perforated to allow aeration, and the soil was re-hydrated with water twice a week in view of keeping the same water content during all the experiment time.

A supplementary container (13) was reserved to study the fate of pesticides (*IF* max) in soil without earthworms.

Before introduction into the terraria, all the worms were kept on moist filter paper for three days, to excrete gut contents (Xiao et al., 2006).

Table 1
Pesticide concentrations in treated containers (mg kg soil⁻¹)

Containers	Treatment	Earthworms	Insecticide concentrations in container soil (mg kg ⁻¹)		Fungicide concentrations in container soil (mg kg ⁻¹)			
			λ-Cyhalothrin	Chlorpyrifos-ethyl	Folpet	Metalaxyl	Myclobutanil	Fosetyl-AI
1&2	Control	50	0	0	0	0	0	0
3&4	<i>I</i> treatment	50	0.011	0.168	0	0	0	0
5&6	<i>I</i> max	50	0.021	0.168	0	0	0	0
7&8	<i>F</i> treatment	50	0	0	0.805	0.098	0.025	1.175
9&10	<i>F</i> max	50	0	0	1.613	0.195	0.050	5.292
11&12	<i>IF</i> max	50	0.021	0.168	1.613	0.195	0.050	5.292
13	<i>IF</i> max	0	0.021	0.168	1.613	0.195	0.050	5.292

Exposure to insecticides (or fungicides) at the concentration applied in the vineyard for one treatment is termed *I* treatment (or *F* treatment). Exposure to insecticides (and/or fungicides) at the concentration applied for a whole summer (maximal doses) is termed *I* max (or *IF* max or *F* max).

Sixteen earthworms for each particular treatment (eight from each pair member) were sampled after 3, 7, 14 and 34 days of exposure: 10 were used individually for biomarker measurements and six were used for organism pesticide analysis. After fasting for three days, earthworms were rinsed in water, dried and stored at -80 °C until analysis.

2.4. Biochemical responses

Each earthworm was individually homogenized in a combined Tris-buffer (50 mM, pH 7.2, NaCl 0.15 M, sucrose 0.3 M, EDTA 1 mM, NaH₂PO₄ 0.02 M, Triton X 100 0.1%) in a 1:3 w/v ratio using a Polytron PT 1300D homogenizer (from Kinematica) (12000 rpm, 4 °C). This buffer allowed quantitative determination of the three enzyme activities from one invertebrate homogenate which was separated into three fractions, one for each enzyme. In the GST fraction, dithiothreitol was added (100 mM), in a 1:100 v/v ratio. In the CAT fraction, Triton X 100 (0.4%) was added followed by sonication for 10 min. The homogenates were then centrifuged at 9000g for 25 min at 4 °C. CAT and ChE supernatants were stored at -80 °C before analysis, whereas the GST supernatant was analyzed directly, without being frozen. Results not presented here, clearly show a decrease in GST activity when supernatants are stored at -80 °C.

The ChE activity was measured using the method described by Ellman et al. (1961), with modifications for detection in earthworms. Acetylthiocholine iodide is used as substrate and 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic) acid (DTNB) as chromogen. The activity was studied spectrophotometrically at 412 nm.

Glutathione-S-transferase activity was measured using the method described by Habig et al. (1974) with 1-chloro-2,4-dinitro-benzene (CDNB) as substrate of spectrophotometrical measurement at 340 nm and 37 °C.

Catalase activity was determined by measuring the rate of hydrogen peroxide reduction at 240 nm (Saint-Denis et al., 1998).

Total protein contents were determined using the Bradford method (Bradford, 1976). The enzyme activities were expressed as nmol min⁻¹ mg⁻¹ of proteins.

2.5. Determination of pesticide concentrations

2.5.1. Pesticide extraction

Pesticides were extracted from soil and earthworms. For each terrarium, at the end of the experiment (34 days), a homogeneous soil sample was frozen in a plastic bag at -20 °C. Pesticide concentrations in this soil were determined using accelerated solvent extraction (ASE), with 100 g being introduced into a 66 ml ASE cell. The extraction was carried out using a Dionex Corporation ASE 100 apparatus with acetone as extraction solvent. The temperature was 100 °C, with 3 cycles per sample, a 60% flush volume, a static time of 3 min and a purge time of 120 s (Conte et al., 1997; Popp et al., 1997). The recovery rate of ASE is between 75% and 90% for the different molecules. After centrifugation, the sample was concentrated under reduced pressure. The residue was re-dissolved in 50 µl of dichloromethane.

Pesticide concentrations in the earthworms were analyzed after 3, 7, 14 and 34 days using one pooled sample for each terrarium (containing 6 organisms). Two methods were tested. The first one used ASE 100, and was adapted from Saito et al. (2004). The tissue sample (six pooled earthworms) frozen at -80 °C was dried on filter paper, then weighed and cut into fragments. The pieces were homogenized with celite in order to dehydrate and disperse the sample. Then pressurized extraction was performed in a 33 ml volume cell. The ASE parameters were the same as those fixed for pesticide extraction from soil.

The second method used a homogenizer as described in the conventional extraction of Jensen et al. (1969). The defrosted sample was dried and then placed in a glass tube, ethyl acetate was added in a 1:3 w/v ratio, and homogenized with a Polytron homogenizer at 12000 rpm. After centrifugation (4000g for 10 min), the supernatant was collected and concentrated as described above for the ASE method.

2.5.2. Pesticide analysis

After acetone evaporation and concentration, the final extracts were injected into GC-MS (gas chromatography coupled to mass spectrometry detection) for a multi-residues analysis.

One microliter was injected into the GC–MS for a multi-residues detection under temperature gradient. The apparatus used was a Finnigan Polaris Q, Thermo Electron Corporation with a RTX-5 (Restek) column (30 m × 0.25 mm ID, 0.25 µm) and an ion trap system. The mass spectrometer was operated in electron impact (EI-70 eV).

The instrumental conditions were adapted from Kawata et al. (2005). The injector temperature was 250 °C, in splitless mode. The oven temperature was programmed from 50 °C (1 min) to 280 °C at 15 °C min⁻¹ (10 min). Helium (alpha 2 from Air Liquide-France) was used as carrier gas (1 ml min⁻¹). The transfer line and ionization temperatures were 200 and 250 °C, respectively.

All compounds were identified by their retention time on the chromatogram and their specific ions *m/z* on the mass spectrum. Peak areas were obtained with ion extraction from the chromatogram generated by the total ion current (TIC).

Extractions and GC–MS analyses were done in triplicate.

In order to see if earthworms were responsible for any soil acidification (acid rejections), pH was measured in terraria 11, 12 and 13 (Table 1) that differed only by invertebrate presence. The method used a glass-electrode meter in a 1:2.5 w/v suspension of soil in de-ionised water (Allen, 1989).

2.6. Statistics

Following analysis of variance (ANOVA) using the SPSS program (standard version 11.0, SPSS Inc.), Tukey's test was used to compare the differences between enzyme activities according to the treatment applied, relative to the controls and time of exposure. The same method was used to compare pesticide breakdown in terraria. Homogeneity of variances was tested using Levene's test. If the dependent variables were not homogeneous even after logarithmic transformation, non-parametric Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests were used instead of ANOVA. The probability level for statistical significance was $P < 0.05$ (or $P < 0.1$ for a few data indicated). All values are presented as mean ± SD.

3. Results

3.1. Biomarker responses under laboratory conditions (ChE, GST and CAT)

GST and CAT are directly or indirectly involved in the biotransformation process in earthworms and their activity variations are analyzed collectively. Fig. 1 shows an overall picture for GST (Fig. 1a) and CAT (Fig. 1b) activities during the first 14 days of the laboratory experiment.

After three days of exposure, statistically significant differences were found between the controls and the treated earthworms (Kruskal–Wallis, $P < 0.05$). In fact, CAT activity (Fig. 1b) increased in the earthworms exposed

mainly to fungicides (Mann–Whitney, $P < 0.01$ for F treatment and $P < 0.1$ for IF max). GST activity (Fig. 1a) was higher than controls under insecticide exposure (Kruskal–Wallis, $P < 0.05$; Mann–Whitney, $P < 0.1$ for IF max). After seven days, no significant difference in the two enzyme activities was found between controls and pesticide treatments (GST: ANOVA, $F = 0.26$, Tukey, $P \gg 0.05$ and CAT: Kruskal–Wallis, $P \gg 0.05$) i.e. the activity levels were similar to the controls. Finally, after 14 days of exposure, catalase activity was clearly inhibited by insecticides and/or fungicides at maximal doses (Fig. 1b): Kruskal–Wallis, $P < 0.001$; Mann–Whitney, $P < 0.001$ for I max and IF max and $P < 0.1$ for F max). The glutathione-S-transferase activity decreased significantly compared to the controls (Fig. 1a) with insecticide exposure (Kruskal–Wallis, $P < 0.001$; Mann–Whitney, $P < 0.001$ for I max and IF max and $P < 0.1$ for I treatment).

The ChE activity study allowed us to understand the possible neurotoxicity of pesticides for *A. caliginosa nocturna*. An overall picture of ChE activity in earthworms exposed to different compounds and concentrations for 14 days is given in Fig. 2. After three days exposure, ChE activity was directly related to the pesticide treatment applied in the terrarium (Kruskal–Wallis, $P < 0.01$). An inhibition was noticed in earthworms exposed to insecticides (Mann–Whitney, $P < 0.1$ for I treatment and $P < 0.005$ for I max) or fungicides at the maximal dose (Mann–Whitney, $P < 0.001$). After seven days, the inhibition persisted under the maximal doses, but it was not as intense as after 3 days. Finally, the pesticide exposure had an important effect after 14 days. The ChE activity decreased significantly in almost all treated earthworms compared to controls (ANOVA, $F = 3.9$, Tukey, $P < 0.05$).

Variations in enzyme activities after 34 days exposure could not be interpreted clearly (results not shown) because worms were thinner and less active than in the first days of the experiment, and fewer proteins could be extracted.

3.2. Variations of total protein concentrations

In order to determine specific activity for biomarker studies, the quantity of protein extracted from the earthworm tissues was also evaluated at each sampling date. We noticed that during the first 14 days these quantities were almost the same. However, for the treated earthworms (not controls), statistically significant differences (non-parametric Mann–Whitney's test) were found in the quantity of proteins between the mean value for the first 14 days and the value after 34 days. There were fewer proteins in the earthworms sampled after 34 days of exposure than in the worms collected during the first 14 days of the laboratory experiment (Fig. 3).

3.3. Pesticide concentrations in earthworms and soil

For each terrarium, the pH was measured at the beginning of the experiment and again after 34 days in the

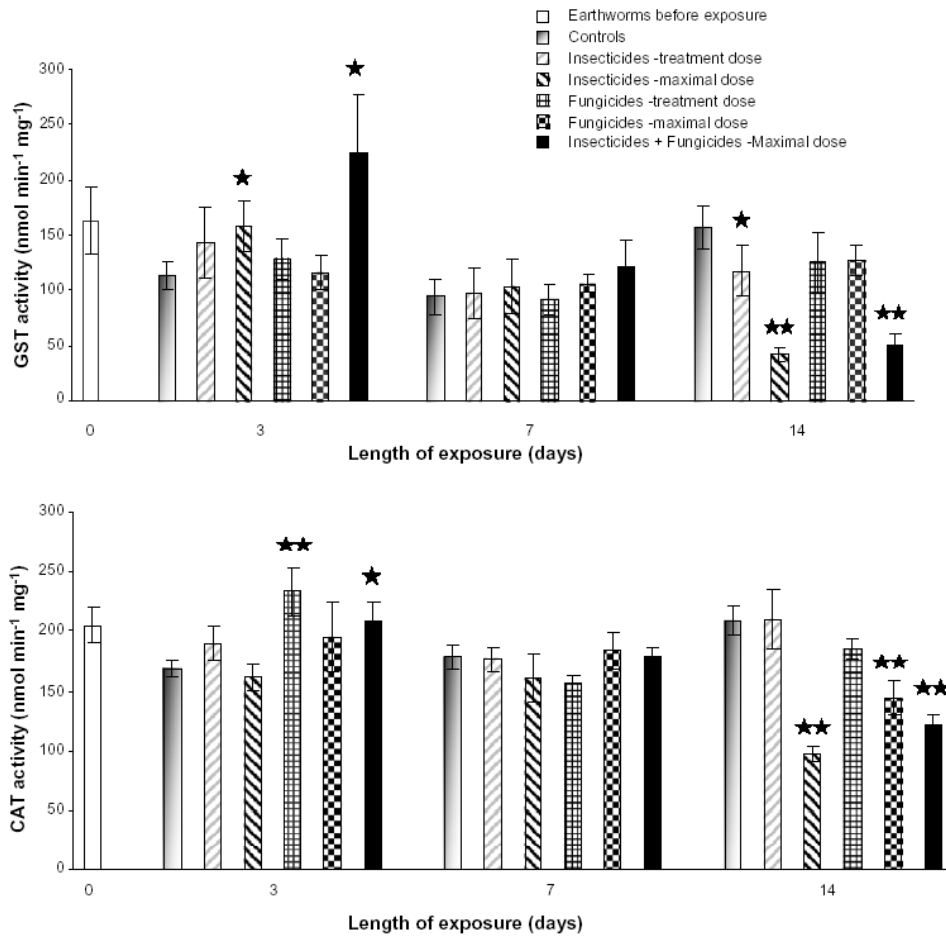


Fig. 1. Glutathione-S-transferase (a) and catalase (b) activities of the earthworm *A. caliginosa nocturna* exposed to a mixture of insecticides and/or fungicides in soil for 0, 3, 7 and 14 days. Bars are the mean of 10 replicates (\pm SD), i.e. 10 earthworms analyzed for each container. Data sharing 2 stars (★★) are significantly different from controls at $P < 0.05$, those with only 1 star (★) are significantly different at $P < 0.1$.

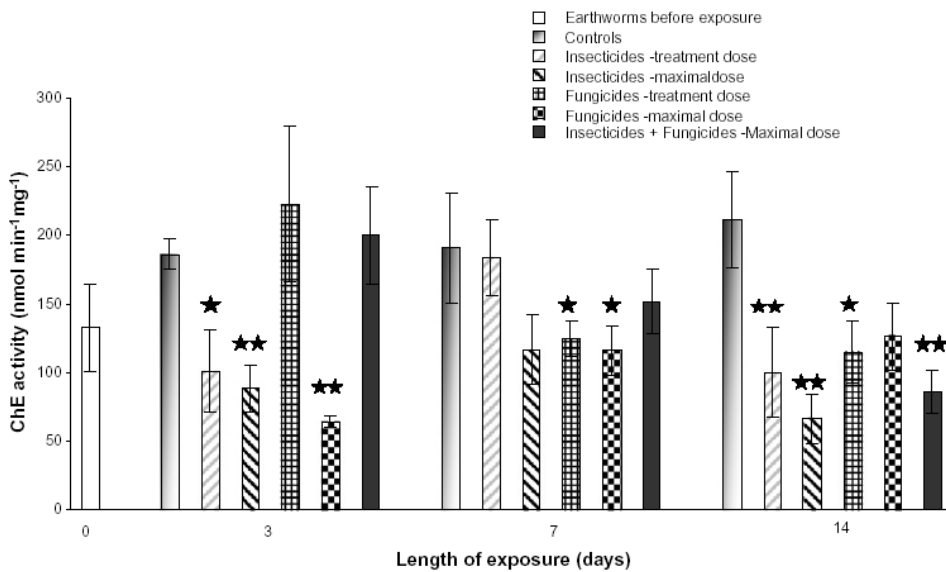


Fig. 2. Cholinesterase activity of the earthworm *A. caliginosa nocturna* exposed to a mixture of insecticides and/or fungicides in soil for 0, 3, 7 and 14 days. Bars are the mean of 10 replicates (\pm SD), i.e. 10 earthworms analyzed for each container. Data sharing 2 stars (★★) are significantly different from controls at $P < 0.05$, those with only 1 star (★) are significantly different at $P < 0.1$.

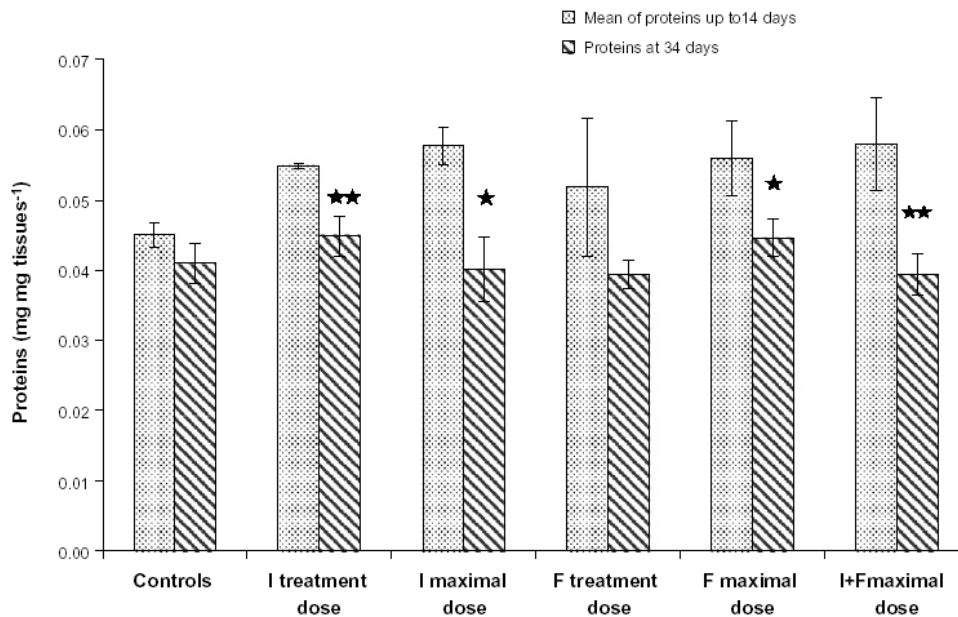


Fig. 3. Quantity of proteins extracted from earthworm tissues ($\text{mg mg tissues}^{-1}$). The first bars are the mean of 10 replicates for 3 durations (3, 7 and 14 days of exposure) and the second are the mean of 10 replicates after 34 days of exposure. Data sharing 2 stars (★★) are significantly different from the mean up to 14 days at $P < 0.05$, those with only 1 star (★) are significantly different at $P < 0.1$.

climate chamber. There was no difference over this time, with (terrarium 1), or without (terrarium 13) earthworms.

No pesticide was detected in the earthworm tissues by the two extraction methods (ASE 100 or Polytron homogenizer) followed by the GC–MS analysis, even after exposure to all treatments at the highest concentrations.

Measuring pesticide residues in the soil of the different terraria after 34 days is important to ascertain their rate of breakdown and thus to understand the possible role of earthworms in this process. Limit of detection (LOD) for pesticides was 0.55 ng g^{-1} of soil for metalaxyl and myclobutanil, 3 ng g^{-1} of soil for λ -cyhalothrin and chlorpyrifos-ethyl and 12.5 ng g^{-1} for folpet. We were not able to extract and detect the fosetyl-Al.

Table 2 shows pesticide breakdown after 34 days in the most contaminated terraria: *IF* max with invertebrates (11&12), and *IF* max without earthworms (13). We noticed that the concentrations of all detected molecules were lower in the terrarium with earthworms. Breakdown was significantly faster in presence of *A. caliginosa nocturna* (Table 2, ANOVA, $P < 0.05$).

4. Discussion

The data presented in this study shows that activity of the three enzymes in the controls varied over a short period of 14 days. Arnaud et al. (2000) have already observed these basal level changes which indicate the high sensitivity of biomarkers even in worms kept in clean and stable conditions. In the exposed earthworms, the responses were variable and without consistent dose-response reactions. However, although not all differences were significant, a real effect due to pesticide exposure was noticed, even when the concentrations were at environmental doses. This variability could be explained by the choice of a heterogeneous worm population, representative of the vineyard. Age, body size, metabolic rate and internal homeostasis of the specific organisms affect toxic effects and biomarker responses (Laszczyca et al., 2004; Reinecke and Reinecke, 2007a,b).

To clarify pesticide metabolism by organisms, two enzymes are commonly used: GST and EROD because they take part in the detoxification metabolism by regulating intracellular homeostasis (Lukkari et al., 2004; Monteiro et al., 2007). However, as reported by Brown et al.

Table 2

The fate of pesticides after 34 days in the containers treated with the insecticide + fungicide mixture at the maximal dose (*IF* max) that could be sprayed in the vineyards ($\% \pm \text{SD}$ of compounds remaining) – Impact of earthworm presence

Container	Percentage of pesticide remaining in the container soil after 34 days in the climate chamber ($\% \pm \text{SD}$)				
	Chlorpyrifos-ethyl	λ -Cyhalothrin	Folpet	Metalaxyl	Myclobutanil
<i>I + F</i> maximal dose with earthworms	4.1 ± 0.2	14.7 ± 0.6	ND	19.1 ± 0.8	17.2 ± 0.7
<i>I + F</i> maximal dose without earthworms	21.1 ± 0.9	99 ± 4.2	ND	99.4 ± 4.4	28.1 ± 1.3

(2004), EROD activity could not be detected in our controls or in exposed worms, so there is either no cytochrome P4501a in *A. caliginosa nocturna*, or the EROD assay is not suitable for the activity measurement in this species. Consequently, pesticide metabolism was only studied via GST activity. Moreover, it has often been reported that the metabolism of organic molecules involves free radical production (Mosleh et al., 2005) and therefore this study focuses on catalase, an antioxidant enzyme that takes part indirectly in the pesticide metabolism by targeting ROS (H_2O_2).

Exposure of earthworms to experimental conditions yielded an increase in CAT activity after three days of fungicide treatment, whereas there was no real GST activation. Thus, it seems that fungicides are not metabolised by the phase II system involving GST. Insecticides did not induce increased CAT activity after three days. This suggests that catalase activity may have been induced before and was stabilised by this time as described by Brown et al. (2004) or alternatively, that the metabolism did not cause ROS production. Insecticides were metabolised via a phase II biotransformation shown by GST activation.

After seven days of exposure, GST and CAT activity decreased to control levels. Saint-Denis et al. (2001) observed that, in the earthworm *Eisenia fetida andrei*, GST activity was already decreased after two days exposure to lead acetate.

