

Développement d'un outil innovant pour l'évaluation de l'impact des herbicides β -tricétones sur les communautés microbiennes du sol

Clémence Thiour Mauprivez

BAE-LBBM, Université de Perpignan Via Domitia

UMR Agroécologie, INRA Dijon

Mise au point de l'atrazine



1950



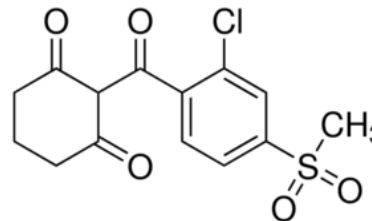
Interdiction de l'atrazine en France



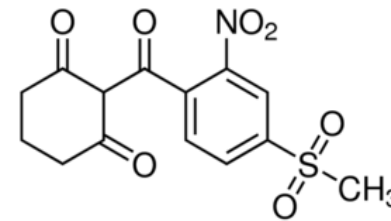
2003

Herbicides β -tricétones

Sulcotrione (1993)

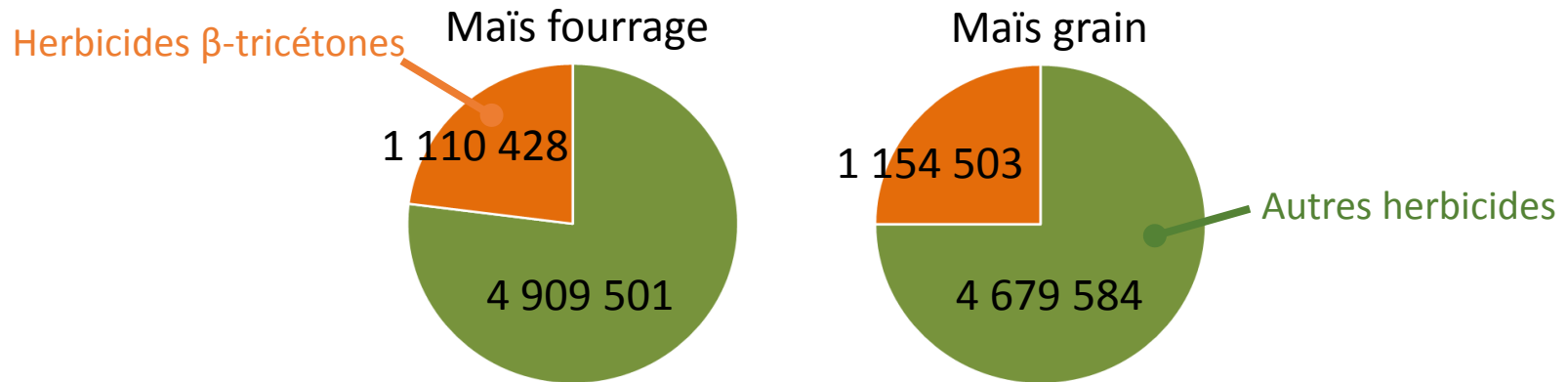


Mesotrione (2001)



Intérêt des herbicides β -tricétones :

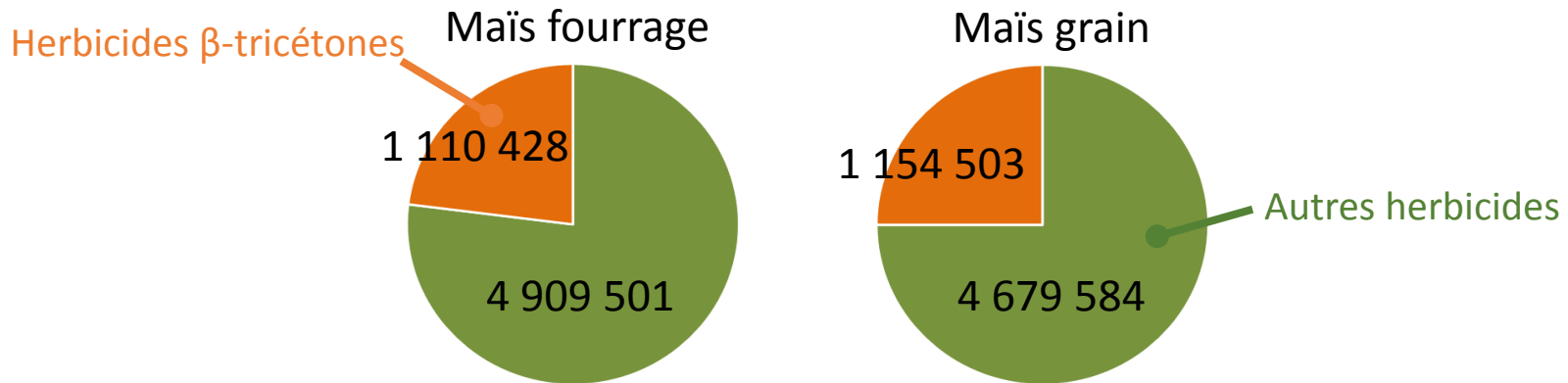
- ❖ Herbicides largement utilisés par les cultivateurs de maïs (*données de l'Agreste*)