The two enzymes were later inhibited after 14 days of exposure in the earthworms exposed to fungicides and/or insecticides, especially at maximal concentrations. This inhibition could be due to toxic stress. According to Cossu et al. (1997), pollution involves an induction of antioxidant enzymes allowing the organisms to partially or totally overcome stress resulting from exposure to an unsafe environment. However, too great toxicity involves their inhibition, although, the CAT activity decrease could be explained too by the presence of the reactive oxygen species O_2^- . Here, when the system works correctly, superoxide dismutase catalyzes the dismutation of superoxide into oxygen and hydrogen peroxide. But, when the quantity of O_2^- is too great, they become catalase inhibitors (Kono and Fridovich, 1982; Geret et al., 2002), i.e. the severe toxic stress implies insufficient metabolism.

Insecticides (and fungicides at the maximal dose) had a neurotoxic effect on *A. caliginosa nocturna* and the ChE enzyme was inhibited after three days exposure. This phenomenon has already been observed in *A. caliginosa* (Reinecke and Reinecke, 2007a,b).

After 14 days exposure, the decrease in ChE activity could be linked to the strong inhibition already noticed for GST and catalase. This might indicate a severe toxic stress for this length of time. The enzymes cannot cope with acute toxic stress that involves an inhibition, maybe due to cellular dysfunction or apoptosis (Sweet et al., 1999; Brown et al., 2004). Moreover, after 34 days, a reduction in total protein content is found in earthworms exposed to pesti-

cides (especially insecticides). Protein syntheses may stop or catabolism might occur in earthworms exposed for a long period. The considerable enzymatic inhibition after 14 days might be a first sign of pesticide impact, whereas the reduction of total proteins might be the secondary effect (as found for pesticides such as pyrethroids and metalaxyl by Ismail et al. (1997) in *A. caliginosa* and by Mosleh et al. (2003) in *L. terrestris*).

Chemical analysis showed that pesticide bioaccumulation in earthworm tissues was very low (under LOD) or absent. But since GST and CAT activation showed that pesticides were metabolized, it is normal that precursor molecules were not found in the earthworm tissues.

The comparison of pesticide residues in terraria after 34 days in the climate chamber suggested that earthworms take part in soil pesticide breakdown because the degradation rate increased with the presence of earthworms. They could indirectly play a part in the increase of physico-chemical and microbial degradation by their burrowing and bioturbation activities. There was no change in soil pH after 34 days in the different terraria, therefore this was not the cause of pesticide degradation. So, we suggest a potential role of earthworms in soil detoxification. . .

To conclude, this laboratory experiment shows that pesticide spraying using typical vineyard mixtures is neurotoxic for a non selected population of *A. caliginosa nocturna*. The molecules that are metabolised involve free radical production. After two weeks exposure, worms suffer physiological disturbances, however, they may take part in soil pesticide degradation. Genetic approaches and pesticide tracking using labeled molecules would be complementary techniques to the existing enzymatic and analytical methods.

Acknowledgments

We thank the DEVT for their technical collaboration and Syngenta Agro for supplying 2 pesticides. We are grateful to Jean-Luc Carayon and Nathan Téné for their assistance in the experimental set-up and soil analyses, and Adrian Pavely for reviewing the language of this paper.

References

- Allen, S.E., 1989. Chemical Analysis of Ecological Materials, second ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Arnaud, C., Saint-Denis, M., Narbonne, J.F., Soler, P., Ribera, D., 2000. Influences of different standardised test methods on biochemical responses in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. Soil Biol. Biochem. 32, 67–73.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- Brown, P.J., Long, S.M., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Hankard, P.K., 2004. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. Chemosphere 57, 1675–1681.
- Conte, E., Milani, R., Morali, G., Abballe, F., 1997. Comparison between accelerated solvent extraction and traditional methods for the analysis of the herbicide diflufenican in soil. J. Chromatogr. 765, 121–125.

- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38, 122–131.
- Day, K.E., Scott, I.M., 1990. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquat. Toxicol.* 18, 101–114.
- Denoyelle, R., Rault, M., Mazzia, C., Mascle, O., Capowiez, Y., 2007. Cholinesterase activity as a biomarker of pesticide exposure in *Allolobophora chlorotica* earthworms living in apple orchards under different management strategies. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 2644–2649.
- Ellman, G., Courtney, K., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., Bebianno, M.J., 2002. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussates*. *Biomarkers* 7, 242–256.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Ismail, S.M.M., Ahmed, M.T., Mosleh, Y.Y., Ahmed, Y.M., 1997. Comparative toxicity, growth rate and biochemical effect of certain pesticides on earthworm *Aporrectodea caliginosa*. In: Proceedings of the Seventh National Congress on Pests and Diseases of Vegetables and Fruits in Egypt, Ismailia, Egypt, pp. 682–700.
- Jacobson, A.R., Dousset, S., Guichard, N., Baveye, P., Andreux, F., 2005. Diuron mobility through vineyard soils contaminated with copper. *Environ. Pollut.* 138, 250–259.
- Jemec, A., Drobne, D., Tišler, T., Trebše, P., Roš, M., Sepčić, K., 2007. The applicability of acetylcholinesterase and glutathione-S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. *Comp. Biochem. Physiol.* 144, 303–309, Part C.
- Jensen, S., Johnels, A.G., Olsson, M., Otterlind, G., 1969. DDT and PCB in marine animals from Swedish waters. *Nature* 224, 247–250.
- Kawata, K., Asada, T., Oikawa, K., 2005. Determination of pesticides in compost by pressurized liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1090, 10–15.
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257, 5751–5754.
- Laszczyca, P., Augustyniak, M., Babczynska, A., Bednarska, K., Kafel, A., Migula, P., Wilczek, G., Witas, I., 2004. Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). *Environ. Int.* 30, 901–910.
- Lukkari, T., Taavitsainen, M., Soimasuo, M., Oikari, A., Haimi, J., 2004. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier metal exposure. *Environ. Pollut.* 129, 377–386.
- Monteiro, M., Quintaneiro, C., Nogueira, A.J.A., Morgado, F., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2007. Impact of chemical exposure on the fish *Pomatoschistus microps* Krøyer (1838) in estuaries of the Portuguese Northwest coast. *Chemosphere* 66, 514–522.
- Mosleh, Y.Y., Paris-Palacios, S., Couderchet, S., Vernet, G., 2003. Effects of the herbicide isoproturon on survival, growth rate, and protein content of mature earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) and its fate in the soil. *Appl. Soil Ecol.* 23, 69–77.
- Mosleh, Y.Y., Paris-Palacios, S., Couderchet, M., Biagianni-Risbourg, S., Vernet, G., 2005. Metallothionein induction, antioxidative responses, glycogen and growth changes in *Tubifex tubifex* (Oligochaete) exposed to the fungicide, fenhexamid. *Environ. Pollut.* 135, 73–82.
- Popp, P., Keil, P., Moder, M., Paschke, A., Thuss, U., 1997. Application of accelerated solvent extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in solid wastes. *J. Chromatogr.* 774, 203–211.
- Reinecke, S.A., Reinecke, A.J., 2007a. The impact of organophosphate pesticides in orchards on earthworms in the Western Cape, South Africa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 244–251.
- Reinecke, S.A., Reinecke, A.J., 2007b. Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 92–101.
- Römbke, J., Jänsch, S., Didden, W., 2005. The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62, 249–265.
- Saito, K., Sjödin, A., Sandau, C.D., Davis, M.D., Nakazawa, H., Matsuki, Y., Patterson Jr., D.G., 2004. Development of an accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography analytical method for measuring persistent organohalogen compounds in adipose and organ tissue analysis. *Chemosphere* 57, 373–381.
- Saint-Denis, M., Labrot, F., Narbonne, J.F., Ribera, D., 1998. Glutathione, glutathione related enzymes and catalase activities in the worm *Eisenia fetida*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 594–606.
- Saint-Denis, M., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Ribera, D., 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate. *Soil Biol. Biochem.* 33, 395–404.
- Stenersen, J., Brekke, E., Engelstad, F., 1992. Earthworms for toxicity testing; species differences in response towards cholinesterase inhibiting insecticides. *Soil Biol. Biochem.* 24, 1761–1764.
- Sweet, L., Passino-Reader, D., Meier, P., Omann, G., 1999. Xenobiotic induced apoptosis: significance and potential application as a general biomarker of response. *Biomarkers* 4, 237–253.
- Xiao, N., Jing, B., Ge, F., Liu, X., 2006. The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Eisenia fetida* under laboratory conditions. *Chemosphere* 62, 1366–1373.

2.3 Ecologie des lombrics sur la parcelle

2.3.1 Identification des genres en présence

D'après les échantillonnages réalisés sur la parcelle et l'analyse ultérieure des individus matures, 2 genres majoritaires sont présents sur ce sol viticole du terroir gaillacois : *Lumbricus* et *Aporrectodea* parmi lesquels les espèces les plus représentées sont, d'après les dénominations de **Bouché (1972)** :

- *Nicodrilus nocturnus* (***Aporrectodea caliginosa nocturna***)
- *Nicodrilus terrestris*
- *Lumbricus friendi*
- *Lumbricus centralis*

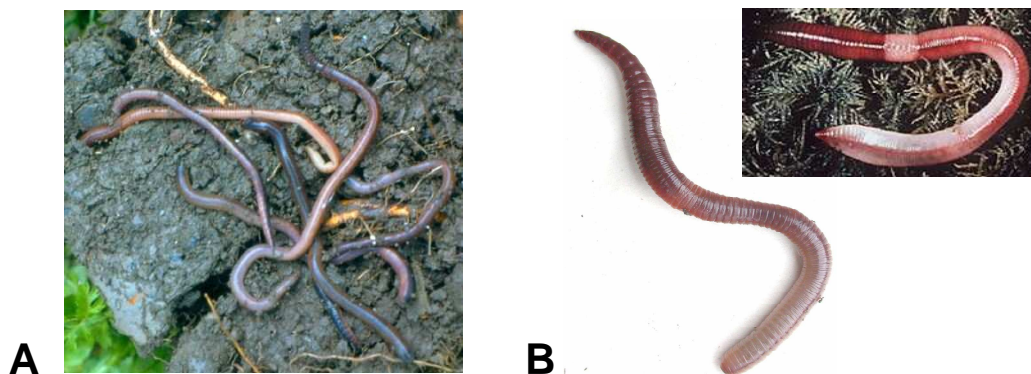


Figure 3.15 : Espèces de lombriciens les plus représentées sur la parcelle
A- *Nicodrilus nocturnus* (***Aporrectodea caliginosa nocturna***) B- *Lumbricus friendi*

Source : homepage.sunrise.ch ; www-biol.paisley.ac.uk ; www.amystewart.com

Les 2 espèces les plus fréquemment retrouvées sur la parcelle sont (Figure 3.15) :

- ***Nicodrilus nocturnus* (*Aporrectodea caliginosa nocturna*)**, qui est une espèce assez polymorphe, d'une longueur de 90 à 180 mm pour une largeur de 4 à 5 mm, et contenant entre 180 et 250 segments (**Bouché, 1972**).

Son épithélium est assez rigide, la pigmentation cutanée est irisée brun-noirâtre avec des gradients antéro-postérieur et dorso-ventral. Il s'agit d'une espèce neutrophile, fortement acido-tolérante, vivant dans des milieux peu organiques (comme le sol viticole de Gaillac). Cette espèce partage souvent son territoire avec *Nicodrilus*

terrestris ; il s'agit de vers anéciques (vivant dans des galeries verticales profondes mais se nourrissant en surface).

- ***Lumbricus friendi*** est aussi une espèce assez monotypique, d'une longueur de 120 à 230 mm pour une largeur de 7 à 9 mm, et contenant entre 108 et 180 segments (Bouché, 1972). Son aspect « trapu » et sa pigmentation cutanée rouge pourpre le rendent facilement reconnaissable, notamment par comparaison avec le genre *Nicodrilus*. Neutrophiles acido-tolérants, les *Lumbricus friendi* peuvent vivre eux aussi dans des sols assez pauvres en matière organique. Cette espèce est peu sensible au relief, elle présente une position intermédiaire vis à vis des catégories écologiques anéciques et épigées.

Nous nous focaliserons dans le cadre de nos travaux sur les 2 genres, la distinction des espèces s'avérant trop difficile pour une analyse en routine (compte tenu du grand nombre de vers à identifier et de la difficulté d'identification des juvéniles).

Des **vers endogés** sont également représentés, reconnaissables à leur corps très pâle. Ils représentent 20 à 50 % de la biomasse des terres fertiles et vivent en permanence dans le sol où ils creusent des galeries horizontales (**Bouché, 1984**). Ils ne sont pas pigmentés. Ils ont une fécondité moyenne 8 à 27 cocons par adulte et par an. Ils se nourrissent de terre plus ou moins riche en matière organique. En période de sécheresse ils tombent en léthargie et on les trouve enroulés sur eux-mêmes. Les vers endogés présentent des modes de vie assez différenciés. Certains sont filiformes et s'installent le long des racines, d'autres forment des pelotes dans les couches profondes du sol, à proximité des drains, et filtrent l'eau dont ils séparent les particules organiques. On en connaît aussi qui sont prédateurs d'autres vers de terre.

2.3.2 Répartition et variabilité des lombriciens sur la parcelle expérimentale

L'ensemble des prélèvements de vers réalisés sur la parcelle (11 au total) met en évidence une évolution temporelle du nombre de vers recensés par modalité.

Les graphiques des figures 3.16 et 3.17 ci-dessous représentent pour chacune des modalités et pour les témoins la moyenne du nombre de vers collectés sur 3 prélèvements par modalité en fonction de la date de collecte. Ces 3 points de prélèvements sont répétés et similaires (coordonnées GPS proches) dans le temps, d'une date à l'autre.

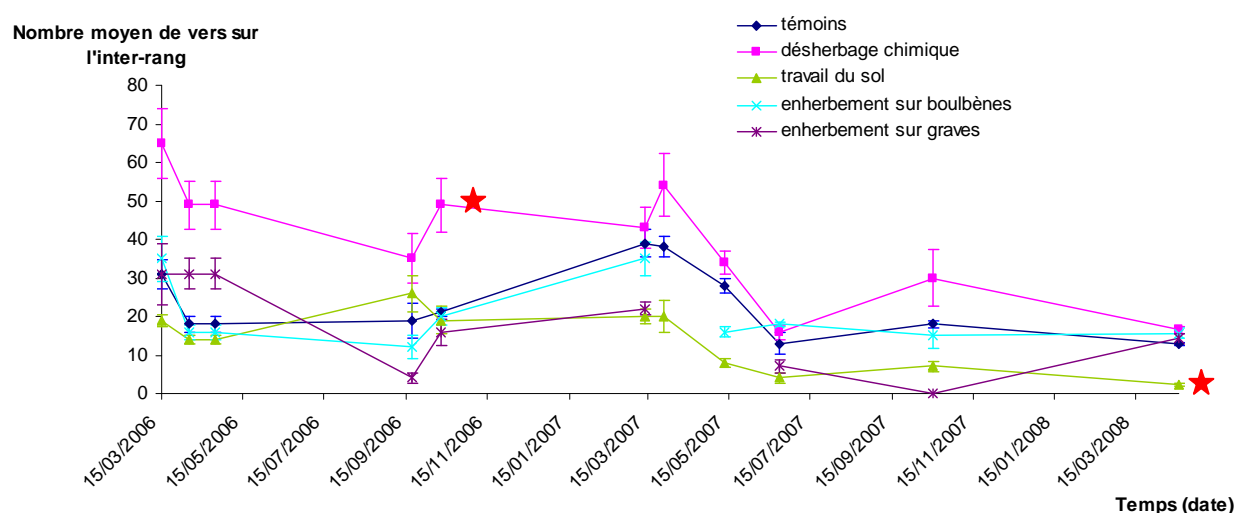


Figure 3.16 : Evolution du nombre de lombrics par m² sur les inter-rangs de chacune des modalités

Concernant les inter-rangs, la comparaison des dynamiques de populations révèle un effet de la pratique culturale (Figure 3.16). En effet, nous constatons tout d'abord que les lombrics sembleraient plus abondants en 2006 et 2007 sur la modalité désherbée chimiquement. Une différence significative (test de Kruskal Wallis, $p < 0,05$) est observée au printemps 2006 (et 2007) bien que l'on soit en période d'épandage d'herbicides. Il semblerait en effet que les lombrics puissent facilement s'adapter aux conditions de pollution et notamment à la présence de glyphosate dans le sol (**Santos, 2008**). Par ailleurs, le traitement phytosanitaire de la vigne de la modalité désherbée par un herbicide de post-levée en sortie d'hiver permet la destruction du couvert végétal à l'origine d'un apport important en matière organique (bien que ponctuel), ce qui est propice au développement des vers à la sortie de l'hiver, notamment ceux du genre *Lumbricus* plus sensibles au taux de matière organique des sols. Par ailleurs, bien qu'elle ait une évolution assez proche de la bande enherbée témoin au cours de l'année 2006, la modalité travaillée semble ensuite se distinguer par un nombre de vers recensés par m² inférieur à celui des

autres modalités. Cette tendance est assez remarquable au printemps et plus précisément en avril 2008 (différence significative d'après le test de Kruskal Wallis, $p < 0,05$), lors des prélèvements suivant un labour du sol à l'actisol (23/03/2007 ; 11/05/2007 et 16/04/2008 ; Figure 3.1). Ceci peut s'expliquer par le fait que le labour détruit l'habitat des vers anéciques et épigés qui s'échappent alors à chaque passage. Ils peuvent également être blessés ou tués par la lame... mais également mangés par des oiseaux (aigrettes notamment) qui suivent activement le tracteur lorsqu'il retourne le sol, à la recherche de nourriture. Enfin, nous remarquons que la modalité enherbée sur boubènes évolue de façon tout à fait similaire à la bande enherbée témoin. Outre le fait que le couvert végétal ait été semé et qu'il soit régulièrement tondu sur la modalité 3, ces 2 placettes correspondent aux mêmes conditions de type et d'entretien du sol. Il semble donc logique que les vers qu'elles hébergent aient une dynamique de population similaire. Par contre, le type de sol pourrait avoir une influence sur le peuplement de lombrics comme en témoigne la figure 3.16 montrant une évolution souvent différente du nombre de vers entre la modalité enherbée sur sol de graves et celle sur sol de boubènes.

Au niveau des rangs, rien ne peut être clairement établi pour l'année 2006 (Figure 3.17). Le nombre de vers moyen par m^2 oscille fortement au sein de chacune des modalités tout comme d'une modalité à l'autre (beaucoup plus qu'au niveau des inter-rangs). Globalement, il n'y a pas de différence significative entre les modalités (ayant toutes subi le même traitement phytosanitaire et le même entretien par désherbage) et le témoin en 2006 et 2007. Cette différence existe toutefois lors du prélèvement du 16 avril 2008 (test de Kruskal Wallis, $p < 0,05$), soit plus de 3 ans après la mise en place de l'expérimentation. Toutes les modalités se rejoignent en 2008, s'éloignant ainsi de la courbe de la bande enherbée témoin... ceci pouvant être le témoignage de l'effet cumulé du désherbage et de l'action des insecticides et fongicides sur les invertébrés du sol.

Enfin, il n'y a pas de différence significative entre le nombre de vers collectés sous le rang et le nombre collecté sur l'inter-rang pour chacune des dates de prélèvement envisagées.

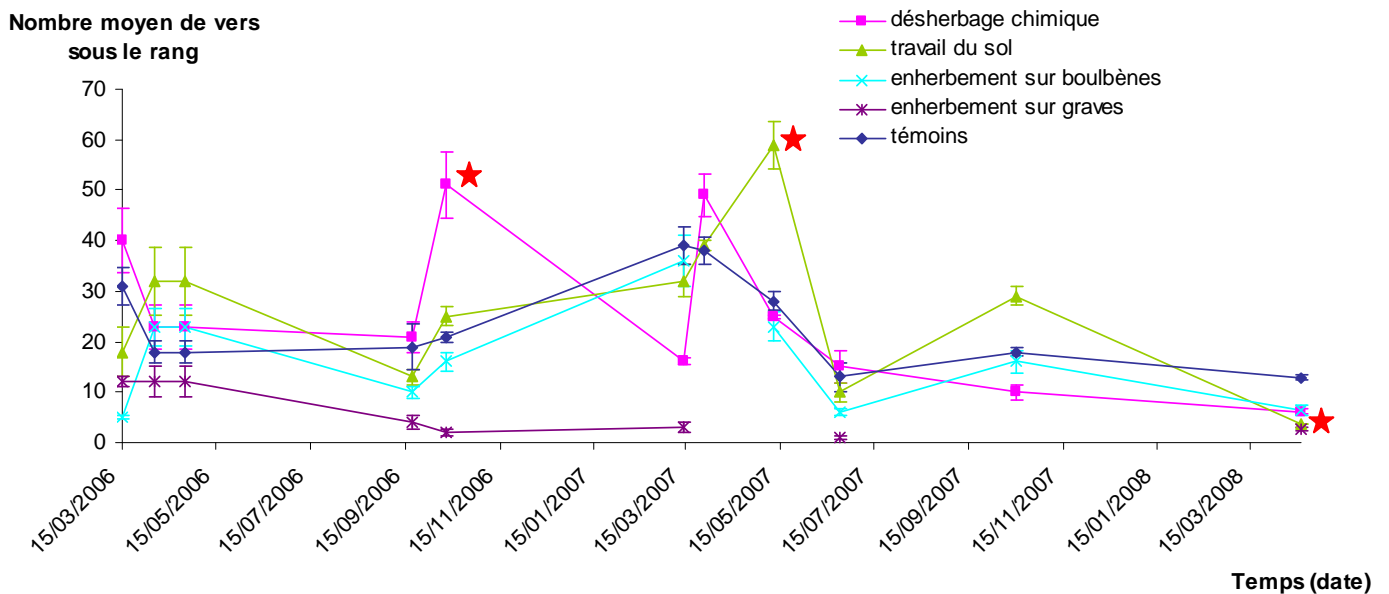


Figure 3.17 : Evolution du nombre de lombrics par m² sous les rangs de chacune des modalités

Les 2 prélèvements de l'automne 2006 et du printemps 2008, ayant été réalisés sur 10 points par modalité d'entretien des sols, permettent de mettre en évidence les genres de lombrics en présence et leur répartition par m² sur chaque placette.

Le **prélèvement « bilan » de 2006** a été réalisé à l'automne, plusieurs mois après la fin des épandages phytosanitaires (fin juillet) mais peu de temps après le passage de la machine à vendanger qui tasse un peu le sol (**Richard et al., 1999**).

A cette date, 2 genres de lombrics sont identifiés à partir des vers matures collectés. De nombreux juvéniles sont donc à cette date comptés comme tels sans pouvoir établir leur appartenance à l'un ou l'autre des 2 genres répertoriés.

La figure 3.18 présente la répartition des lombrics (genres identifiés) sur les différentes modalités d'entretien des sols et le témoin en octobre 2006.

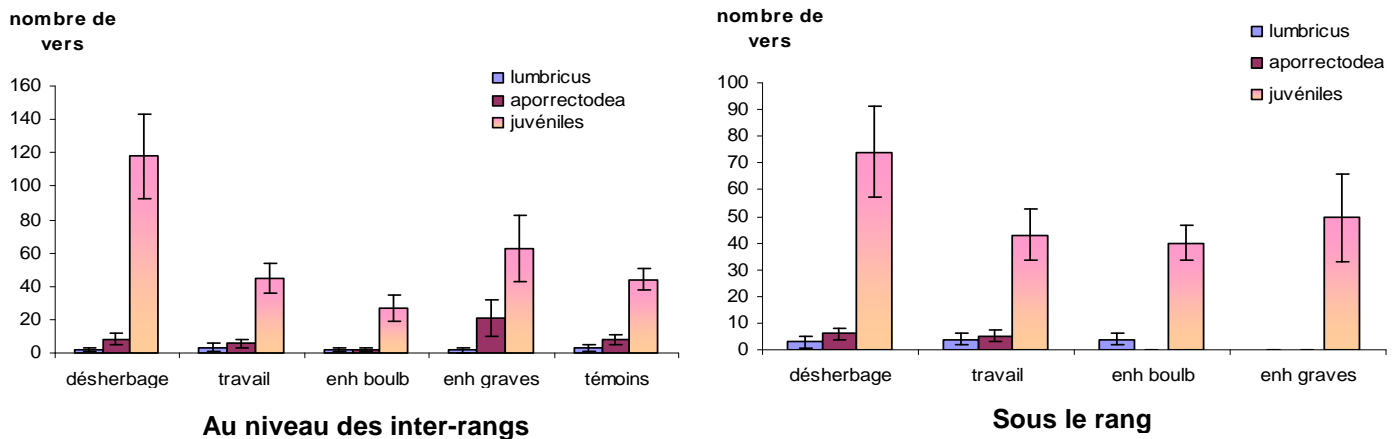


Figure 3.18 : Répartition du nombre de vers identifiés par m² (*Aporrectodea*, *Lumbricus* et *juvéniles*) au niveau des inter-rangs et sous le rang de chacune des modalités d'entretien du sol et sur la bande enherbée témoin à l'automne 2006

On note la présence en grande proportion de vers juvéniles. La parcelle expérimentale fortement perturbée ces dernières années (arrachage du système de grandes cultures, mise en place de la parcelle viticole et plantation des vignes...) commence à se repeupler, ce qui pourrait expliquer la forte proportion de juvéniles à cette période. Par ailleurs, la période de plus grande activité pour les lombrics est l'automne, lors de la décomposition de la matière organique dans le sol. Ils sont alors assez nombreux après une période de diapause durant la sécheresse estivale et les juvéniles très présents.

La figure 3.19 montre que parmi les vers clitellés identifiés, les vers du genre *Aporrectodea* sont légèrement prédominants (pas de différence significative) par rapport au genre *Lumbricus* au niveau des inter-rangs. Toutefois, aucune influence significative d'une modalité d'entretien du sol sur la population de lombrics ne peut être mise en évidence clairement à l'automne 2006.

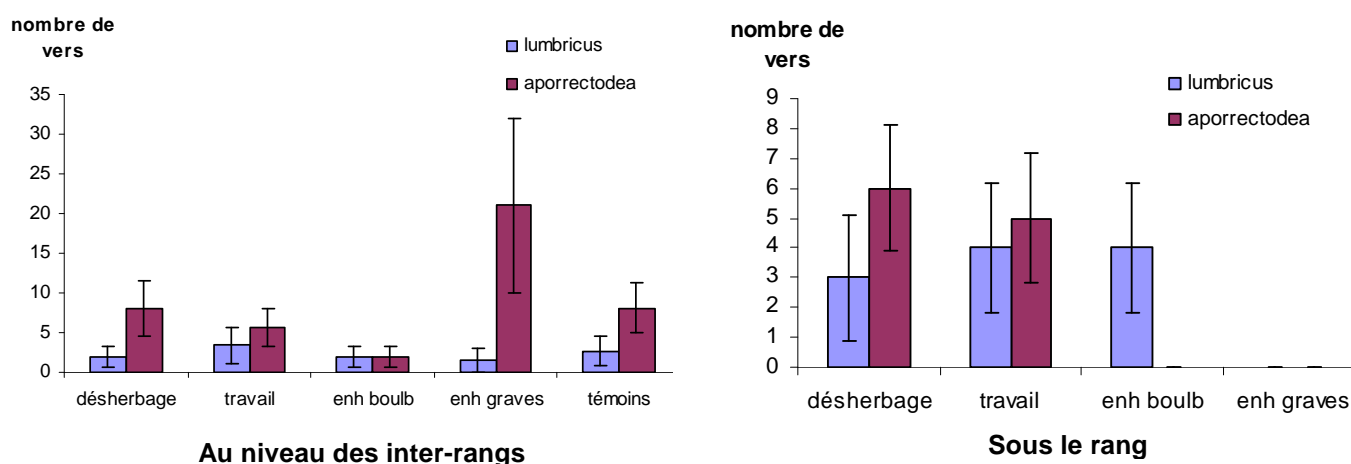


Figure 3.19 : Répartition du nombre de vers identifiés par m² (*Aporrectodea*, *Lumbricus*) au niveau des inter-rangs et sous le rang de chacune des modalités d'entretien du sol et sur la bande enherbée témoin à l'automne 2006

Au niveau des rangs, les placettes enherbées présentent à l'automne 2006 une majorité de juvéniles. Toutefois, nous remarquons que lorsque des adultes ont pu être identifiés, il n'y a pas de différence significative entre les différentes modalités (figure 3.19) : ce qui semble logique puisque elles subissent le même entretien des rangs de vigne.

Le **prélèvement « bilan » de 2008** est réalisé dans le but de suivre la dynamique de population après plus de 3 ans de mise en place du dispositif expérimental sur la parcelle. A cette date, la vigne, en place depuis 4 à 5 ans selon les rangs, n'est plus jeune, elle est bien développée. L'enherbement offre désormais un couvert végétal total des inter-rangs. Le prélèvement est ainsi effectué au printemps, seulement 8 jours après le travail du sol à l'actisol (15 cm de profondeur) et 13 jours après l'épandage de glyphosate sur la modalité entièrement désherbée chimiquement. Le couvert végétal qui s'était développé au cours de la période hivernale commence à faner au sol, la matière organique commence à être dégradée.

A cette date, les vers de terre ont quasiment tous pu être identifiés. Les lombrics immatures ne sont donc plus répertoriés comme juvéniles mais clairement identifiés par leur genre. Les endogés sont bien distincts également.

La figure 3.20 présente une vue générale de la répartition des genres en présence sur les inter-rangs des modalités de la parcelle en avril 2008.

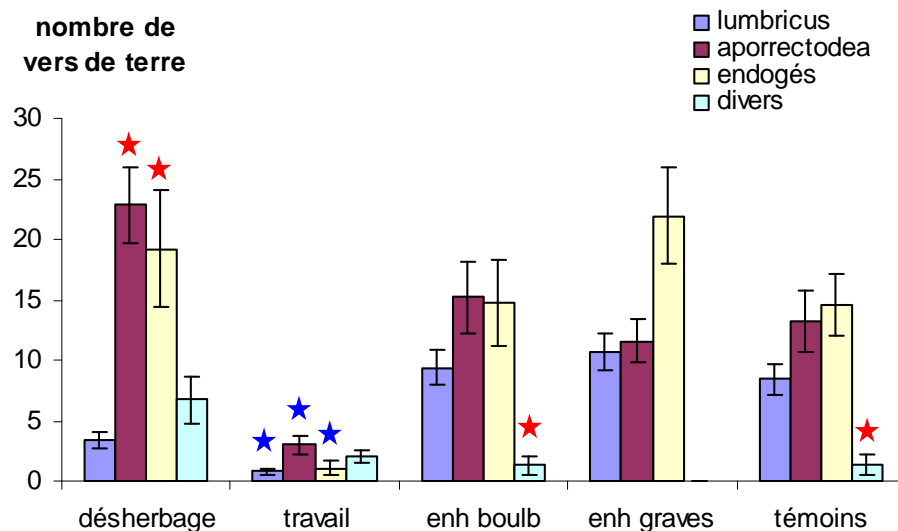


Figure 3.20 : Répartition du nombre de vers identifiés par m² (*Aporrectodea*, *Lumbricus* et endogés) au niveau des inter-rangs de chacune des modalités d'entretien du sol et sur la bande enherbée témoin au printemps 2008

- ★ = différence significative du genre pour une même modalité
- ★ = différence significative de la modalité pour un genre donné

Nous remarquons des densités de population cette fois assez variables d'une modalité à l'autre. La figure 3.16 avait déjà mis en évidence à cette date un effet de l'entretien du sol avec un nombre de vers total plus faible sur les inter-rangs travaillés. Ceci est confirmé avec les proportions de genres en présence. Tous les genres identifiés (*Aporrectodea*, *Lumbricus* et endogés) sont significativement moins nombreux dans cette zone labourée (ANOVA 2 entrées ou test de Kruskal-Wallis $p < 0,05$). Le passage de l'actisol seulement 8 jours auparavant a pu être la cause de cette diminution du nombre de vers en présence en comparaison avec les autres modalités (destruction des habitats des anéciques, blessures sur les vers présents en surface, présence d'aigrettes...).

Sur la modalité entièrement désherbée, la tendance évoquée précédemment d'une population de vers plus nombreuse que sur le témoin est remarquable ici aussi, notamment pour les vers du genre *Aporrectodea*. Toutefois, cette modalité compte proportionnellement beaucoup moins de *Lumbricus* que de vers des autres genres mais aussi moins que dans le témoin (ANOVA 2 entrées ou test de Kruskal-Wallis

$p < 0,05$). En effet, cette modalité est, durant la saison estivale, plus pauvre en matière organique et plus sèche du fait du désherbage intégral. Ainsi même si en sortie d'hiver, l'herbicide de post-levée favorise l'apport de matière organique au sol, après plus de 3 ans de désherbage régulier chaque année, le sol reste pauvre, ce qui constitue des conditions peu propices à la prolifération des *Lumbricus*, d'ordinaire retrouvés dans des sols un peu plus riches. Les *Lumbricus* ont certainement libéré une niche écologique occupée ensuite par les autres lombriciens. En fonction de l'entretien du sol, la répartition des genres est modifiée.

Sous le rang, les populations sont plus homogènes, il n'y a pas de différence significative d'une modalité à l'autre, ni d'un genre à l'autre (Figure 3.21).

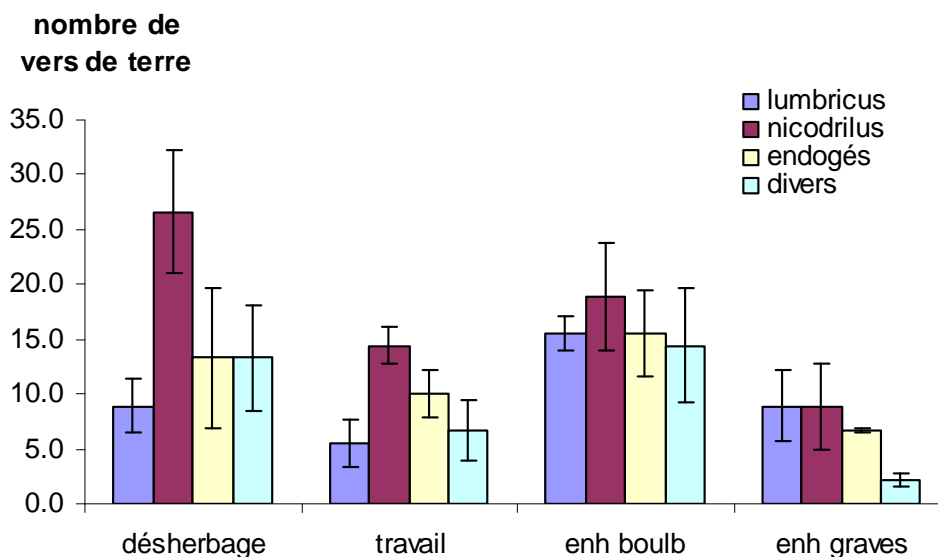


Figure 3.21 : Répartition du nombre de vers identifiés par m² (*Aporrectodea*, *Lumbricus* et endogés) sous les rangs de chacune des modalités d'entretien du sol au printemps 2008

En effet, les différences de genres répertoriés au sein d'une modalité et d'une modalité à l'autre sont beaucoup plus limitées.

Les conclusions tirées de cette analyse des densités de population au printemps 2008 montrent que l'écosystème de cette vigne a désormais trouvé un « équilibre » avec des populations assez homogènes au niveau des rangs, des entretiens du sol répétés sur plusieurs années pouvant être à l'origine d'un effet sur les lombrics en présence (notamment le désherbage total et le travail des inter-rangs, les modalités enherbées se comportant sensiblement comme la « prairie témoin »). Enfin, il est

indispensable de souligner que l'interprétation de ces données peut être modulée : la parcelle reste en effet assez hétérogène en terme de peuplement du fait du mode de vie des lombrics (organisation en niches, regroupement des populations) et de l'existence de zones refuges entre chacune des modalités.

Résumé :

L'étude de la répartition des lombrics sur la parcelle expérimentale montre une homogénéité au niveau des rangs. Les vers du genre Nicodrilus (Apporectodea) sont majoritaires sur la parcelle. Après 3 ans, l'effet cumulé des pesticides sous le rang se traduit par un nombre de vers significativement inférieur à la bande enherbée témoin.

L'étude comparative des inter-rangs révèle, au printemps 2008, un effet de la pratique culturale sur la répartition des lombriciens. Le labour du sol à répétitions détruit l'habitat des anéciques et des épigés entraînant ainsi une diminution du nombre de vers total. Le nombre de vers est globalement plus important sur la modalité désherbée chimiquement : les lombriciens s'adaptent facilement aux conditions de pollution. Toutefois, il y a proportionnellement moins de Lumbricus ; ceux-ci sont plus sensibles à la pollution, au manque d'humidité du sol nu et au manque de matière organique (même si le désherbage en crée un apport important au printemps).

2.4 Etude écotoxicologique sur les lombriciens et lien avec l'entretien des sols

L'effet des insecticides et des fongicides sur les lombrics a été simulé en conditions contrôlées.

L'étude des biomarqueurs sur les lombrics de la parcelle viticole a donc 2 objectifs :

- Il s'agit tout d'abord de voir au niveau des rangs si l'on retrouve l'effet engendré par les insecticides et les fongicides comme il a pu être évalué en conditions contrôlées. Les activités enzymatiques des vers prélevés sous les rangs sont alors comparées à celles des vers de la zone témoin.

- Ensuite, au niveau des inter-rangs, le suivi de biomarqueurs aura pour objectif de mettre en évidence l'existence ou non d'un effet de la pratique culturale sur les activités enzymatiques en présence des traitements insecticides et fongicides de la vigne. Les modalités sont donc comparées entre elles et au témoin.

Les résultats de l'étude des biomarqueurs sur les lombrics du genre *Aporrectodea caliginosa* prélevés sous le rang, entre les ceps de vigne sont présentés sur la figure 3.22.

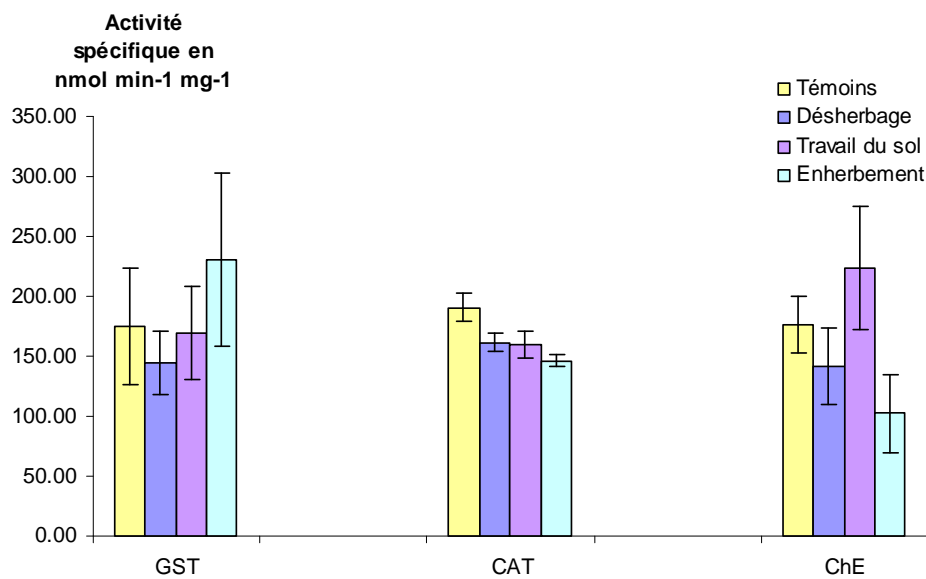


Figure 3.22 : Activités spécifiques des 3 enzymes suivies comme biomarqueurs sur les vers prélevés sous le rang le 22/06/2007 (après les épandages d'insecticides et de fongicides du printemps) pour chacune des modalités d'entretien du sol des inter-rangs et des témoins. Les barres de l'histogramme correspondent à une moyenne d'au moins 5 vers par modalité

Le test statistique non-paramétrique de Kruskal-Wallis montre qu'il n'y a pas de différence significative au seuil de 5% entre les différents groupes, et ceci pour chacune des activités enzymatiques testées. On ne peut donc pas conclure à un effet des insecticides ou/et des fongicides sous les rangs par rapport à la zone témoin, bien que l'on soit en pleine période d'épandage de produits phytosanitaires. Cette figure ne présente que les résultats d'activités enzymatiques des vers collectés en juin 2007. Il s'agit toutefois de la date la plus représentative de l'année du fait qu'elle soit située au cœur des événements phytosanitaires (figure 3.23).

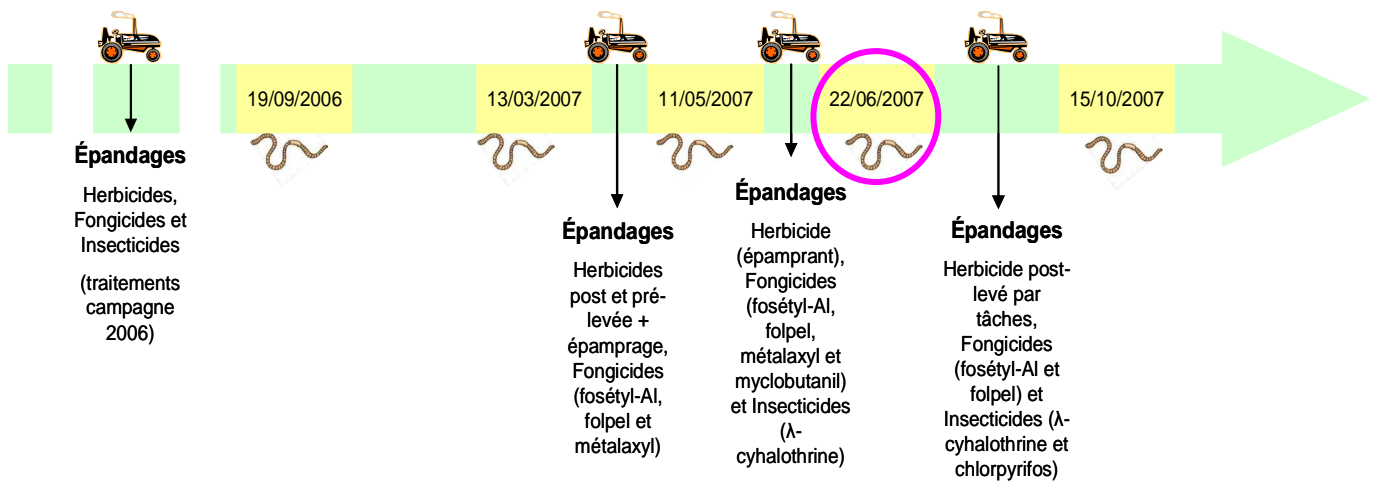


Figure 3.23 : Positionnement dans le temps des épandages sous le rang (identiques pour chacune des modalités) par rapport aux dates de prélèvement des lombrics. Les dates et les quantités précisément épandues sont répertoriées dans les tableaux 2.2 à 2.4

Au niveau des inter-rangs, les vers identifiés comme appartenant au genre *Aporrectodea* sont prélevés afin de mettre en évidence un effet de la pratique culturale sur les variations des différentes activités enzymatiques. La figure 3.24 présente ainsi pour chaque biomarqueur étudié les réponses enzymatiques des vers.