Superficie ayant reçue au moins une fois l'herbicide en 2011 (ha)

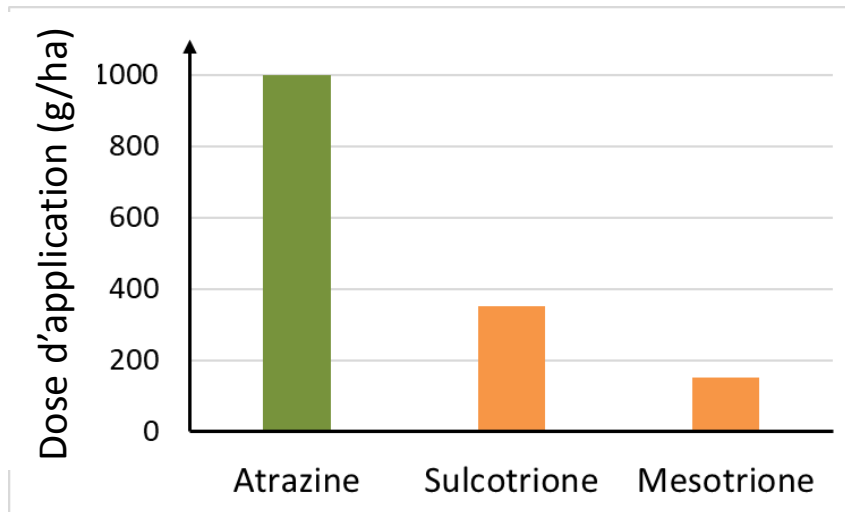
Intérêt des herbicides β -tricétones :

- ❖ Herbicides largement utilisés par les cultivateurs de maïs (*données de l'Agreste*)



Superficie ayant reçue au moins une fois l'herbicide en 2011 (ha)

- ❖ Qualifiés de « respectueux de l'environnement » en raison de leur efficacité à faible dose