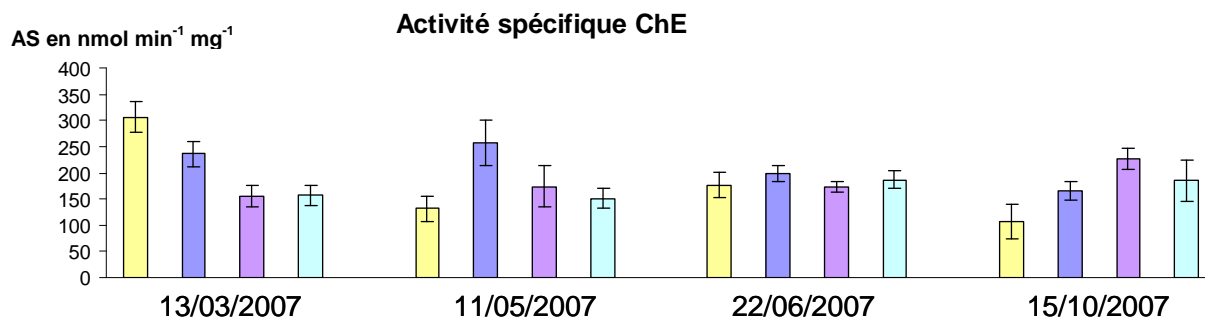
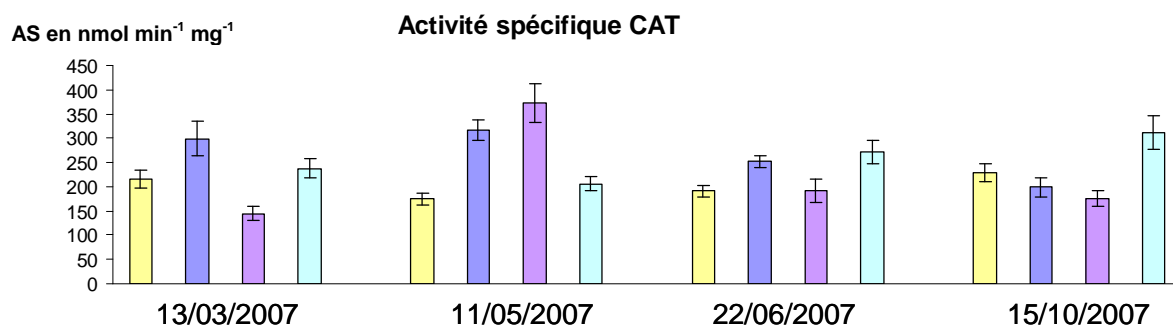
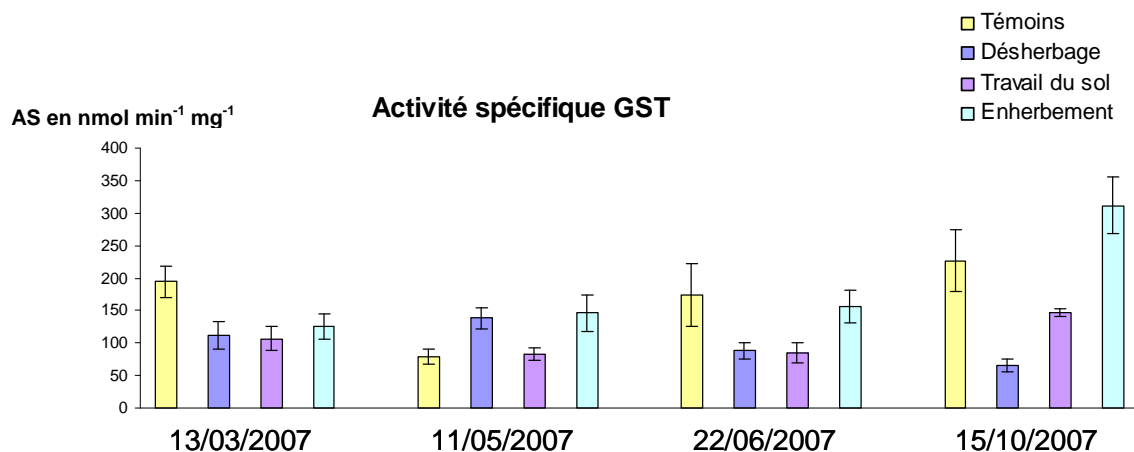


Figure 3.24 : Activités spécifiques des 3 enzymes suivies comme biomarqueurs sur les vers prélevés à différentes dates sur la parcelle en 2007, pour chacune des modalités d'entretien du sol au niveau des inter-rangs et de la zone témoin. Les barres de l'historgramme correspondent à une moyenne d'au moins 5 vers par modalité.

Le Tableau 3.10 résume les interventions réalisées au niveau des inter-rangs, à corrélérer avec les traitements phytosanitaires effectués sur la parcelle (Figure 3.23), décrits dans les Tableaux 2.2 à 2.4.

Tableau 3.10 : Récapitulatif des interventions (traitements, labours et tontes) réalisées au niveau des inter-rangs en fonction des dates de prélèvement des lombrics

Interventions au niveau des inter-rangs				
Date	Modalité dés herbée	Modalité travaillée	Modalité en herbée	Témoins
13/03/2007		<i>Prélèvement de lombrics</i>		
15/03/2007	herbicide de post-levée	actisol 10-15 cm		
16/04/2007	herbicide de pré-levée			
11/05/2007		<i>Prélèvement de lombrics</i>		
22/05/2007			tonte	
23/05/2007		actisol 10-15 cm		
22/06/2007		<i>Prélèvement de lombrics</i>		
22/06/2007			tonte	
25/06/2007		actisol 10-15 cm		
09/07/2007			tonte	
27/07/2007	herbicide de post-levée			
15/10/2007		<i>Prélèvement de lombrics</i>		

Cependant, bien qu'il y ait des différences de traitement du sol des inter-rangs (traitement herbicide, labour à l'actisol, tonte du couvert végétal), il reste très difficile de dégager une tendance des histogrammes de la Figure 3.23. Il semblerait que les activités enzymatiques varient au cours du temps et d'une modalité à l'autre, sans que l'on puisse pour l'instant mettre en évidence un phénomène d'activation ou d'inhibition lié aux pratiques culturales. Nous constatons également une variation non négligeable des activités basales chez les vers de la zone en herbée témoin que l'on retrouve également chez les vers des différentes modalités. Ceci s'explique par le suivi d'une population hétérogène (en termes de poids, taille, âge et homéostasie interne) mais correspondant à la réalité du terrain (**Reinecke and Reinecke, 2007**).

Conclusion :

L'expérimentation en conditions contrôlées nous avait permis de conclure quant à un effet des insecticides et des fongicides sur les lombriciens. Toutefois, sur le terrain, ces conclusions ne sont pas vérifiées. Nous notons un faible effet des pesticides sur les vers de la parcelle (diminution du nombre de vers mais pas d'effet significatif sur les activités enzymatiques des vers prélevés sous le rang). Il pourrait exister des zones refuges pour les lombriciens leur permettant d'« éviter » les effets néfastes de la pollution (bandes enherbées notamment, possibilité pour les lombrics de s'enfouir dans le sol, de migrer vers l'inter-rang...). Par ailleurs, la dose appliquée en terraria était maximisée : nous avons considéré que la totalité des doses appliquées sur la vigne arrivait dans le sol. Or, l'étude des teneurs en pesticides dans les sols et les eaux de drainage nous a permis de mettre en évidence que les transferts sont limités mais également très variables en fonction de la molécule. Les vers ne sont donc exposés qu'à des doses faibles. Ainsi, même si l'étude précédente nous a permis de mettre en évidence une diminution du nombre de vers sous le rang, il semblerait que l'exposition aux pesticides n'ait pas d'effet neurotoxique, ni d'effet sur les enzymes du système de biotransformation des toxiques. La modalité d'entretien des sols n'a par ailleurs aucun effet significatif explicable sur les variations d'activités enzymatiques des vers des inter-rangs.

CONCLUSION GENERALE

Les objectifs scientifiques de cette thèse ont été de mettre en évidence une influence du mode d'entretien du sol sur le transfert des produits phytosanitaires vers les eaux de drainage d'une part, puis d'évaluer d'autre part la pollution des sols par les pesticides d'un point de vue écotoxicologique.

Pour tenter de répondre à cette double problématique, nos travaux se sont articulés autour de 2 axes principaux.

Le premier axe nous a permis de suivre l'influence de la pratique culturale de l'inter-rang sur le **comportement hydrologique du sol** en focalisant notre étude sur les lames d'eau drainées. Nous avons également appréhendé à l'aide d'un suivi analytique par chromatographie les **concentrations en pesticides dans le sol et les eaux de drainage**, en fonction de l'itinéraire cultural.

Le second axe a été consacré à l'étude de **l'impact des pesticides sur la biomasse microbienne et les populations de lombriciens**. Une **étude écotoxicologique** en conditions contrôlées a permis de mettre en évidence l'effet des insecticides et/ou fongicides sur les lombrics, à des doses environnementales. Les effets des pesticides sur les vers de terre ont été appréhendés via le suivi de biomarqueurs enzymatiques de neurotoxicité et de biotransformation des toxiques. L'impact des pesticides et celui de la pratique d'entretien des sols sur les populations présentes sur la parcelle ont ensuite été abordés dans une dernière partie.

Les résultats obtenus présentent une grande variabilité qui, malheureusement, reste inhérente à tout travail agronomique de terrain, en conditions naturelles. Toutefois, l'ensemble de ces considérations nous permet de réaliser une **synthèse** des résultats et d'évoquer les différentes **perspectives d'investigation** à explorer pour l'avenir.

Le suivi des teneurs en pesticides dans les sols et les eaux d'infiltration a montré que la pollution du sol et des eaux d'infiltration est fonction du produit phytosanitaire appliqué. Le suivi de sept molécules multi-classes révèle que cette pollution dépend

des caractéristiques physico-chimiques de la molécule considérée mais aussi de son mode et moment d'application, ainsi que de la nature du sol ...

« Quel est le comportement de chacune des molécules suivies dans ce sol de boubènes aux conditions pédoclimatiques non généralisables ? »

Les insecticides **λ -cyhalothrine** (pyréthriinoïde de synthèse) et **chlorpyrifos** (organophosphoré) sont parfois détectables mais non quantifiables dans les sols et les eaux d'infiltration des différentes modalités d'entretien des sols. Ces molécules sont très peu solubles dans l'eau. Appliquées sur la vigne en face par face, elles sont peu exportées vers les horizons du sol. Agissant par contact, elles restent sur les feuilles de vigne. Par ailleurs, si quelques embruns arrivent au sol, ces molécules sont vraisemblablement photodégradées ou adsorbées (Koc élevés) sous forme de résidus non extractibles (**Schiavon, 1988**).

Les herbicides de pré-levée **flazasulfuron** (famille des sulfonilurées) et **flumioxazine** (famille des phénylphtalimides) sont épandus directement sur le sol. Leur épandage sur la modalité désherbée chimiquement (à une dose trois fois supérieure à celle des autres modalités) explique que ces deux herbicides soient régulièrement retrouvés dans le sol et les eaux d'infiltration de cette modalité. Ceci masque légèrement l'effet de l'entretien du sol. Par ailleurs, nos résultats ont montré que le métabolite du flazasulfuron est persistant dans les sols. Sa détection dans les eaux plusieurs mois après son application suggère un stockage dans le sol sous forme de résidus non extractibles, remobilisables au fil du temps par les eaux suite à des réorganisations de la matière organique (**Voltz et Louchart, 2001**).

Parmi les fongicides, **le métalaxyl** (phénylamide) et **le myclobutanil** (triazole), hydrosolubles, ont dans le sol un comportement similaire à celui du flazasulfuron. Le métalaxyl est présent dans le sol des inter-rangs sauf dans la modalité enherbée. Cette molécule serait sujette à une dégradation bactérienne dans la zone racinaire du couvert végétal mais aussi à la rétention sur les matières organiques du sol enherbé (**Barriuso et al., 2004 b; Guimont, 2005**). Il est fréquemment exporté vers les eaux de drainage. Une partie de la dose appliquée de cette molécule reste liée au sol durant plusieurs semaines. Le myclobutanil présente un comportement voisin. Ses applications multiples et répétées lors de la saison de traitement phytosanitaire favoriseraient la formation de résidus liés au sol (**Racke et Lichtenstein, 1987**).

Enfin, **le folpel**, appartenant à la famille des phtalimides, n'est jamais retrouvé dans les sols ni dans les eaux de drainage. Cette molécule se dégrade rapidement avec un DT50 de l'ordre de quelques heures (**Agritox, 2008**). Par ailleurs, la molécule de folpel se volatilise rapidement, elle est ainsi souvent retrouvée dans l'air (**Canal-Raffin et al., 2008**).

L'ensemble de ces considérations permet de mieux comprendre le devenir de ces polluants organiques de diverses familles chimiques dans les sols et les eaux d'infiltration.

« Au regard de l'utilisation encore intensive de ces pesticides, quelle est la meilleure stratégie d'entretien du sol pour réduire au maximum l'impact des molécules sur l'environnement (pollution des sols et des eaux et effet sur les invertébrés du sol) ? »

Bien que la mise en place d'un système de drainage modifie les écoulements en créant une situation qui n'est pas naturelle (**Evans et al., 1995 ; Mercier, 1998 ; Colin, 2000**), et que l'on puisse considérer que dans notre expérimentation sur sol de boubènes seulement 17 % de la surface contribue au drainage, la comparaison de 3 modalités d'entretien des sols reste possible. Cette analyse et les conclusions qui en découlent doivent cependant tenir compte de la spécificité du sol de l'étude. En effet, les boubènes présentent une variabilité importante de l'efficacité du drainage liée à l'existence de différentes morphologies dans ce type de sol (**Guiesse et al., 1989 ; Zimmer et al., 1991**).

Il ressort de cette étude que **la modalité désherbée chimiquement** réagit rapidement à la pluie. Elle exporte l'eau la plus chargée en molécules actives par des chemins préférentiels d'écoulement (fissures et macropores). Son sol nu est également sujet à l'apparition de fentes de dessiccation. Outre une pollution par les fongicides hydrosolubles, cette modalité subit aussi une pollution non négligeable par les herbicides épandus sur l'inter-rang directement au sol. Ce sont les sols et les eaux issues de cette modalité qui sont les plus pollués. Ce sol désherbé, peu riche en matière organique n'étant pas propice au développement des populations de microorganismes, les molécules appliquées ne sont que faiblement biodégradées. Enfin, les populations de lombriciens du genre *Aporrectodea* ne sont pas perturbées par le désherbage chimique. Toutefois, dans cette modalité, les *Lumbricus* (sensibles

à la pollution et au manque d'humidité et de matière organique) sont significativement moins nombreux que dans les autres modalités d'entretien des sols.

La modalité travaillée à l'actisol (15 cm) a un comportement hydrologique proche de celui de la modalité enherbée. Elle est toutefois celle qui restitue le moins d'eau dans le système de drainage. Se pose alors la question du ruissellement qui pourrait exister dans cette modalité labourée. Cependant, des flux d'eau ruisselés, même importants, seraient tamponnés par les bandes enherbées larges de 10 mètres autour de la modalité. Les eaux de cette modalité sont globalement les moins polluées. En règle générale, elle remobilise peu les molécules. Elle présente toutefois dans le sol des molécules en concentrations supérieures à la LOD sous forme non liée, facilement extractible. En effet, ce sol est pauvre en matière organique, sujet à l'érosion (**Andrieux et al., 1996**), défavorable au développement des microorganismes du sol. La vie bactérienne et la vie lombricienne sont fortement perturbées par les passages à répétitions du labour. L'actisol modifie le fonctionnement microbiologique du sol, il détruit les habitats des vers épigés et anéciques entraînant ainsi une diminution du nombre de vers totaux. Par ailleurs, un peuplement en lombriciens plus restreint sur cette modalité peut également expliquer le fait que moins d'eau arrive jusqu'au drain : les vers creusant moins de galeries, les macropores sont moins nombreux, entraînant ainsi une diminution de l'infiltration de l'eau par les chemins préférentiels.

Enfin, **la modalité enherbée par un semi engazonnant** possède un comportement hydrologique voisin de la modalité travaillée comme l'a mis en évidence la courbe des double-cumuls. Elle réagit à la pluie de la même façon mais exporte toutefois autant d'eau que la modalité désherbée chimiquement. En effet, le couvert végétal favorise l'infiltration de l'eau (**Lacas et al., 2005**). Les teneurs en molécules détectées dans le sol et les eaux d'infiltration de cette modalité montrent que le couvert végétal peut également favoriser la rétention des pesticides à la surface du dispositif enherbé ainsi que leur stabilisation sous forme de résidus non extractibles liés à la matière organique particulaire très abondante (**Madrigal, 2004**). Par ailleurs, l'enherbement crée des conditions favorables (humidité, matière organique, exsudats racinaires, fertilisation azotée) à la prolifération des microorganismes (et des lombriciens) dans les horizons superficiels du sol. Ceux-ci sont potentiellement à l'origine d'une biodégradation des molécules (**Benoit et al., 2003**).

Par ailleurs, l'enherbement de la vigne diminue sa surface foliaire externe interceptant les traitements phytosanitaires, sans toutefois altérer le rendement de la culture en Midi-Pyrénées. Il serait alors opportun de diminuer les doses de traitement homologuée sur les vignes enherbées afin de les ajuster à la surface foliaire et au stade de développement de la vigne pour limiter ainsi la pollution environnementale, tout en conservant la même efficacité d'action phytosanitaire (programme OPTIDOSE de l'Institut Français de la Vigne et du Vin ; **Raynal, 2004**).

Retenons que le choix du mode d'entretien du sol des inter-rangs devra tenir compte des molécules utilisées et des conditions pédoclimatiques du terroir viticole.

« Quels sont les effets des pesticides et de l'entretien des inter-rangs sur les populations lombriciennes du sol ? »

Pour évaluer l'effet des pesticides sur les lombriciens en conditions naturelles, il était indispensable de connaître les effets de ces mêmes molécules fongicides et insecticides sur les mêmes organismes mais en conditions contrôlées. L'analyse de 3 biomarqueurs (cholinestérases, catalase et glutathion S-transférases) sur ces lombrics exposés durant 14 jours montre que ces **produits phytosanitaires seraient neurotoxiques** (inhibition de l'activité ChE). Par ailleurs, les **insecticides et fongicides sont métabolisés** (augmentation de l'activité GST, diminution des teneurs en phytosanitaires dans les sols) entraînant la formation de radicaux libres (augmentation de l'activité CAT). Lorsque l'exposition est trop importante, l'état physiologique des invertébrés ne leur permettrait plus de prendre en charge les toxiques (**Brown et al., 2004 ; Schreck et al., 2008 b**).

Toutefois, ces perturbations des vers, révélées lors de cette expérimentation en conditions contrôlées, ne correspondent pas à la réalité du terrain. Quelle que soit la modalité considérée, aucune modification des activités enzymatiques n'a pu être mise en évidence. Ces observations peuvent s'expliquer par la présence de zones refuges. Il existe aussi des phénomènes de rétention, de volatilisation et/ou de dégradation ne favorisant pas l'accessibilité de ces molécules aux vers. Il est cependant possible que les **lombriciens**, par leurs activités de bioturbation du sol, puissent **stimuler une dégradation bactérienne**.

Perspectives d'étude

Cette étude pose désormais de **nouvelles questions** suggérant de **nouveaux axes de recherche**.

Les résultats obtenus sur les eaux pour l'année 2008 nous permettent d'envisager une suite à cette étude. Il serait intéressant de poursuivre les prélèvements et les analyses sur plusieurs années afin de présenter une synthèse pluriannuelle du fonctionnement hydraulique de chaque modalité. De même, une collecte des eaux de drainage à pas de temps régulier durant les épisodes drainants avec la réalisation de répétitions permettrait une étude plus approfondie des phénomènes de transfert. Une station équipée d'un collecteur à carrousel, un flaconnage régulier et l'utilisation de traceurs conservatifs de la cinétique (bromure de K) permettrait une meilleure connaissance de la dynamique de percolation des pesticides dans le sol et de leur arrivée au drain. Un suivi précis (par marquage aux isotopes stables) de la dynamique de transfert pour chaque molécule pourrait être une poursuite intéressante des travaux. Le suivi des métabolites de chaque molécule et de leur action sur la faune du sol pourrait également être envisagé.

Dans cette expérimentation, nous nous sommes intéressés au final à 7 molécules multi-classes. Il serait alors envisageable d'essayer d'étendre le suivi à toutes les molécules épandues sur la parcelle. La prise en compte du cuivre, élément inorganique, pourrait également venir en complément de cette investigation du fait de son application en 2007 et 2008 et de son rôle possible à la fois sur le devenir des molécules organiques et comme toxique pour les organismes du sol.

Par ailleurs, des perspectives de confirmation des résultats apportées par l'étude des biomarqueurs sur les vers en conditions contrôlées sont à envisager. Une stratégie de suivi plus « écologique » peut être envisagée : une étude de la reproduction (nombre de cocons, fécondité et fertilité des lombrics...), ou une étude des activités de bioturbation (activités de creusement, formation de galeries verticales...) et de locomotion (suivi du biomarqueur octopamine...). La mise en relation de la variation d'activité enzymatique à une variation du transcriptome pourrait faire l'objet de travaux complémentaires. Les premiers protocoles d'extraction des ARN des lombriciens, des transcriptions reverses (RT) et d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) semi-quantitative avec un gène contrôle sont en cours de mise au point.

Actuellement, une étude relative à la microbiologie des sols est menée afin d'identifier, dans un premier temps les grandes familles présentes (PCR suivie d'analyse de diversité), en particulier les non-cultivables, sur les inter-rangs des différentes modalités afin d'évaluer l'influence de l'entretien du sol sur la diversité microbienne après plusieurs années sous le même itinéraire cultural.

*« La véritable Science enseigne, par-dessus tout,
à douter et à être ignorant. »*

Miguel de Unamuno

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AFES (Association Française de l'Etude des Sols), 1995. Référentiel pédologique - Techniques et pratiques. INRA Editions, Paris, 332 p.

AFNOR (Association Française de la Normalisation), 1999. XP T90-210. décembre 1999. Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence : AFNOR.

Agritox Database, 2008. AFSSA France.

<http://www.dive.afssa.fr/agritox/php/fiches.php>

Agulhon R, 1996. Intérêt des nouvelles techniques d'entretien des sols de vigne pour la viticulture, l'œnologie, l'environnement et la santé. Le progrès Agricole et Viticole 113, 275-278.

Ammer S, Weber K, Abs C, Ammer C, Prietzel J, 2006. Factors influencing the distribution and abundance of earthworm communities in pure and converted Scots pine stands. Applied Soil Ecology 33, 10-21.

Anderson T et Förlin L, 1992. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. Aquatic Toxicology 24, 1-19.

Andrieux P, Louchart X, Léonard J, Voltz M, 1996. Effect of agricultural practices on infiltration-runoff partition in vineyard fields in a mediterranean climate. Ecohydrological Processes in Small Basins. Unesco Technical Notes, Viville and Littlewood.

Aramendía MA, Borau V, Lafont F, Marinas A, Marinas JM, Moreno JM, Porrás JM, Urbano FJ, 2006. Determination of diquat and paraquat in olive oil by ion-pair liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry (MRM). Food Chemistry 97, 181-188.

Arlot MP, 1993. Qualité des eaux de drainage: acquisition et traitement des données expérimentales. CEMAGREF, Division Drainage. 226 p.

Armenta S, Quintas G, Garrigues S, De la Guardia M, 2005. A validated and fast procedure for FTIR determination of cypermethrin and chlorpyrifos. *Talanta* 67, 634-639.

Armstrong DE, Chesters G, Harris HF, 1987. Atrazine hydrolysis in soil. *Soil Science Society of America Proceedings* 31, 61-66.

Arnaud C, Saint-Denis M, Narbonne JF, Soler P, Ribera D, 2000. Influences of different standardised test methods on biochemical responses in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 67-73.

Association de Coordination Technique Agricole (ACTA), 2006. Index phytosanitaire. 42^e édition, 824 p.

Ayano E, Kanazawa H, Ando M, Nishimura T, 2004. Determination and quantitation of sulfonylurea and urea herbicides in water samples using liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* 507, 215-222.

Bachelier G, 1979. La faune des sols, son écologie et son action. ORSTOM Paris, 391 p.

Banerjee K, Patil SH, Dasgupta S, Oulkar DP, Patil SB, Savant R, Adsule PG, 2008. Optimization of separation and detection conditions for the multiresidue analysis of pesticides in grapes by comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1190, 350-357.

Barriuso E, 2004 a. Estimation des risques environnementaux des pesticides. INRA éditions, 204 p.

Barriuso E, Benoit P, Dignac MF, 2004 b. Le devenir des pesticides dans l'environnement. Comptes-rendus de l'Académie de l'Agriculture de France 90, 15-22.

Bartlett MD, Harris JA, James IT, Ritz K, 2006. Inefficiency of mustard extraction technique for assessing size and structure of earthworm communities in UK pasture. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 2990-2992.

Baath E et Anderson TH, 2003. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology & Biochemistry* 35, 955-963.

Bauer C et Römbke J, 1997. Factors influencing the toxicity of two pesticides on three lumbricid species in laboratory tests. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 705-708.

Bengtson RL, Southwick LM, Willis GH, Carter CE, 1990. The influence of subsurface drainage practices on herbicide losses. *Transaction of the American Society of the Agricultural Engineering* 33, 415-418.

Benoit P, Souiller C, Madrigal I, Pot V, 2003. Fonctions environnementales des dispositifs enherbés en vue de la gestion et de la maîtrise des impacts d'origine agricole : cas des pesticides. *Etude et Gestion des Sols* 10, 215-228.

Bermúdez-Couso A, Arias-Estévez M, Nóvoa-Muñoz JC, López-Periago E, Soto-González B, Simal-Gándara J, 2007. Seasonal distributions of fungicides in soils and sediments of a small river basin partially devoted to vineyards. *Water Research* 41, 4515-4525.

Bertin G et Schiavon M, 1989. Les résidus non extractibles de produits phytosanitaires dans les sols. *Agronomie* 9, 1-8.

Bocquené G, Galgani F, Walker CH, 1997. Les cholinestérases, biomarqueurs de neurotoxicité, p. 209-240. In Lagadic L, Caquet T, Amiard JC and Ramade F eds.,

1997. Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects fondamentaux. Collection Écologie, Paris, Masson, 419 p.

Bocquené G et Galgani F, 1998. Cholinesterase inhibition by organophosphorous and carbamate compounds. *Techniques in Marine Environmental Science* 22, 1-12.

Boivin A, Chaabane H, Perrin-Ganier C, Schiavon M, 2003. Transfert des pesticides par les eaux de drainage. Communication, Le fil de l'eau, Palais des congrès, Nancy.

Boizard H, Richard G, Roger-Estrade J, Dürr C, Boiffin J, 2002. Cumulative effects of cropping systems on the structure of the tilled layer in northern France. *Soil and Tillage Research* 64, 149-164.

Börjesson E, Torstensson L, 2000. New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in water and soil. *Journal of Chromatography A* 886, 207-216.

Bossio JP, Harry J, Kinney CA, 2008. Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments. *Chemosphere* 70 858-864.

Bouché MB, 1972. Lombriciens de France. Ecologie et systématique. INRA, Annales de zoologie - Ecologie animale, 671 p.

Bouché MB, 1977. Strategies lombriciennes. *Ecology Bulletin* 25, 122-132.

Bouché MB, 1984. Les vers de terre, *La Recherche*, 10 p.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Brown PJ, Long SM, Spurgeon DJ, Svendsen C, Hankard PK, 2004. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere* 57, 1675-1681.

Burgeot T, Bocquené G, Pingray G, Godefroy D, Legrand J, Dimeet J, Marco F, Vincent F, Henocque Y, Jeanneret HP, Galgani F, 1994. Monitoring of biological effects of contamination in marine fish along the French coasts by measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 29, 131-147.

Burgeot T et Galgani F, Application of EROD in marine fish in a multidisciplinary surveillance programme in the North Sea. In Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F (eds.): *Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment*. Science Publishers, Inc., Enfield (NH), USA, 2000, 33-57.

Canal-Raffin M, l'Azou B, Jorly J, Hurtier A, Cambar J, Brochard P, 2008. Cytotoxicity of folpet fungicide on human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 249, 160-166.

Capowiez Y, Rault M, Mazzia C, Belzunces L, 2003. Earthworm behaviour as a biomarker – a case study using imidacloprid. *Pedobiologia* 47, 542-547.

Carter MR, Gregorich EG, Angers DA, Beare MH, Sparling GP, Wardle DA, Voroney RP, 1999. Interpretation of microbial biomass measurements for soil quality assessment in humid temperate regions. *Canadian Journal of Soil Science* 79, 507–520.

Celette F, 2007. Dynamique des fonctionnements hydrique et azoté dans une vigne enherbée sous le climat méditerranéen. Thèse de Montpellier SupAgro, 200 p.

Chantigny MH, Angers DA, Prévost D, Vézina LP, Chalifour FP, 1997. Soil aggregation and fungal and bacterial biomass under annual and perennial cropping systems. *Soil Science Society of America Journal* 61, 262-267.

Charpentier A, Menozzi P, Marcel V, Villatte F, Fournier D, 2000. A method to estimate acetylcholinesterase-active sites and turnover in insects. *Analytical Biochemistry* 285, 76-81.

Chatterjee S et Bhattacharya S, 1984. Detoxication of industrial pollutants by the glutathione S-transferase system in the liver of *Anabas testudineus* (bloch). *Toxicology Letters* 22, 87-198.

Chaussod R, 1996. La qualité biologique des sols : évaluation et implications. *Etude et Gestion des sols* 4, 261-278.

Cizdziel JV et Hodge VF, 2000. Attics as archives for house infiltrating pollutants: trace elements and pesticides in attic dust and soil from southern Nevada and Utah. *Microchemical Journal* 64, 85-92.

Cofie P, Koolen AJ, Perdok UD, 2000. Measurement of stress–strain relationship of beech roots and calculation of the reinforcement effect of tree roots in soil–wheel systems. *Soil and Tillage Research* 57, 1-12.

Coleman DC, Blair JM, Elliott ET, Wall DH, 1999. *Soil Invertebrates. Standard Soil Methods for Long-Term Ecological Research, LTER Network Series.* Oxford University Press, NewYork.

Colin F, 2000. Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires Cas de l'atrazine dans le bassin versant du Sousson (Gers, France). Thèse de l'ENGREF, 255 p.

Colombani J, 1997. Autopsie d'un hyétogramme. Dans : Troisièmes journées hydrologiques de l'ORSTOM à Montpellier : techniques nouvelles en hydrologie (capteurs et télétransmission, logiciels informatiques). Montpellier : ORSTOM, 1988, 28-37. Journées Hydrologiques de l'ORSTOM à Montpellier 3, Montpellier (France), septembre 1997.

Contardo-Jara V et Wiegand C, 2008. Biotransformation and antioxidant enzymes of *Lumbriculus variegates* as biomarkers of contaminated sediment exposure. *Chemosphere* 70, 1879-1888.

Conte E, Milani R, Morali G, Abballe F, 1997. Comparison between accelerated solvent extraction and traditional methods for the analysis of the herbicide diflufenican in soil. *Journal of Chromatography* 765, 121-125.

Cossu C, Doyotte A, Jacquin MC and Vasseur P, 1997. Biomarqueurs de stress oxydant chez les animaux aquatiques, p. 149-161. In Lagadic L, Caquet T, Amiard JC and Ramade F eds., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects fondamentaux. Collection Écologie, Paris, Masson, 419 p.

Coulouma G, Boizard H, Trotoux G, Lagacherie P, Richard G, 2006. Effect of deep tillage for vineyard establishment on soil structure: A case study in Southern France. *Soil and Tillage Research* 88, 132-143.

D'Archivio AA, Fanelli M, Mazzeo P, Ruggieri F, 2007. Comparison of different sorbents for multiresidue solid-phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with high-performance liquid chromatography. *Talanta* 71, 25-30.

Dartigoeyte L, 2006. Les itinéraires techniques de l'entretien des sols. Matevi, Document du service vigne et vin de la Chambre d'agriculture de la Gironde, 7p.

Darwin CR, 1881. The formation of vegetable mould, through the action of worms, with observations on their habits. John Murray, London.

Dastgheib F et Frampton C, 2000. Weed management practices in apple orchards and vineyards in the South Island of New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 28, 53-58.

David N, Serrano E, Renard R, 2001. Vigne et qualité de vendange: effet de l'enherbement semé. Synthèse de sept années d'essais sur cépage Colombard : Lutte contre les mauvaises herbes. *Phytoma, la défense des végétaux* 544, 46-47.

Deprince A, 2003. La faune du sol, diversité, méthodes d'étude, fonctions et perspectives. Le Courier de l'Environnement de l'INRA, 49.

Deyrup CL, Chang SM, Weintraub RA, Moye HA, 1985. Simultaneous esterification and acylation of pesticides for analysis by gas chromatography. 1. Derivatization of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid with fluorinated alcohols-perfluorinated anhydrides. Journal of Agricultural and Food Chemistry 33, 944-947.

Díaz-Cruz MS et Barceló D, 2006. Highly selective sample preparation and gas chromatographic–mass spectrometric analysis of chlorpyrifos, diazinon and their major metabolites in sludge and sludge-fertilized agricultural soils. Journal of Chromatography A 1132, 21-27.

Dick RP, 1992. A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. Agricultural Ecosystems and Environment 40, 25-36.

Di Giulio RT, Habig C, Gallagher EP, 1993. Effects of Black Rock harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. Aquatic Toxicology 26, 1-22.

Doube BM et Brown GC, 1998. Life in a complex community: functional interactions between earthworms, organic matter, microorganisms and plants. Earthworm Ecology. CRC Press, Boca Raton, FL, 179–212.

DRAF SRPV de Lorraine, Communication Internet, Mars 2005 :

www.draf-lorraine.maapar1.agriculture.gouv.fr/fichiers

Encyclopédie de Vitisphère : www.vitisphere.com

Edwards CA et Lofty JR, 1977. Biology of Earthworms (2nd edition). Chapman and Hall, London.

Ellman G, Courtney K, Andres V, Featherstone RM, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.

Epelde L, Mijangos I, Becerril JM, Garbisu C, 2008. Soil microbial community as bioindicator of the recovery of soil functioning derived from metal phytoextraction with sorghum. *Soil Biology and Biochemistry*, *In Press*.

Esteve-Turrillas FA, Pastor A, De la Guardia M, 2005. Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils by using combined solid-phases extraction and tandem mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta* 553, 50-57.

Evans RO, Skaggs RW, Gilliam JW, 1995. Controlled versus conventional drainage effects on water quality. *Journal of Irrigation and Drainage Engineering* 121, 271-276.

Expertise Scientifique Collective (ESCo) par Aubertot JN, Barbier JM, Carpentier A, Gril JJ, Guichard L, Lucas P, Savary S, Savini I, Voltz M, 2005. Pesticides, agriculture et environnement : réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux, synthèse du rapport d'expertise INRA-CEMAGREF, 64 p.

Fatoki OS et Awofolu RO, 2003. Methods for selective determination of persistent organochlorine pesticide residues in water and sediments by capillary gas chromatography and electron-capture detection. *Journal of Chromatography A* 983, 225-236.

Ferrari A, Venturino A, Pechén de D'Angelo AM, 2007. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88, 134-142.

Ferrell JA and Vencill WK, 2004. Gas chromatographic / mass spectrometric determination of flumioxazin extracted from soil and water. *Journal of AOAC International* 87, 56-64.

Fiche ITAB : L'activité biologique des sols, Méthodes d'évaluation en viticulture, 2003. http://www.itab.asso.fr/downloads/Fiches-techniques_viti

Friedel JK, Sommer M, Ehrmann O, 1999. Bewertung von Böden nach ihrer Eignung als Lebensraum für Organismen am Beispiel von Mikroorganismen und Regenwürmern. Mittl. Deut. Bodenkundl. Ges. 89, 233–236.

Fuentes E, Báez ME, Labra R, 2007. Parameters affecting microwave-assisted extraction of organophosphorus pesticides from agricultural soil. Journal of Chromatography A 1169, 40-46.

Fuke C, Arao T, Morinaga Y, Takaesu H, Ameno K, Miyazaki T, 2002. Analysis of paraquat, diquat and two diquat metabolites in biological materials by high-performance liquid chromatography. Legal Medicine 4, 156-163.

Gago P, Cabaleiro C, García J, 2007. Preliminary study of the effect of soil management systems on the adventitious flora of a vineyard in north western Spain. Crop Protection 26, 584-591.

Galgani F et Payne J, 1991. Biological effects of contaminants: Microplate method for measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) in fish. Techniques in Marine Environmental sciences 13. ICES, Palaegade 2-4. DK-1267 Copenhagen K. Denmark, 11p.

Galletti GC, Bonetti A, Dinelli G, 1995. High-performance liquid chromatographic determination of sulfonylureas in soil and water. Journal of Chromatography A 692, 27-37.

Gambi N, Pasteris A, Fabbri E, 2007. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 145, 678-685.

Gao J, Liu L, Liu X, Lu J, Zhou H, Huang S, Wang Z, Spear PA, 2008. Occurrence and distribution of organochlorine pesticides – lindane, p,p'-DDT, and heptachlor epoxide – in surface water of China. *Environment International* 8, 1097-1103.

Garrec JP et Van Haluwyn C, 2002. Biosurveillance végétale de la qualité de l'air. Lavoisier, Tec & Doc, 116 p.

Geoffrion R, 1999. L'enherbement permanent, 40 ans après. *Phytoma* 519, 25-27.

George GS et Buchanan G, 1990. Isolation, properties and induction of plaice liver cytosolic glutathione S-transferases. *Fish Physiology and Biochemistry* 8, 437-449.

González-Rodríguez RM, Rial-Otero R, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J, 2008. Determination of 23 pesticide residues in leafy vegetables using gas chromatography-ion trap mass spectrometry and analyte protectants. *Journal of Chromatography A* 1196-1197, 100-109.

Gouy V, Boivin A, Gril JJ, Carluer N, 2007. Quantification et maîtrise des flux de pesticides de la parcelle au bassin versant : intérêt et limites des zones tampons enherbées et boisées. Dans : Azote, Phosphore et Pesticides. Les nouvelles stratégies de réduction des flux en amont. Communication lors de la Journée Scientifique et Technique ENGEES-ULP-LIFE-ASTEE 08 février 2007.

Gril JJ, Gouy V, Carluer N, 1999. Processus de transfert superficiel des produits phytosanitaires de la parcelle au bassin versant. *La Houille Blanche* 5, 76-80.

Guide pour une protection durable de la vigne - www.agriculture.gouv.fr

Guimont S, 2005. Devenir des pesticides dans les sols en fonction de l'état d'humidité et du mode de circulation de l'eau dans le sol. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, 223 p.

Guiesse M, Collas P, Bourgeat F, Chossat JC, 1989. Relation entre la conductivité hydraulique de sols drainés et leurs caractéristiques pédologiques. *Science du sol* 27, 257-279.

Guiesse M et Bourgeat F, 1991. Expérimentation en sols de boubènes : efficacité d'un réseau de drainage et caractéristiques des sols. *Etudes du Cemagref, Hydraulique Agricole* 10, 63-87.

Harden T, Joergensen RG, Meyer B, Wolters V, 1993. Soil microbial biomass estimated by fumigation-extraction and substrate-induced respiration in two pesticide-treated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 679-683.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB, 1974. Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249, 7130-7139.

Hernández F, Sancho JV, Pozo O, Villaplana C, Ibáñez M, Grimalt S, 2003. Rapid determination of fosetyl-aluminium residues in lettuce by liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International* 86, 832-838.

Hildebrandt A, Guillamón L, Lacorte S, Tauler R, Barceló D, 2008. Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Research* 42, 3315-3326.

Hoffmann C, Platte H, Lickfett T, Koch HJ, 1997. Microbial biomass and N mineralization in relation to N supply of sugar beet under reduced tillage. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 160, 187-193.

Holman IP, Dubus IG, Hollis JM, Brown CD, 2004. Using a linked soil model emulator and unsaturated zone leaching model to account for preferential flow when assessing the spatially distributed risk of pesticide leaching to groundwater in England and Wales. *The Science of The Total Environment* 318, 73-88.

Hu S et Van Bruggen AHC, 1997. Microbial dynamics associated with multiphasic decomposition of ¹⁴C-labeled cellulose in soil. *Microbial Ecology* 33, 134-143.

Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle PM, Bergman JR, 1992. Biomarkers. Biochemical, Physiological, and histological markers of anthropogenic Stress. Boca Raton, Fla., Lewis Publishers, 347 p.

Ibáñez M, Pozo O, Sancho JV, Lopez FJ, Hernández F, 2005. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1081, 145-155.

Ibáñez M, Pozo OJ, Sancho JV, López FJ, Hernández F, 2006. Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1134, 51-55.

Institut Français de l'Environnement (IFEN), 2004. Les pesticides dans les eaux, 6ème bilan annuel, données de 2002. Etudes et travaux, 33 p.

International Organization for Standardization (ISO), 1997. Soil quality: Determination of Soil Microbial Biomass. Part 2: Fumigation–extraction method. ISO 14240-2.

International Organisation for Standardisation (ISO), 2004. Soil quality: Sampling of Soil Invertebrates. Part 1: Hand-Sorting and Formalin Extraction of Earthworms. ISO 23611-1.

Ismail SMM, Ahmed MT, Mosleh YY, Ahmed YM, 1997. Comparative toxicity, growth rate and biochemical effect of certain pesticides on earthworm *Aporrectodea caliginosa*. In: Proceedings of the 7th National Congress on Pests and Diseases of Vegetables and Fruits in Egypt. Ismailia, Egypt, 682-700.

Jett DA et Navoa RV, 2000. In vitro and in vivo effects of chlorpyrifos on glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. *Neurotoxicology* 21, 141-146.

Kalita PK, Algoazany AS, Mitchell JK, Cooke RAC, Hirschi MC, 2006. Subsurface water quality from a flat tile-drained watershed in Illinois, USA. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 115, 183-193.

Kawata K, Asada T, Oikawa K, 2005. Determination of pesticides in compost by pressurized liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1090, 10-15.

Khrolenko MV et Wieczorek PP, 2005. Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride. *Journal of Chromatography A* 1093, 111-117.

Klotz AV, Stegeman JJ, Walsh C, 1983. An aryl hydrocarbon hydroxylating hepatic cytochrom P-450 from the marine fish *Stenopus chrysops*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 226, 578-592.

Kreiter S, Esmenjaud D, Martinez M, Sforza R, Thiéry D, Van Helden M, Yvon M, 2008. *Ravageurs de la vigne*, 2ème édition, 424 p.

Lacas JG, Voltz M, Gouy V, Carlier N, Gril JJ, 2005. Using grassed strips to limit pesticide transfer to surface water: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 25, 253-266.

Lagacherie P, Coulouma G, Ariagno P, Virat P, Boizard H, Richard G, 2006. Spatial variability of soil compaction over a vineyard region in relation with soils and cultivation operations. *Geoderma* 134, 207-216.

Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F, 1997. *Biomarqueurs en écotoxicologie*. Collection Écologie, Masson, Paris, 419 p.

Landry D, Dousset S, Fournier JC, Andreux F, 2005. Leaching of glyphosate and AMPA under two soil management practices in Burgundy vineyards (Vosne-Romanée, 21-France). *Environmental Pollution* 138, 191-200.

Laumonier A, 1995. Effet des techniques d'entretien des sols sur la biomasse microbienne et les stocks de matière organique en vignoble champenois. DEA Œnologie et Ampéologie, Bordeaux et Dijon, 50 p.

Laverack MS, 1963. *The Physiology of Earthworms*. Pergamon Press, London.

Lawrence AP et Bowers MA, 2002. A test of the "hot" mustard extraction method of sampling earthworms. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 549-552.

Lee KE, 1985. *Earthworms: Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use*. Academic Press, Sydney.

Le Golf-Guillou I, Marsault J, Riou C, 2000. Impacts de l'enherbement sur le fonctionnement de la vigne, la composition des moûts, la durée de fermentation et la qualité des vins. *Le Progrès Agricole et Viticole* 117, 103-110.

Léonard RA, 1990. Movement of pesticides into surface waters. Pesticides in the soil environment: processes, impacts and modelling. *Soil Science society of America Book Series*, 2, Cheng HH, Denver, 303-349.

Lesaffre B et Zimmer D, 1988. Subsurface drainage peak flows in shallow soil. *Journal of Irrigation and Drainage Engineering* 114, 387-306.