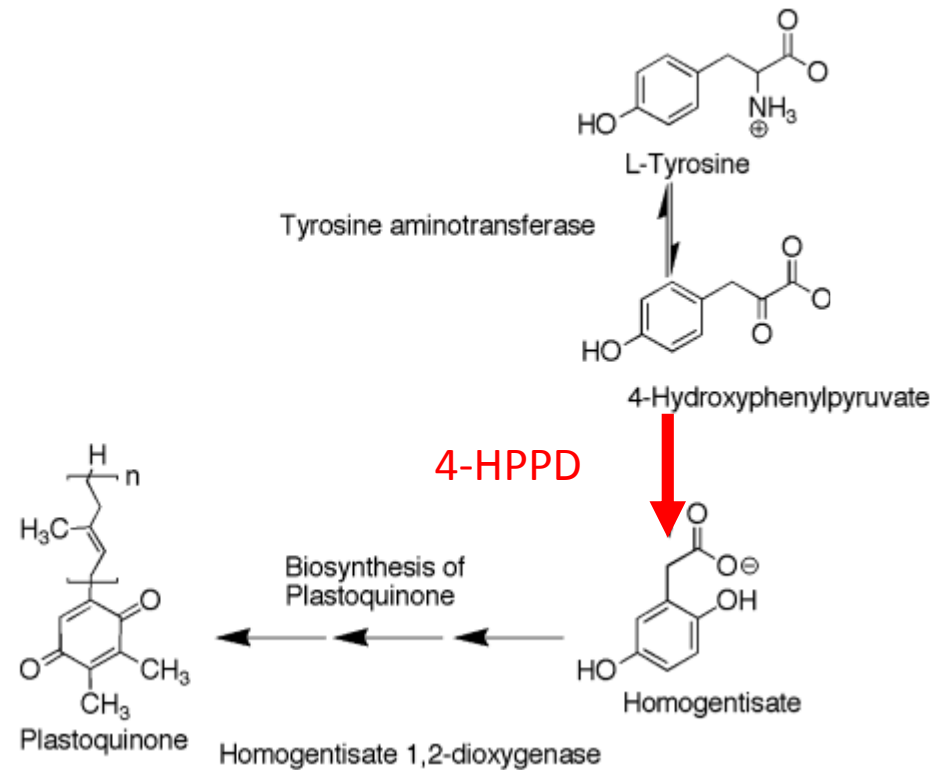


Doses d'application de différents herbicides (g/ha)

Près de 680 tonnes
d'herbicides β -tricétones
vendues en 2011 !

Mode d'action des herbicides β -tricétones :

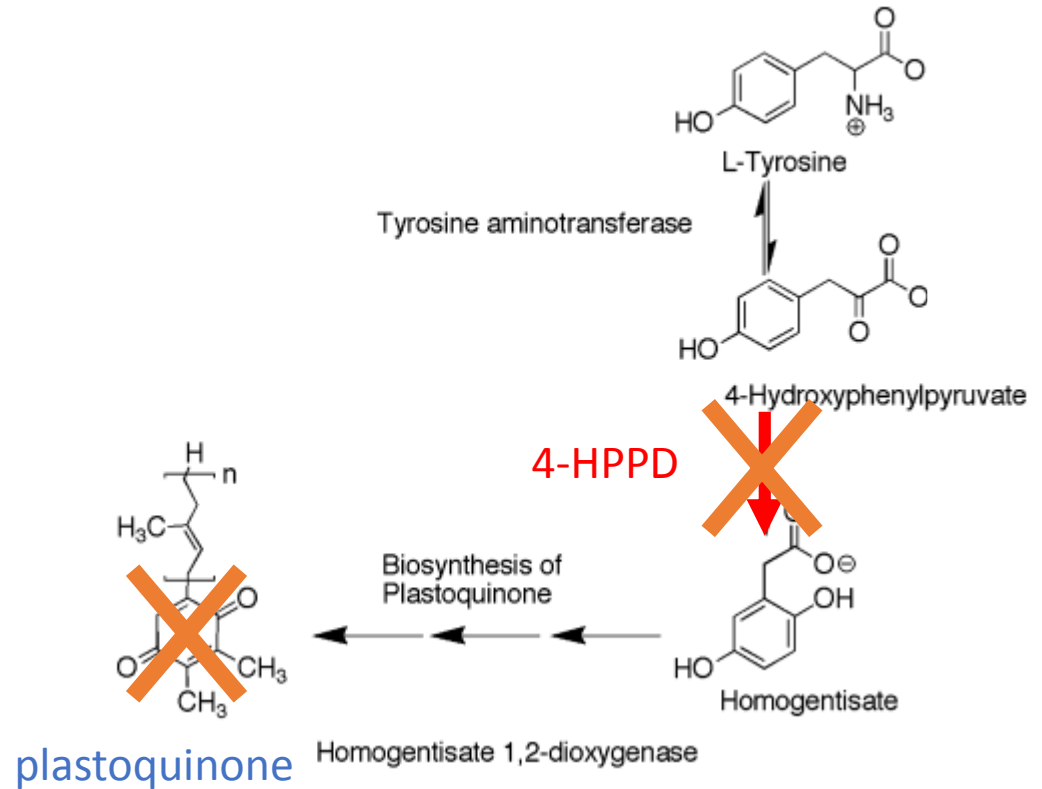
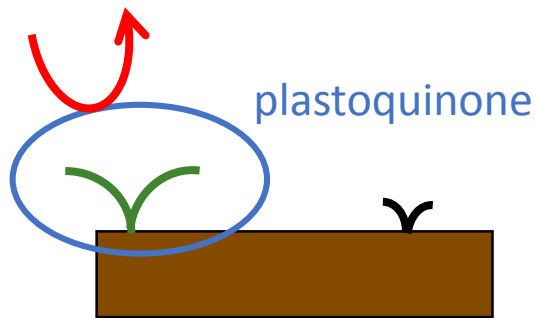
- ❖ Ciblent la 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (**4-HPPD**) chez de nombreuses dicotylédones