Lesaffre B, 1989. Fonctionnement hydrologique et hydraulique du drainage souterrain des sols temporairement engorgés: débits de pointe et modèle SIDRA. Thèse de l'université de Paris VI, Mécanique des fluides, 217 p.

Lesaffre B et Arlot MP, 1991. Maîtrise de l'excès d'eau dans les sols et effets sur l'environnement : impacts du drainage sur le milieu. Salon H2O Grenoble, 28 mars 1991, 30p.

Li B, Deng X, Guo D, Jin S, 2007. Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid Residues in Foods Using High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry. Chinese Journal of Chromatography 25, 486-490.

Louchart X, 1999. Transfert de pesticides dans les eaux de surface aux échelles de la parcelle et d'un bassin versant viticole. Étude expérimentale et éléments de modélisation. Thèse de doctorat. École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 263 p.

Louchart X, Voltz M, Andrieux P, 2000. Dynamique de la mobilisation et du transfert du diuron par ruissellement. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science 331, 475-481.

Louchart X, Voltz M, Andrieux P, Moussa R, 2001. Herbicide transport to surface waters at field and watershed scales in a Mediterranean vineyard area. Environmental Quality 30, 982-991.

Louchart X, Voltz M, Coulouma G, Andrieux P, 2004. Oryzalin fate and transport in runoff water in Mediterranean vineyards. Chemosphere 57, 921-930.

Lukkari T, Taavitsainen M, Soimasuo M, Oikari A, Haimi J, 2004. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure : differences between populations with and without earlier metal exposure. Environmental Pollution 129, 377-386.

Madrigal I, 2004. Rétention des pesticides dans les sols des dispositifs tampon, enherbés et boisés – rôles des matières organiques. Thèse de doctorat de L'Institut National Agronomique de Paris-Grignon, 218 p.

Magné C, Saladin G, Clément C, 2006. Transient effect of the herbicide flazasulfuron on carbohydrate physiology in *Vitis vinifera L.*. Chemosphere 62, 650-657.

Maigre D et Aerny J, 2001. Enherbement et fumure azotée sur Gamay dans le Valais central. *Revue suisse de viticulture, arboriculture et horticulture* 33, 199-206.

Maraun M, Alpei J, Bonkowski M, Buryr R, Migge S, Peters M, Schaefer M, Scheu S, 1999. Middens of the earthworm *Lumbricus terrestris* (Lumbricidae): microhabitats for micro- and mesofauna in forest soil. *Pedobiologia* 43, 276-287.

Masse D et Lomi P, 1989. Synthèse de trois années d'expérimentation sur le réseau de drainage de Villaudric. Secteur de référence ONIC. Ministère de l'agriculture. Chambre d'agriculture de la Haute-Garonne.

Mayer-Helm B, Hofbauer L, Müller J, 2008. Method development for the determination of selected pesticides on tobacco by high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry. *Talanta* 74, 1184-1190.

McCarty GW et Meisinger JJ, 1997. Effects of N fertilizer treatments on biologically active N pools in soils under plow and no tillage. *Biology and Fertility of Soils* 24, 406-412.

Menck de Almeida R et Yonamine M, 2007. Gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of the herbicides paraquat and diquat in plasma and urine samples. *Journal of Chromatography B* 853, 260-264.

Mercier P, 1998. Contribution méthodologique à l'étude des matières en suspension: Application au transfert particulaire en sol drainé. Thèse de l'ENGREF, 198 p.

Michel JC, Tessier D, Favrot JC, 2003. Comportement et organisation de sols de Boulbène dans le Tarn dans *Étude et Gestion des Sol* 10, 71-80.

Minchin A, McIntosh AD, Davies I, 2000. Bequalm, P4501A1 in fish liver round one exercise report. Marine Laboratory, Aberdeen Report, july 2000, 15p.

Monod G, 1997. L'induction du cytochrome P4501A1, p. 33-52. In Lagadic L, Caquet T, Amiard JC and Ramade F eds., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects fondamentaux. Collection Écologie, Paris, Masson, 419 p.

Moreno DV, Ferrera ZS, Rodríguez JJS, 2006. Use of polyoxyethylene surfactants for the extraction of organochlorine pesticides from agricultural soils. *Journal of Chromatography A* 1104, 11-17.

Morlat R, 2007. Enherbement : des effets positifs au vignoble et sur la qualité du vin. *Le Vigneron du val de loire* 257, 1 p.

Mosleh YY, Paris-Palacios S, Couderchet S, Vernet G, 2003. Effects of the herbicide isoproturon on survival, growth rate, and protein content of mature earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) and its fate in the soil. *Applied Soil Ecology* 23, 69-77.

Narbonne JF et Michel X, 1997. Systèmes de biotransformation chez les mollusques aquatiques. In *Biomarqueurs en écotoxicologie*. Collection Écologie, Masson, 419 p.

Nedelec Y, 1999. Activités rurales et inondations : connaissances et bonnes pratiques. Nedelec Y. (Coord.), Cemagref Editions, 141 p.

Nedelec Y, 2005. Interactions en crues entre drainage souterrain et assainissement agricole. Thèse de l'Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et des Forêts, Paris, 213 p.

Nedelkoska TV et Low GKC, 2004. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Analytica Chimica Acta* 511, 145-153.

Nemcsok J, Orban L, Dobber L and Szepealussy J, 1985. Acetylcholinesterase activity measurements as a tool for demonstrating the possible cause of fish devay. *Acta Biologica Szeged* 31, 9-12.

Norme NF EN ISO 6222 - Qualité de l'eau. - Dénombrement des micro-organismes revivifiables - Comptage des colonies par ensemencement dans un milieu de culture nutritif gélosé (indice de classement : T90401).

Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), 2004. Agricultural impacts on soil erosion and soil biodiversity: Developing indicators for policy analysis. Proceedings of an OECD Expert Meeting. March 2003, Rome, Italy, OECD, Paris.

Padrón-Sanz C, Halko R, Sosa-Ferrera Z, Santana-Rodríguez JJ, 2005. Combination of microwave assisted micellar extraction and liquid chromatography for the determination of organophosphorous pesticides in soil samples. *Journal of Chromatography A* 1078, 13-21.

Paoletti MG, Sommaggio D, Favretto MR, Petruzzelli G, Pezzarossa B, Barbafieri M, 1998. Earthworms as useful bioindicators of agroecosystem sustainability in orchards and vineyards with different inputs. *Applied Soil Ecology* 10, 137-150.

Pateiro-Moure M, Martínez-Carballo E, Arias-Estévez M, Simal-Gándara J, 2008. Determination of quaternary ammonium herbicides in soils: Comparison of digestion, shaking and microwave-assisted extractions. *Journal of Chromatography A* 1196-1197, 110-116.

Pattison AB, Moody PW, Badcock KA, Smith LJ, Armour JA, Rasiah V, Cobon JA, Gulino LM, Mayer R, 2008. Development of key soil health indicators for the Australian banana industry. *Applied Soil Ecology* 40, 155-164.

Patty L, 1997. Limitation du transfert par ruissellement vers les eaux superficielles de 2 herbicides (isoproturon et diflufenicanil). Méthodologie analytique et étude de l'efficacité des bandes enherbées. Thèse de l'université de Grenoble, 206 p.

Peixoto F, Alves-Fernandes D, Santos D, Fontainhas-Fernandes A, 2006. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85, 91-96.

Peruzzo PJ, Porta AA, Ronco AE, 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* 156, 61-66.

Peters LD, Porte C, Albaigés J, Livingstone DR, 1994. 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) and antioxidant enzyme activities in larvae of sardine (*Sardina pilchardus*) from the north coast of Spain. *Marine Pollution Bulletin* 28, 299-304.

Phyt'Eauvergne, 2003. Expérimentation d'une méthode alternative au désherbage chimique en Zone Non Agricole – Waïpuna. FREDON Auvergne.

Reddy PM et Philip GH, 1994. *In vivo* inhibition of AchE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 619-626.

Popp P, Keil P, Moder M, Paschke A, Thuss U, 1997. Application of accelerated solvent extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in solid wastes. *Journal of Chromatography* 774, 203-211.

Racke KD et Lichtenstein EP, 1987. Effects of agricultural practises on the binding and the fate of ¹⁴C-parathion in soil. *Journal of Environmental Science Health* 22, 1-14.

Rault M, Mazzia C, Capowiez Y, 2007. Tissue distribution and characterization of cholinesterase activity in six earthworm species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 147, 340-346.

Raynal M, 2004. OPTIDOSE : optimisation de l'intrant phytosanitaire. Colloque AFPP Cietap, Orléans mars 2004.

Reinecke SA et Reinecke AJ, 2007. Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66, 92-101.

Renaud FG et Brown CD, 2008. Simulating pesticides in ditches to assess ecological risk (SPIDER): II. Benchmarking for the drainage model. *Science of The Total Environment* 394, 124-133.

Ribera D, Narbonne JF, Arnaud C, Saint-Denis M, 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated soil, effects of carbaryl. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1123-1130.

Richard G, Boizard H, Roger-Estrade J, Boiffin J, Guérif J, 1999. Field study of soil compaction due to traffic in northern France: pore space and morphological analysis of the compacted zones. *Soil and Tillage Research* 51, 151-160.

Richardson BJ, Mak E, De Luca-Abbott SB, Martin M, McClellan K, Lam PKS, 2008. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels "integrate" biomarker responses? *Marine Pollution Bulletin* 57, 503-514.

Ritz K, Wheatley RE, Griffiths BS, 1997. Effects of animal manure application and crop plants upon size and activity of soil microbial biomass under organically grown spring barley. *Biology and Fertility of soils* 24, 372-377.

Rivas IP, Gil-Alegre ME, Torres-Suárez AI, 2006. Development and validation of a fast high-performance liquid chromatography method for the determination of microencapsulated pyrethroid pesticides. *Analytica Chimica Acta* 557, 245-251.

Rivière JL, 1993. Les animaux sentinelles. *Le Courrier de l'Environnement de l'INRA* 20, 59-68.

Robertson FA et Morgan WC, 1996. Effects of management history and legume green manure on soil microorganisms under “organic” vegetable production. *Australian Journal Soil Research* 34, 427-440.

Rodriguez-Castellanos L et Sanchez-Hernandez JC, 2007. Earthworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. *Journal of Pesticide Science* 32, 360-371.

Römbke J, Jänsch S, Didden W, 2005. The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 249-265.

Rouessac F et Rouessac A, 1992. *Analyse chimique – Méthodes et techniques instrumentales modernes*, 5^e édition. Dunod

Saint-Denis M, Labrot F, Narbonne JF, Ribera D, 1998. Glutathione, glutathione related enzymes and catalase activities in the worm *Eisenia fetida*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35, 594-606.

Saint-Denis M, Narbonne JF, Arnaud C, Ribera D, 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 395-404.

Salinas-Garcia JR, Hons FM, Matocha JE and Zuberer DA, 1997. Soil carbon and nitrogen dynamics as affected by long-term tillage and nitrogen fertilization. *Biology and Fertility of Soils* 25, 182-188.

Santos M, 2008. Ecotoxicological assessment of the effects of pesticide application to *Eisenia andrei* and *Folsomia candida* using an agricultural soil contaminated in the field and in the lab. Oral Presentation at SETAC Europe 18th Annual Meeting, Warsaw, Poland.

Schiavon M, 1988. Studies of the movement and the formation of bound residues of atrazine, of its chlorinated derivatives, and of hydroxyatrazine in soil using ¹⁴C ring-labeled compounds under outdoor conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 15, 55-61.

Schiavon M, Dousset S, Portal JM, Guimont HPH, 1996. Etude du transfert par les eaux de drainage de divers produits phytosanitaires dans trois sols de Lorraine. Campagne 1994-1995. Rapport d'étude de l'agence de l'eau Rhin-Meuse, CNRS, Institut Polytechnique de Lorraine, ENSAIA Nancy, 13p.

Schreck E, Geret F, Gontier L, Treilhou M, 2008 a. Development and validation of a rapid multiresidue method for pesticide determination using gas chromatography - mass spectrometry: a realistic case in vineyard soils. *Talanta* 78, 298-303.

Schreck E, Geret F, Gontier L, Treilhou M, 2008 b. Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere* 71, 1832-1839.

Serrano E, Lauriac E, Chantelot E, 2001. Entretien des sols dans trois vignobles de Midi-Pyrénées: Résultats d'enquête et éléments de réflexion : Lutte contre les mauvaises herbes. *Phytoma, la défense des végétaux* 544, 39-41.

Shannon D, Sen AM, Johnson DB, 2002. A comparative study of the microbiology of soils managed under organic and conventional regimes. *Soil Use Manage* 18, 274-283.

Siimes K, Rämö S, Welling L, Nikunen U, Laitinen P, 2006. Comparison of the behaviour of three herbicides in a field experiment under bare soil conditions. *Agricultural Water Management* 84, 53-64.

Singh DK et Agarwal RA, 1987. Effect of the synthetic pyrethroid permethrin on the snail *Lymanea acuminata*. *Sciences Total Environment* 67, 263-267.

Smith JL, Paul EA, 1990. The significance of soil microbial biomass estimations. *Soil Biochemistry* 6. Marcel Dekker, New York, 357–396.

Soler C, Mañes J, Picó Y, 2004. Liquid chromatography–electrospray quadrupole ion-trap mass spectrometry of nine pesticides in fruits. *Journal of Chromatography A* 1048, 41-49.

Stark C, Condrón LM, Stewart A, Di HJ, O’Callaghan M, 2006. Effects of past and current management practices on crop yield and nitrogen leaching- : a comparison of organic and conventional cropping systems. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 34, 207-215.

Stagg R et Addison R, 1995. A inter-laboratory comparison of measurements of ethoxyresorufin-O-deethylase activity in dab (*Limanda limanda*) liver. *Marine Environmental Research* 40, 93-108.

Stagg R et McIntosh A, 1998. Biological effects of contaminants: Determination of CYP1A-dependant mono-oxygenase activity in dab by fluorometric measurement of EROD activity. *Techniques in Marine Environmental Sciences* 23, ICES, Palaegade 2-4. DK-1267 Copenhagen K. Denmark 16p.

Steenwerth K et Belina KM, 2008. Cover crops enhance soil organic matter, carbon dynamics and microbiological function in a vineyard agroecosystem. *Applied Soil Ecology* 2, 359-369.

Stegeman JJ et Hahn ME, 1994. Regulation of cytochrome P4501A1 in teleosts: Sustained induction of CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the marine fish *Stenotomus chrysops*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 127, 187-198.

Suthar S, Singh S, Dhawan S, 2008. Earthworms as bioindicator of metals (Zn, Fe, Mn, Cu, Pb and Cd) in soils: Is metal bioaccumulation affected by their ecological category? *Ecological Engineering* 32, 99-107.

Tao S, Guo LQ, Wang XJ, Liu WX, Ju TZ, Dawson R, Cao J, Xu FL, Li BG, 2004. Use of sequential ASE extraction to evaluate the bioavailability of DDT and its metabolites to wheat roots in soils with various organic carbon contents. *The Science of the Total Environment* 320, 1-9.

Tomlin AD, 1980. *La biologie du ver de terre*, 10 p.

Topuz S, Özhan G, Alpertunga B, 2005. Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD. *Food Control* 16, 87-92.

Tournebize J, 2001. Impacts de l'enherbement du vignoble alsacien sur le transfert des nitrates. Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, 310 p.

Tournebize J, Kao C, Nikolic N, Zimmer D, 2004. Adaptation of the STICS model to subsurface drained soils. *Agronomie* 24, 305-313.

Tsiropoulos NG, Bakeas EB, Raptis V, Batistatou SS, 2006. Evaluation of solid sorbents for the determination of fenhexamid, metalaxyl-M, pyrimethanil, malathion and myclobutanil residues in air samples: Application to monitoring malathion and fenhexamid dissipation in greenhouse air using C-18 or Supelpak-2 for sampling. *Analytica Chimica Acta* 573-574, 209-215.

University of Hertfordshire, 2008. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/>

Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS, 1987. Microbial biomass measurements in forest soils: the use of the chloroform fumigation–incubation method in strongly acid soils. *Soil biology & biochemistry* 19, 697-702.

Van der Werf H, 1996. Assessing the impact of the pesticides on the environment. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 60, 81-96.

Van Dijck SJE et Van Asch TWJ, 2002. Compaction of loamy soils due to tractor traffic in vineyards and orchards and its effect on infiltration in southern France. *Soil and Tillage Research* 63, 141-153.

Venkateswarlu P, Mohan KR, Kumar CR, Sessaiah K, 2007. Monitoring of multi-class pesticide residues in fresh grape samples using liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 105, 1760-1766.

Voltz M et Louchart X, 2001. Les facteurs-clés de transfert des produits phytosanitaires vers les eaux de surface. 31^{ème} Congrès du Groupe français des pesticides, Lyon, mai 2001 dans *Ingénieries*, 154 p.

Wander MM, Hedrick DS, Kaufman D, Traina SJ, Stinner BR, Kehmeyer SR, White DC, 1995. The functional significance of the microbial biomass in organic and conventionally managed soils. *Plant Soil* 170, 87-97.

Wang W, Meng B, Lu X, Liu Y, Tao S, 2007. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. *Analytica Chimica Acta* 602, 211-222.

Wedding A, Hund-Rinke K, Rutgers M, 2005. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 230-248.

Whelan MJ, Davenport EJ, Smith BG, 2007. A globally applicable location-specific screening model for assessing the relative risk of pesticide leaching. *Science of The Total Environment* 377, 192-206.

Wu J, Joergensen RG, Pommerening B, Chaussod R, Brookes PC, 1990. Measurement of soil microbial biomass C by fumigation extraction an automated procedure. *Soil Biology and Biochemistry* 22, 1167-1169.

Xiao N, Jing B, Ge F, Liu X, 2006. The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Eisenia fetida* under laboratory conditions. *Chemosphere* 62, 1366-1373.

Yaron B, 1989. General principle of pesticide movement to groundwater. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 26, 275-297.

Yoshimura H, Endoh YS, Harada K, 2005. *Gryllus bimaculatus*: A possible bioindicator organism for detection of chemical pollutants in terrestrial systems. *Ecological Indicators* 5, 181-188.

Zhang M, Geng S, Ustin SL, Tanji KK, 1997. Pesticide occurrence in groundwater in Tulare county, California. *Environmental Monitoring and Assessment* 45, 101-127.

Zimmer D, Bouzigues R, Chossat JC, Favrot JC, Guiresse AM, 1991. Importance et déterminisme des infiltrations profondes en luvisols-redoxisols drainés. Incidence sur les modalités de drainage. *Science du Sol* 29, 321-337.

Zimmer D, 1995. Drainage, assainissement agricole et crues : un débat qui reste d'actualité. *Géomètre* 7, 36-39.

Zougagh M, Bouabdallah M, Salghi R, Hormatallah A, Rios A, 2008. Supercritical fluid extraction as an on-line clean-up technique for rapid amperometric screening and alternative liquid chromatography for confirmation of paraquat and diquat in olive oil samples. *Journal of Chromatography A* 1204, 56-61.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Spectres de masse des molécules de l'étude

06071208 #669-694 RT: 7.70-7.84 AV: 26 NL: 2.22E4
T: + e Full ms [70.00-550.00]

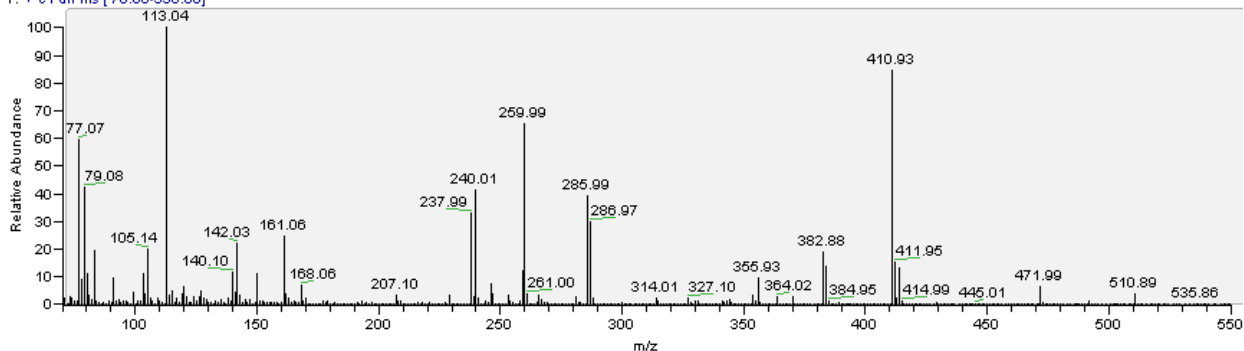


Figure A.1 : Spectre de masse de la molécule de glyphosate ($M = 169,1 \text{ g mol}^{-1}$) dérivée par le TFAA et le TFE

06091302 #861 RT: 12.34 AV: 1 NL: 4.12E4
T: + e Full ms [50.00-450.00]

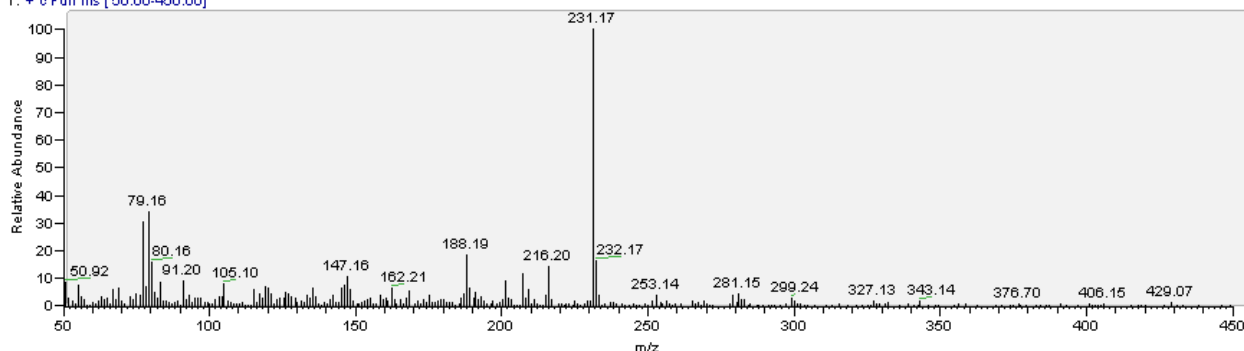


Figure A.2 : Spectre de masse du produit de thermolyse du flazasulfuron ($M = 407,4 \text{ g mol}^{-1}$)