Mode d'action des herbicides β -tricétones :

- ❖ Ciblent la 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (**4-HPPD**) chez de nombreuses dicotylédones
- ❖ Conduit à l'**inhibition de la synthèse de plastoquinones** par les plantes

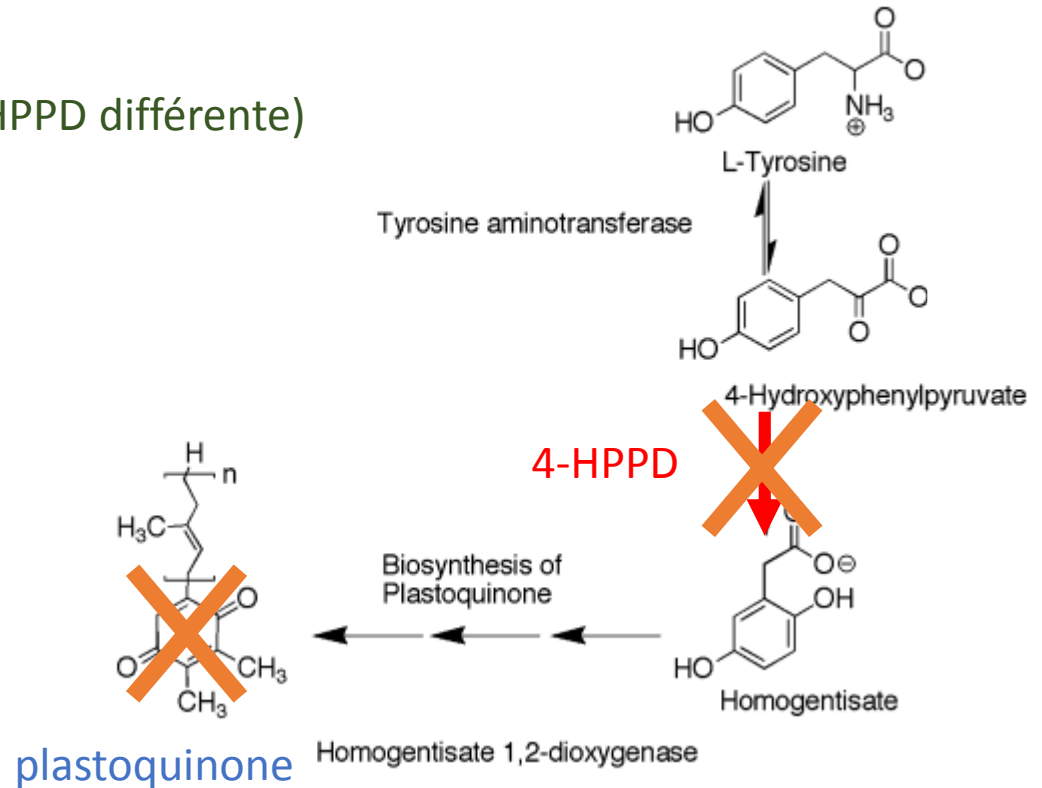
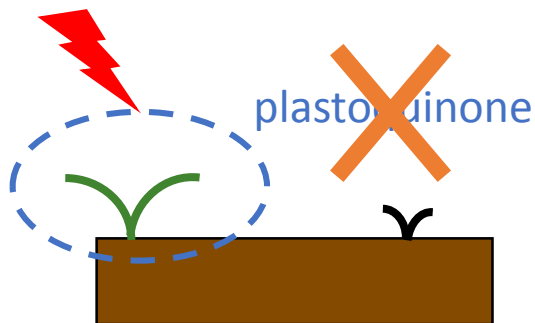
Radicaux libres, lumière