06092202 #1994 RT: 20.18 AV: 1 SB: 1296 22.01-25.12 , 15.47-18.92 NL: 3.40E4
T: + e Full ms [50.00-450.00]

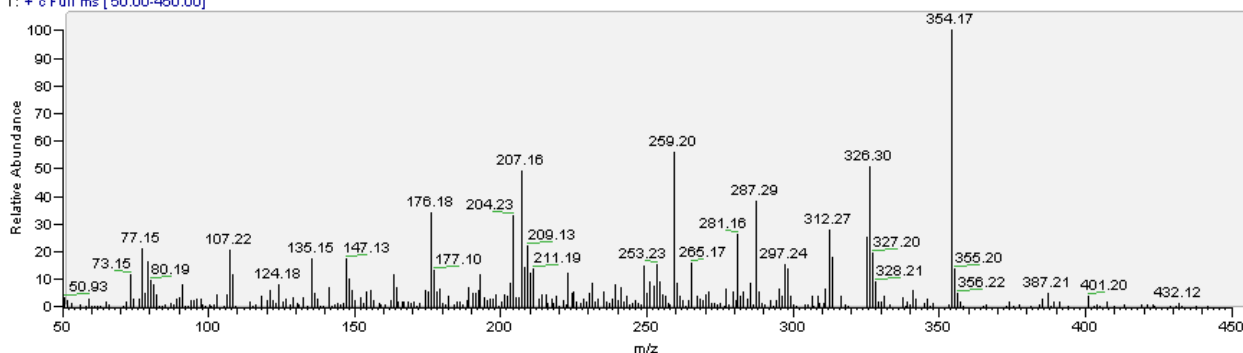


Figure A.3 : Spectre de masse de la flumioxazine ($M = 354,3 \text{ g mol}^{-1}$)

06051702 #185-204 RT: 12.97-13.06 AV: 20 NL: 1.63E5
T: + e Full ms [50.00-450.00]

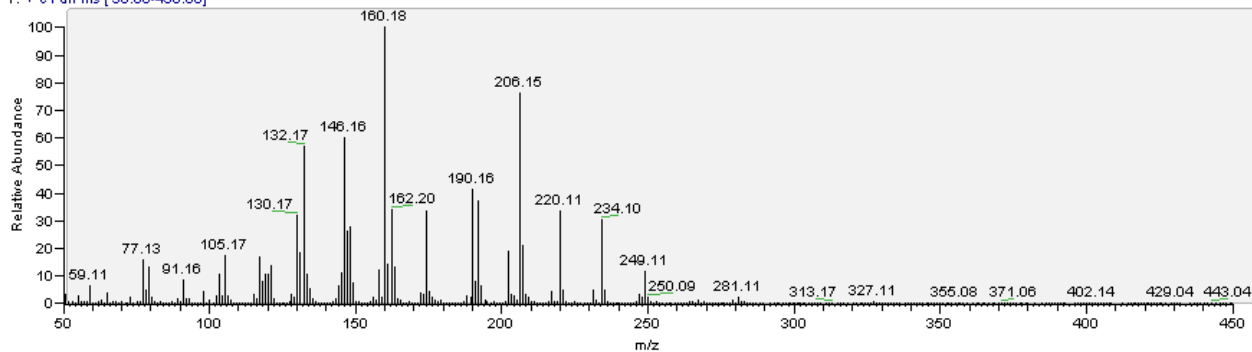


Figure A.4 : Spectre de masse du métalaxyl ($M = 279,3 \text{ g mol}^{-1}$)

06032802 #1452 RT: 14.87 AV: 1 NL: 5.73E6
T: + e Full ms [50.00-450.00]

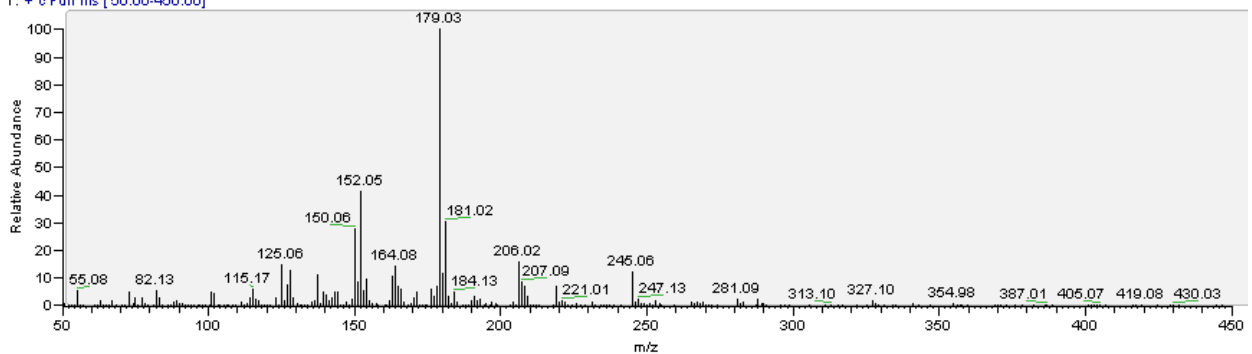


Figure A.5 : Spectre de masse du myclobutanil ($M = 288,8 \text{ g mol}^{-1}$)

06032904 #1370-1375 RT: 14.18-14.22 AV: 6 NL: 1.26E6
T: + e Full ms [50.00-450.00]

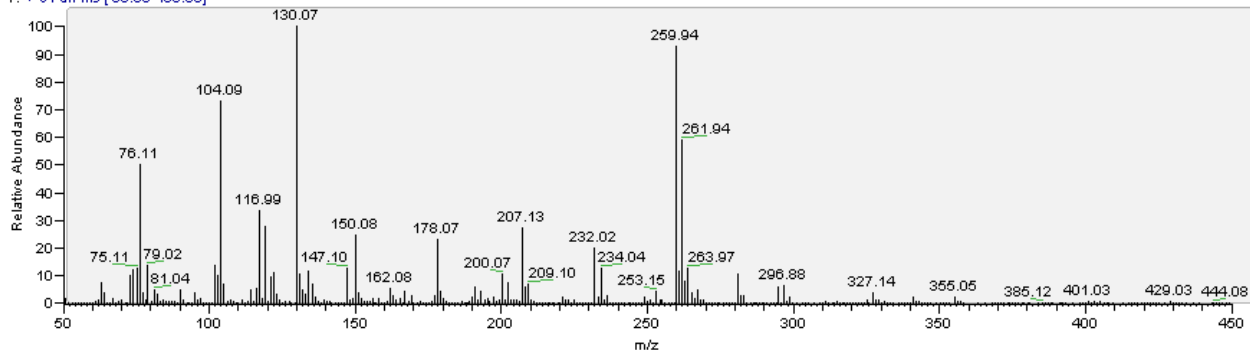


Figure A.6 : Spectre de masse du folpel ($M = 296,6 \text{ g mol}^{-1}$)

06031404 #1217-1219 RT: 13.47-13.48 AV: 3 NL: 1.99E6
T: + c Full ms [50.00-450.00]

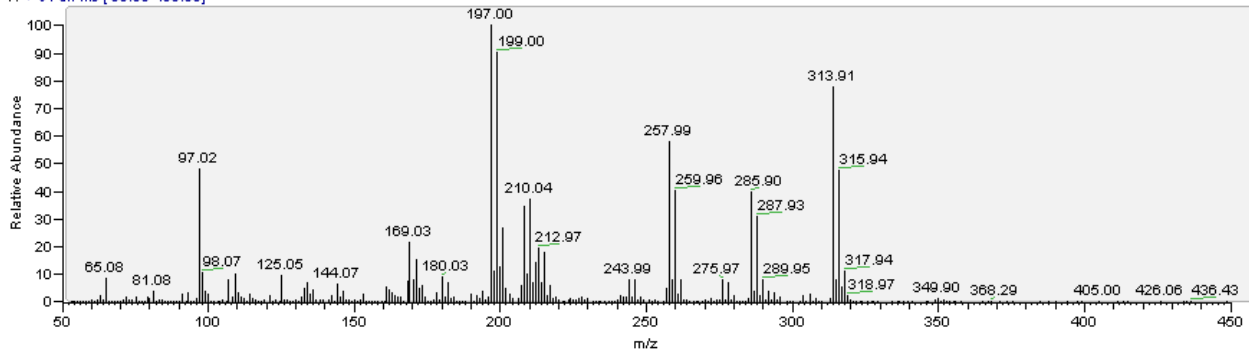


Figure A.7 : Spectre de masse du chlorpyrifos-éthyl ($M = 350,6 \text{ g mol}^{-1}$)

06040701 #1726 RT: 17.01 AV: 1 NL: 5.69E6
T: + c Full ms [50.00-450.00]

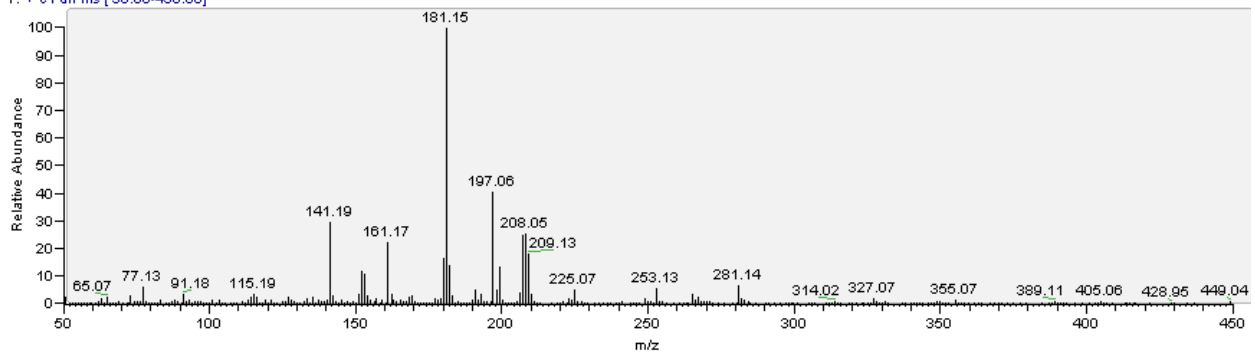


Figure A.8 : Spectre de masse de la λ -cyhalothrine ($M = 449,9 \text{ g mol}^{-1}$)

ANNEXE 2 : Dosage de l'activité EROD (Ethoxyresorufine-O-dééthylase)

Ce protocole a été adapté des travaux réalisés par **Burgeot *et al.* (1994)** sur des poissons marins. L'ensemble des essais et des manipulations doit être réalisé à l'abri des poussières à 4 ± 2 °C. La réaction enzymatique en microplaque doit être réalisée à 20 ± 2 °C.

Réactifs et solutions :

- Tampon d'homogénéisation (1 litre) :

a- Peser : KCl (150 mmol L^{-1}) : 11,2 g ; EDTA (1 mmol L^{-1}) : 372 mg ; Dithiothreitol (DTT 1 mmol L^{-1}) : 154 mg

b- Tampon phosphate (100 mmol L^{-1} , pH 7,8)

Solution A : 35,8 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dans 1 litre d'eau ultra pure, Solution B : 3,40 g de KH_2PO_4 dans 250 mL d'eau ultra pure

La solution A est ajustée à pH 7,8 avec la solution B.

c- Tampon phosphate-glycérol 20 %

Pour la congélation des homogénats, rajouter 20 % de glycérol au tampon phosphate.

d- Dissoudre sous agitation le KCl 150 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} + DTT 1 mmol L^{-1} dans 1 litre de tampon phosphate-glycérol 20%

- Solution de 7-éthoxyrésorufine ($M = 241$)

Deux méthodes de préparation possibles a) à partir de 7 éthoxyrésorufine prépesée à 1 mg achetée dans le commerce ou b) à partir de 7 éthoxyrésorufine non prépesée.

a) Préparer la solution mère directement dans un vial ambré contenant 1 mg prépesé de 7-éthoxyrésorufine (Sigma référence E3763) en ajoutant 2,5 mL de DMSO. Calculer la dilution *ad hoc* pour la solution de travail à $46 \mu\text{mol L}^{-1}$ qui sera ensuite déposée dans chaque puit de la microplaque pour obtenir une concentration 2 mol L^{-1} .

b) Préparer à l'avance une solution saturée de 7 éthoxyrésorufine dans du DMSO. Préparer la solution de travail en mesurant la concentration de la solution précédente en colorimétrie (à 482 nm, le coefficient d'extinction molaire est le suivant: $2,25 \cdot 10^4$

mol L⁻¹ cm⁻¹. Calculer la dilution *ad hoc* pour la solution de travail à 46 μmol L⁻¹ qui sera ensuite déposée dans chaque puit de la microplaque pour obtenir une concentration 2 μmol L⁻¹.

L'éthoxyrésorufine se dégrade rapidement à la lumière. Maintenir la solution mère d'éthoxyrésorufine dans un flacon ambré et recouvert de papier aluminium. Se conserve à 4°C et dans l'obscurité pendant 1 à 2 semaines.

- Solution de NADPH (M = 833,4)

Dissoudre 19,2 mg de NADPH dans 4 mL d'eau ultra pure. Solution très instable, à préparer extemporanément et maintenir à 4°C à l'abri de la lumière (flacon recouvert de papier aluminium).

- Solution de référence de résorufine

a) La résorufine pure possède une absorption maximale à 572 nm dans du tampon phosphate 0,1 mol L⁻¹ ; pH 7,8 et son coefficient d'extinction molaire: 0,0732 μmol L⁻¹ cm⁻¹ (**Koltz et al., 1983**).

Le calcul de la concentration exacte de résorufine peut être vérifié suivant l'équation:

$$A = \epsilon CL$$

A = Absorbance à 572 nm

ϵ = le coefficient d'extinction (0,0732 μmol L⁻¹ cm⁻¹ dans du tampon phosphate 100 mmol L⁻¹, pH 7,8)

C = concentration (1 μmol L⁻¹)

L = la longueur de lecture dans la cuve ou trajet optique (cm)

b) Protocole de contrôle de la concentration de résorufine

Les exercices d'intercalibration ont révélé des erreurs de concentrations de la solution standard de résorufine qui peuvent être liées à des difficultés de dilution de la résorufine ou bien à des qualités diverses de pureté de la résorufine (**Stagg et Addison, 1995**). Un protocole a été proposé à la suite des exercices d'intercalibration pour limiter cette source d'erreur en vérifiant la concentration exacte de la résorufine (**Minchin et al., 2000**) par mesure de l'absorbance A_{572} .

b-1. Préparer une solution de stockage de résorufine 50 mmol L⁻¹ dans du DMSO (utiliser des pipettes à déplacement positif).

La résorufine (PM = 235,2) est pesée puis préparée dans une fiole jaugée maintenue à l'abri de la lumière et sous agitation pendant deux heures.

b-2. A partir de la solution de stockage de 50 mmol L⁻¹, préparer deux solutions de résorufine à 50 µmol L⁻¹ et 500 µmol L⁻¹ par dilution dans du tampon phosphate (K₂HPO₄/KH₂PO₄ 100 mmol L⁻¹ à pH 7,8)

→ Solution de résorufine 500 µmol L⁻¹ : Dans un microtube eppendorf (1,5 mL) ajouter 10 µL de la solution 50 mmol L⁻¹ et 990 µL de tampon phosphate 0,1 mol L⁻¹ ; pH 7,8.

→ Solution de résorufine 50 µmol L⁻¹ à partir de la solution 500 µmol L⁻¹ (150 µL de solution

50 µmol L⁻¹ dans 1350 µL de tampon phosphate 0,1 mol L⁻¹ ; pH 7,8.

b-3. Principe du contrôle de la concentration de résorufine par mesure de l'absorbance:

Soit une solution 25 mol L⁻¹ est utilisée pour construire la courbe standard permettant de transformer l'activité EROD d'une unité de fluorescence en µmol de résorufine. Une solution 25 µmol L⁻¹ de résorufine dans une cuvette de 1 cm, l'absorbance A₅₇₂ doit être de 1,83 ± 0,04 (**Stagg et McIntosh, 1998 ; Minchin et al., 2000**).

Ajustement de la valeur d'absorbance d'une solution 25 µmol L⁻¹ à 1,83 ± 0,04. Exemple : Préparer une solution 50 µmol L⁻¹. La valeur d'absorbance A₅₇₂ de la solution 50 µmol L⁻¹ est mesurée. La valeur d'absorbance est ajustée à 1,83 ± 0,04 pour obtenir une solution 25 µmol L⁻¹. L'ajustement est réalisé soit par dilution avec du tampon phosphate pour réduire l'absorbance soit en ajoutant la solution 500 µmol L⁻¹ de résorufine. Utiliser les équations suivantes pour calculer le volume de tampon phosphate (V_{db}) ou de solution de résorufine 500 µmol L⁻¹ (V_d) à ajouter.

$$Vb = (((A_{572} / \epsilon) / C) \times Va) - Va$$

Vb = volume de tampon phosphate 100 mmol L⁻¹, pH 7,8 (µL)

Va = volume de tampon phosphate 100 mmol L⁻¹, pH 7,8 déjà ajouté (µL)

ε = 0,0732 µmol L⁻¹ cm⁻¹

C = 25 µmol L⁻¹

$$Vd = ((C \epsilon Vc) / A_{572}) - Vc$$

Vd = volume de solution 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ à ajouter (μL)

Vc = volume de solution 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ déjà ajouté (μL)

ϵ = 0,0732 $\mu\text{mol L}^{-1}\text{cm}^{-1}$

C = 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$

Après ajustement à $1,83 \pm 0,04$ de l'absorbance lue à 572 nm, maintenir la solution de résorufine 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ à 4°C et à l'abri de la lumière.

Gamme étalon de résorufine permettant la transformation des unités de fluorescence en μmol

A partir de la solution de référence de résorufine 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, préparer par dilution dans du tampon phosphate 100 mmol L^{-1} pH 7,8, six solutions pour réaliser la gamme de résorufine: 12,5 ; 3,125 ; 0,781 ; 0,391 ; 0,195 ; 0,048 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Homogénéisation et préparation de la fraction enzymatique

Faire décongeler les vers et les maintenir à 4°C. Broyage à l'homogénéiseur à 4°C. L'homogénat est ensuite versé dans un tube eppendorf et centrifugé à 9 000 g pendant 20 à minutes à 4°C.

A la sortie de la centrifugeuse réfrigérée, les tubes sont déposés sur un lit de glace. Prélever 1 mL du surnageant, en prenant soin d'éviter de pipeter dans la couche lipidique blanchâtre parfois présente en surface.

Mesure de l'activité enzymatique EROD

Principe

Cette mesure est basée sur l'augmentation de fluorescence du milieu réactionnel due à la transformation de la 7 éthoxyrésorufine en résorufine (cette dernière étant 100 fois plus fluorescente). La méthode avec lecture en spectrofluorimètre à cuve a été transposée en microplaque (Galgani et Payne, 1991).

La fluorescence des échantillons est rapportée en quantité de résorufine par l'intermédiaire d'une gamme étalon (de résorufine). Par la suite, les activités EROD sont rapportées à la quantité de protéines par un dosage (Bradford, 1976).

Dosage de l'activité enzymatique EROD

Chaque échantillon de surnageant (100 μL) est déposé dans un puit et dosé en triplicat (éviter les bords de la plaque pour éviter d'éventuels effets de bord lors de la

lecture). Le tampon phosphate (200 µL) et la 7-ethoxyrésorufine (10 µL) sont ensuite ajoutés dans chaque puit.

Immédiatement après l'introduction du dernier réactif NADPH (10 µL) qui entraîne le démarrage immédiat de la cinétique enzymatique, installer la plaque dans le spectrofluorimètre et déclencher le chronomètre en même temps que la première lecture (t_0) puis effectuer deux autres lectures après 2 minutes (t_2) puis 10 minutes (t_{10}). A cause d'une phase de latence au début de la réaction, il est recommandé de prendre les valeurs (t_0) - (t_2) pour calculer l'activité spécifique EROD.

Dosage des protéines

Les protéines sont mesurées à partir d'un aliquote prélevé dans le surnageant qui est lui même utilisé pour chaque mesure d'activité enzymatique EROD. La méthode appliquée est la méthode de **Bradford (1976)** utilisant comme standard du sérum albumine de boeuf (BSA). La mesure est réalisée avec un spectrophotomètre lecteur de microplaques à la longueur d'onde de 595 nm.

Calcul et expression des résultats

Les activités s'expriment en **µmol min⁻¹ mg⁻¹ de protéines**. Le calcul consiste à exprimer l'écart de fluorescence en équivalent de pmol de résorufine formée par unité de temps (via la solution de référence) par une règle de trois ; ensuite il suffit de rapporter ce résultat à la quantité de protéine présente (résultat du dosage de protéines).

Dans le cas présent (avec les paramètres retenus pour le mélange réactionnel dans les puits de la microplaque) :

$$\text{EROD} = ([\text{équivalent résorufine}] \times \text{volume réactionnel (230}\mu\text{L)}) / \text{durée (min)} \times [\text{protéines}] \times \text{volume (10 }\mu\text{L)}$$

LISTE DES FIGURES

Synthèse bibliographique

- Figure 1.1 : Désherbage intégral sous le rang et sur l'inter-rang
- Figure 1.2 : Couvert hivernal sur la parcelle de l'étude, développé spontanément mais toléré et même recherché afin de protéger le sol et la culture
- Figure 1.3 : Travail du sol (actisol) sur l'inter-rang d'une des modalités de la parcelle de l'étude
- Figure 1.4 : Enherbement fleuri semé sur l'inter-rang
- Figure 1.5 : Désherbage thermique de la vigne
- Figure 1.6 : Formule développée du glyphosate
- Figure 1.7 : Formule développée de la flumioxazine
- Figure 1.8 : Formule développée du flazasulfuron
- Figure 1.9 : Formule développée du diquat
- Figure 1.10 : Formule développée du folpel
- Figure 1.11 : Formule développée du métalaxyl-M ou méfénoxam
- Figure 1.12 : Formule développée du fosétyl-aluminium
- Figure 1.13 : Formule développée du myclobutanil
- Figure 1.14 : Formule développée du chlorpyrifos-éthyl
- Figure 1.15 : Formule développée de la λ -cyhalothrine
- Figure 1.16. Devenir des pesticides dans l'environnement après application en vignoble
- Figure 1.17. Schéma d'un dispositif de drainage agricole
- Figure 1.18 : Représentation schématique des relations fonctionnelles entre les vers de terre et leur environnement externe
- Figure 1.19 : Coupe transversale d'un métamère de lombric
- Figure 1.20 : Représentation des méthodologies faisant appel à l'utilisation des biomarqueurs dans l'évaluation des risques écotoxicologiques
- Figure 1.21 : Inhibition de l'activité acétylcholinestérase par un contaminant
- Figure 1.22 : Schéma des voies majeures de la biotransformation conduisant à la détoxification ou à la toxication des xénobiotiques organiques chez les animaux

Figure 1.23 : Le processus de métabolisation des molécules actives polluantes

Figure 1.24 : Réaction catalysée par l'EROD

Figure 1.25 : Mécanisme de production de la protéine P450 après pénétration d'un polluant dans la cellule

Figure 1.26 : Enzymes du système antioxydant et place de la catalase

Influence de la pratique culturale sur le transfert de produits phytosanitaires

Figure 2.1 : Photographie de la parcelle mise à disposition pour le projet par le DEVT en 2000

Figure 2.2 : Vue aérienne de la parcelle

Figure 2.3 : Profil schématique du sol type réalisé dans la zone de bouldiers accompagné des caractéristiques structurales et texturales de ce sol

Figure 2.4 : Profil schématique du sol type réalisé dans la zone de graves accompagné des caractéristiques structurales et texturales de ce sol

Figure 2.5 : Carte topographique de la parcelle expérimentale

Figure 2.6 : Découpage de la parcelle en 4 modalités

Figure 2.7 : Schéma de plantation des ceps de vignes sur la parcelle

Figure 2.8 : Dispositif de drainage de la parcelle

Figure 2.9 : Dispositif de prélèvement des eaux de drainage et de mesure des débits affiliés

Figure 2.10 : Mécanisme du basculement de l'auget et conséquences de la modification de la hauteur des points d'arrêt

Figure 2.11 : Prélèvement de sols sur la parcelle en sortie d'hiver sur la modalité désherbée

Figure 2.12 : Maillage systématique de la parcelle : un prélèvement de sol est effectué de manière aléatoire dans la maille de chaque modalité

Figure 2.13 : Extracteur ASE 100 (Dionex) et ses cellules

Figure 2.14 : Extraction liquide-liquide au dichlorométhane des molécules présentes dans l'eau de drainage

Figure 2.15 : Chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse à piégeage de charges

Figure 2.16 : Chromatogramme HPLC-UV de la séparation d'un mélange de 6 pesticides à 2,5 µg mL⁻¹

Figure 2.17 : Chromatographe liquide couplé à un spectromètre de masse par trappe d'ion

Figure 2.18 : Chromatogramme qualitatif en mode TIC (Courant ionique total)

Figure 2.19 : Identification du myclobutanil en TIC et appel d'ion dans un échantillon d'eau de drainage collectée sur la parcelle (Modalité 1, 08/12/2006)

Figure 2.20 : Faible rendement d'extraction du glyphosate du sol par extraction liquide pressurisée à l'ASE 100 de Dionex

Figure 2.21 : Réaction de dérivation du glyphosate et de l'AMPA avec du trifluoroéthanol (TFE) et de l'anhydride trifluoroacétique (TFAA)

Figure 2.22 : Spectre du glyphosate en infusion dans le méthanol LC-MS (ESI⁻ ; 0.01 µg µL⁻¹) puis spectre de l'ion fils après cassure en MS/MS (énergie de collision de 43 % et activation de 15 ms (Q = 0,25))

Figure 2.23 : Spectre du diquat en infusion dans le méthanol LC-MS (ESI⁺ ; 0.01 µg µL⁻¹) puis spectre de l'ion fils après cassure en MS/MS (énergie de collision de 33 % et activation de 15 ms (Q = 0,25))

Figure 2.24 : Bruit de fond et effet matrice sur un échantillon de sol témoin

Figure 2.25 : De l'extraction à la détermination et au dosage analytique

Figure 2.26 : Chronique d'écoulement de l'eau au niveau des drains de chaque modalité en relation avec les épisodes pluvieux

Figure 2.27 : Individualisation des épisodes de drainage par la méthode des critères d'indépendance des crues

Figure 2.28 : Simulation des débits pour chaque modalité, corrélation avec les débits observés

Figure 2.29 : Courbes des double-cumuls (lames d'eaux drainées en fonction des pluies cumulées) pour les modalités comparées de l'étude (désherbée : DES ; travaillée : TRA et enherbée : ENB) permettant la détermination des saisons de drainage

Figure 2.30 : Comparaison de la pluviométrie de l'année 2008 avec la moyenne de la pluviométrie des dix dernières années

Figure 2.31 : Fente de dessiccation sur la modalité désherbée au début de l'automne

Figure 2.32 : Courbe double-cumul « débit-débit » : courbe des lames d'eaux drainées de la modalité travaillée (TRA) en fonction des lames d'eau drainées par la modalité enherbée (ENH)

Figure 2.33 : Courbes double-cumuls « débit-débit » : courbes des lames d'eaux drainées pour les modalités travaillée (TRA) et enherbée (ENH) en fonction des lames d'eaux drainées par la modalité désherbée (DES)

Figure 2.34 : Concentrations en fongicides métalaxyl et myclobutanil dans les sols des rangs de la parcelle

Figure 2.35 : Concentrations en herbicides flzasulfuron et flumioxazine dans les sols des rangs de la parcelle

Figure 2.36 : Concentrations en métalaxyl dans les sols des inter-rangs de la parcelle

Figure 2.37 : Concentrations en myclobutanil dans les inter-rangs des sols de la parcelle

Figure 2.38 : Concentrations en flzasulfuron dans les inter-rangs des sols de la parcelle

Figure 2.39 : Concentrations en flumioxazine dans les inter-rangs des sols de la parcelle

Figure 2.40 : Concentrations en λ -cyhalothrine dans les inter-rangs des sols de la parcelle

Figure 2.41 : Formule de calcul de la surface externe du couvert végétal (SECV) de la vigne

Figure 2.42 : Concentrations ponctuelles en métalaxyl dans les eaux d'infiltration des 3 modalités comparées en relation avec la pluviométrie (histogramme bleu)

Figure 2.43 : Concentrations ponctuelles en myclobutanil dans les eaux d'infiltration des 3 modalités comparées en relation avec la pluviométrie (histogramme bleu)

Figure 2.44 : Concentrations ponctuelles en flzasulfuron dans les eaux d'infiltration des 3 modalités comparées en relation avec la pluviométrie (histogramme bleu)

Figure 2.45 : Concentrations ponctuelles en flumioxazine dans les eaux d'infiltration des 3 modalités comparées en relation avec la pluviométrie (histogramme bleu)

Figure 2.46 : Volumes écoulés et concentrations moyennes en métalaxyl dans les eaux de drainage en fonction de la modalité d'entretien du sol

Figure 2.47 : Volumes écoulés et concentrations moyennes en myclobutanil dans les eaux de drainage en fonction de la modalité d'entretien du sol

Figure 2.48 : Volumes écoulés et concentrations moyennes en flazasulfuron dans les eaux de drainage en fonction de la modalité d'entretien du sol

Figure 2.49 : Volumes écoulés et concentrations moyennes en flumioxazine dans les eaux de drainage en fonction de la modalité d'entretien du sol

Figure 2.50 : Proportion de métalaxyl transférée vers le sol et les eaux d'infiltration par rapport aux quantités épandues en saison de drainage

Figure 2.51 : Proportion de myclobutanil transférée vers le sol et les eaux d'infiltration par rapport aux quantités épandues en saison de drainage

Figure 2.52 : Proportion de flumioxazine transférée vers le sol et les eaux d'infiltration par rapport aux quantités épandues en saison de drainage

Etude écotoxicologique de la pollution des sols en relation avec leur entretien

Figure 3.1 : Positionnement dans le temps des prélèvements de lombrics par rapport aux traitements phytosanitaires de la parcelle et au climat (température et pluviométrie)

Figure 3.2 : Extraction de la terre et tri manuel du sol

Figure 3.3 : Extraction de la terre et isolement des lombriciens après émiettement des mottes de terre

Figure 3.4 : Les étapes du traitement des vers en laboratoire après la phase de jeûne: identification, pesée et congélation à - 80°C dans des tubes annotés en attendant l'analyse biomarqueurs

Figure 3.5 : Expérimentation de contamination de lombriciens en conditions contrôlées

Figure 3.6 : Prélèvement des lombriciens par tri manuel de la terre

Figure 3.7 : Congélation individuelle des vers après le jeûne

Figure 3.8 : Principe du dosage de la GST

Figure 3.9 : Schéma de lecture en microplaques

Figure 3.10 : Principe de dosage de la catalase

Figure 3.11 : Principe du dosage de la ChE

Figure 3.12 : Courbes étalon types (quantité de matière et concentration) établies pour le dosage des protéines

Figure 3.13 : Schéma de lecture du dosage des protéines en microplaques

Figure 3.14 : Résultats de la quantification de la biomasse microbienne des sols de la parcelle expérimentale en fonction de l'entretien des inter-rangs

Figure 3.15 : Espèces de lombriciens les plus représentées sur la parcelle

A- *Nicodrilus nocturnus* (*Aporrectodea caliginosa nocturna*) B- *Lumbricus friendi*

Figure 3.16 : Evolution du nombre de lombrics par m² sur les inter-rangs de chacune des modalités

Figure 3.17 : Evolution du nombre de lombrics par m² sous les rangs de chacune des modalités

Figure 3.18 : Répartition du nombre de vers identifiés par m² (*Aporrectodea*, *Lumbricus* et juvéniles) au niveau des inter-rangs et sous le rang de chacune des modalités d'entretien du sol et sur la bande enherbée témoin en 2006

Figure 3.19 : Répartition du nombre de vers identifiés par m² (*Aporrectodea*, *Lumbricus*) au niveau des inter-rangs et sous le rang de chacune des modalités d'entretien du sol et sur la bande enherbée témoin en 2008

Figure 3.20 : Répartition du nombre de vers identifiés par m² (*Aporrectodea*, *Lumbricus* et endogés) au niveau des inter-rangs de chacune des modalités d'entretien du sol et sur la bande enherbée témoin

Figure 3.21 : Répartition du nombre de vers identifiés par m² (*Aporrectodea*, *Lumbricus* et endogés) sous les rangs de chacune des modalités d'entretien du sol

Figure 3.22 : Activités spécifiques des 3 enzymes suivies comme biomarqueurs sur les vers prélevés sous le rang le 22/06/2007 (après les épandages d'insecticides et de fongicides du printemps) pour chacune des modalités d'entretien du sol des inter-rangs et des témoins

Figure 3.23 : Positionnement dans le temps des épandages sous le rang (identiques pour chacune des modalités) par rapport aux dates de prélèvement des lombrics

Figure 3.24 : Activités spécifiques des 3 enzymes suivies comme biomarqueurs sur les vers prélevés à différentes dates sur la parcelle en 2007, pour chacune des modalités d'entretien du sol au niveau des inter-rangs et de la zone témoin

Annexes

Figure A.1 : Spectre de masse de la molécule de glyphosate ($M = 169,1 \text{ g mol}^{-1}$) dérivée par le TFAA et le TFE

Figure A.2 : Spectre de masse du produit de thermolyse du flazasulfuron ($M = 407,4 \text{ g mol}^{-1}$)

Figure A.3 : Spectre de masse de la flumioxazine ($M = 354,3 \text{ g mol}^{-1}$)

Figure A.4 : Spectre de masse du métalaxyl ($M = 279,3 \text{ g mol}^{-1}$)

Figure A.5 : Spectre de masse du myclobutanil ($M = 288,8 \text{ g mol}^{-1}$)

Figure A.6 : Spectre de masse du folpel ($M = 296,6 \text{ g mol}^{-1}$)

Figure A.7 : Spectre de masse du chlropyrifos-éthyl ($M = 350,6 \text{ g mol}^{-1}$)

Figure A.8 : Spectre de masse de la λ -cyhalothrine ($M = 449,9 \text{ g mol}^{-1}$)

LISTE DES TABLEAUX

Synthèse bibliographique

Tableau 1.1 : Molécules actives insecticides et formulations utilisées par les vigneron du gaillacois (en pourcentage de viticulteurs de la coopérative)

Tableau 1.2 : Molécules actives fongicides et formulations utilisées par les vigneron du gaillacois (en pourcentage de viticulteurs de la coopérative) pour la lutte contre l'oïdium

Tableau 1.3 : Molécules actives fongicides et formulations utilisées par les vigneron du gaillacois (en pourcentage de viticulteurs de la coopérative) pour la lutte contre le mildiou

Tableau 1.4. Caractéristiques des molécules de l'étude

Influence de la pratique culturale sur le transfert de produits phytosanitaires

Tableau 2.1 : Conditions des épandages phytosanitaires

Tableau 2.2 : Traitements et interventions réalisés sur la parcelle en 2006

Tableau 2.3 : Traitements et interventions réalisés sur la parcelle en 2007

Tableau 2.4 : Traitements et interventions réalisés sur la parcelle en 2008

Tableau 2.5 : Synthèse bibliographique non exhaustive d'articles récents relatant des méthodes de détermination des pesticides de notre étude dans différentes matrices

Tableau 2.6 : Récapitulatif des paramètres de la méthode d'extraction définis pour la matrice sol

Tableau 2.7 : Rendements de l'extraction liquide-liquide des pesticides des eaux de drainage

Tableau 2.8 : Gradient de solvant de la méthode multi-résidus HPLC/UV

Tableau 2.9 : Récapitulatif des données relatives aux molécules pour une analyse en HPLC-UV

Tableau 2.10 : Rendements de l'extraction par PLE et caractéristiques du dosage des molécules en GC-MS à partir d'échantillons de sol

Tableau 2.11 : Rendements de l'extraction liquide-liquide et limites de détection méthodologiques du dosage des molécules en GC-MS à partir d'échantillons d'eaux de drainage

Tableau 2.12 : Episodes de drainage et coefficients de restitution pour chaque modalité pour l'année 2008

Etude écotoxicologique de la pollution des sols en relation avec leur entretien

Tableau 3.1 : Composition du milieu gélosé PCA

Tableau 3.2 : Doses (en mg) de molécules actives introduites dans les 6 kg de terre des terraria

Tableau 3.3 : Composition du tampon mixte d'homogénéisation (pour 500 mL d'eau distillée)

Tableau 3.4 : Volumes de tampon, réactif, substrat et échantillon pour le dosage de l'activité GST

Tableau 3.5 : Volumes de tampon, substrat et échantillon à introduire dans les cuvettes pour le dosage de l'activité CAT

Tableau 3.6 : Volumes de tampon, réactif, substrat et échantillon à introduire dans les cuvettes pour le dosage de l'activité ChE

Tableau 3.7 : Réalisation de la gamme étalon de BSA en vue du dosage des protéines en cuvettes

Tableau 3.8 : Réalisation de la gamme étalon de BSA en vue du dosage des protéines en microplaques

Tableau 3.9 : Comptage des bactéries aérobies revivifiables à 30°C en 72 heures (en UFC par gramme de sol) – Mise en évidence d'un effet de l'entretien du sol des inter-rangs

Tableau 3.10 : Récapitulatif des interventions (traitements, labours et tontes) réalisées au niveau des inter-rangs en fonction des dates de prélèvement des lombrics

LISTE DES ABREVIATIONS

A	Absorbance
AchE	Acétylcholinestérase
ACTA	Association de Coordination Technique Agricole
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFNOR	Association Française de Normalisation
AFSSA	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
ALS	Acétolactate Synthase
AMPA	Acide aminométhylphosphonique
ANOVA	Analyse de Variance
AOC	Appellation d'Origine Contrôlée
ARN	Acide ribonucléique
AS	Activité Spécifique
ASE	Accelerated Solvent Extraction
AV	Activité Volumique
BSA	Sérum Albumine Bovine
BuChE	Butyrylthiocholinestérase
CAT	Catalase
CDNB	Chloro-2,4-dinitrobenzène
CEC	Capacité d'Echange de Cations
ChE	Cholinestérase
DAD	Barrette de diode
DEVT	Domaine Expérimental Viticole Tarnais
DCE	Directive Cadre Européenne sur l'eau
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité Optique
DTNB	Ion dithiobisnitrobenzoate
ECOD	Ethoxycoumarine O-diéthylase
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
ENM	Enherbement Naturel Maîtrisé

EROD	Ethoxyrésorufine O-déséthylase
ESI	Ionisation par électrospray
ETP	Evapotranspiration
ϵ	Coefficient d'extinction molaire
FMOC	9-fluorénylméthylchloroformate
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GPS	Global Positioning System
GS-DNB	1-glutathion-2,4-dinitrobenzène
GSH	Glutathion réduit
GST	Glutathion-S-Transférase
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
IFEN	Institut Français de l'Environnement
IFV	Institut Français de la Vigne et du Vin
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
ISO	International Organisation of Standardisation
ITAB	Institut Technique de l'Agriculture Biologique
KD	Knock Down
LC	Chromatographie en phase liquide
LF	Limon Fin
LLE	Extraction liquide-liquide
LG	Limon Grossier
LOD	Limite de Détection
LOQ	Limite de Quantification
M	Masse Molaire (g mol^{-1})
MAE	Extraction assistée par micro-ondes
MES	Matières en suspension
MO	Matière Organique
MS	Spectrométrie de masse
MWD	Mean Weight Diameter (diamètre moyen pondéré)
m/z	masse / charge
NF	Normes Françaises
NPD	Détecteur au nitrogène-phosphore

ORSTOM	Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (renommé IRD : Institut de Recherche pour le Développement)
PCA	Plate Count Agar : Milieu gélosé
PCB	Polychlorobiphényles
PET	Polyéthylène téréphtalate
PLE	Extraction Liquide Pressurisée
PPO	Protoporphyrène oxydase
PrChE	Propionylthiocholines térase
PROD	Pentoxyrésorufine O-dialkylase
R ²	Coefficient de régression linéaire
ROs	Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)
SD	Standard Deviation (erreur standard)
SF	Sable Fin
SFE	Extraction au fluide supercritique
SG	Sable Grossier
SN	Signal / Bruit
SOD	Super Oxyde Dismutase
SPE	Extraction en phase solide
TIC	Courant Ionique Total
TFAA	Anhydride trifluoroacétique
TFE	Trifluoroéthanol
Tm	Tampon mixte
TOF	Time of Flight (Temps de vol)
UAE	Extraction Assistée par Ultrasons
UFC	Unité Formant Colonie
UV	Ultra-Violets

LEXIQUE

Adventices : en agronomie, ce terme désigne une plante herbacée ou ligneuse indésirable à l'endroit où elle se trouve. Il est aussi utilisé comme synonyme de mauvaise herbe.

Battant : en agriculture, en pédologie et dans l'étude des paysages, la battance est le caractère d'un sol tendant à se désagréger et à former une croûte en surface sous l'action de la pluie.

Intrants : en agriculture, on appelle « intrants » les différents produits apportés aux terres et aux cultures, ce terme comprend les engrais, les amendements, les produits phytosanitaires et les activateurs ou retardateurs de croissance.

Plantier : jeune vigne

ABSTRACT

The aim of this study is to determine the influence of agricultural practices on pesticide transfer to drainage waters and on the soil ecosystem, in the Gaillac vineyard (France).

Agricultural practices change the drainage water volumes exported and the infiltration process of the rainy waters. The pesticide transfer is function of the physico-chemical characteristics of the molecules and their use, their application mode and the nature of the soil. Soil and drainage water pollution was observed for the chemical weeding practice. The grass covering in the inter-rows improves water infiltration, and takes part to the pesticide retention or biodegradation in the roots area. The chemical and the mechanical weeding (labor) disturb microbial and earthworms biodiversity whereas the grass covering improves organism proliferation (humidity, root exudates and organic matter).

Insecticide and fungicide neurotoxic effects that have been showed in laboratory conditions were not observed in the vineyard. In the same way, the earthworms collected in the field are not involved in the biotransformation process of the pesticides and are not physiologically damaged.

AUTEUR : Eva Schreck

TITRE : Influence des modes d'entretien du sol en milieu viticole sur le transfert des pesticides vers les eaux d'infiltration – Impact sur les lombriciens

DIRECTEUR DE THESE : Michel Treilhou

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Le 5 décembre 2008 à Albi

RESUME en français

L'objectif de cette thèse est d'essayer de déterminer la pratique viticole d'entretien du sol des inter-rangs qui serait la moins polluante pour l'environnement. Pour cela, une étude a été mise en place afin de mettre en évidence une influence de cette pratique sur le transfert de produits phytosanitaires vers les eaux de drainage et sur le fonctionnement biologique du sol. Les investigations ont montré que la pratique culturale modifie les flux d'eaux drainés et la réponse hydrologique du sol à la pluie. Le transfert d'une molécule dépend essentiellement de ses caractéristiques physico-chimiques et de son utilisation, son mode et sa date d'application, ainsi que le type de sol sur lequel elle est épanchée. Une pollution des sols et des eaux de drainage de la modalité désherbée chimiquement est constatée. L'enherbement favorise l'infiltration de l'eau, et pourrait participer à la rétention et la biodégradation des pesticides dans la zone racinaire. Le désherbage chimique et le labour perturbent la vie microbienne et lombricienne tandis que l'enherbement favorise le développement des organismes (humidité, exsudats racinaires, matière organique). L'effet neurotoxique des insecticides et des fongicides mis en évidence au laboratoire n'est pas vérifié sur le terrain viticole. De la même façon, contrairement aux résultats apportés par l'expérimentation en conditions contrôlées, les lombriciens de la parcelle ne participent pas à la biotransformation des toxiques et ne semblent pas perturbés physiologiquement.

MOTS-CLES

Viticulture, Pesticides, Transferts, Sols, Eaux de drainage, Entretien du sol, Lombriciens

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE

Ecotoxicologie

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

Chimie et Biochimie des Interactions