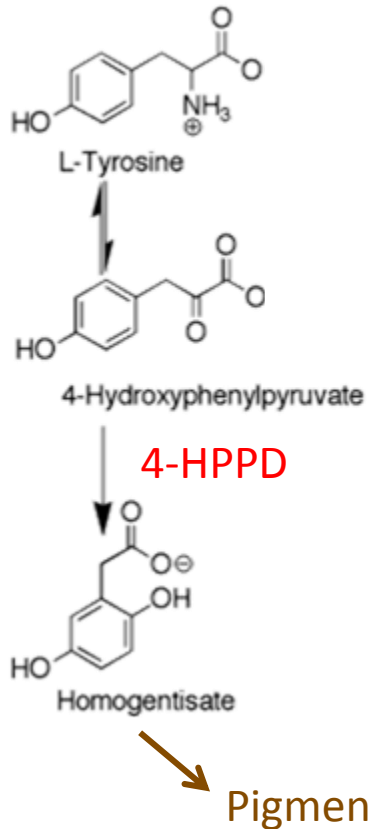
Mode d'action des herbicides β -tricétones :

- ❖ Ciblent la 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (**4-HPPD**) chez de nombreuses dicotylédones
- ❖ Conduit à l'**inhibition de la synthèse de plastoquinones** par les plantes
- ❖ Les dicotylédones indésirables blanchissent, se nécrosent et meurent
- ❖ Le maïs est résistant (conformation HPPD différente)

Radicaux libres, lumière

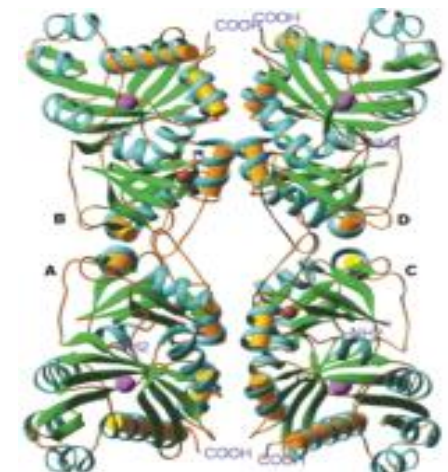


Etat des connaissances :



- ❖ Intervient dans les premières étapes du métabolisme de la tyrosine. Production d'un pigment brun caractéristique.
- ❖ 4-HPPD présente aussi chez les bactéries : +1300 séquences protéiques décrites chez 900 espèces différentes
- ❖ Chez les bactéries pathogènes de l'homme, 4-HPPD les protège des radicaux libres (NO) produits par l'hôte → rôle dans la survie

- ❖ Structure cristallisée chez *Pseudomonas fluorescens* (Serre *et al.*, 1999)

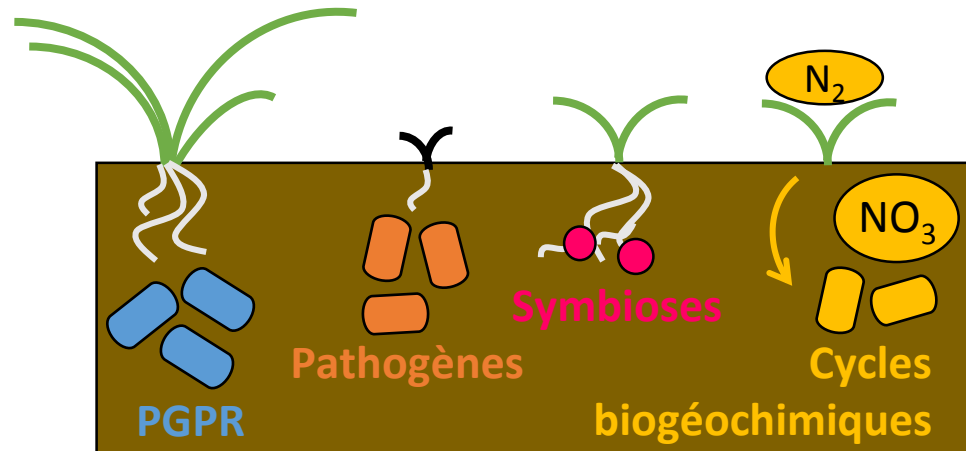


D'un point de vue écotoxicologique :

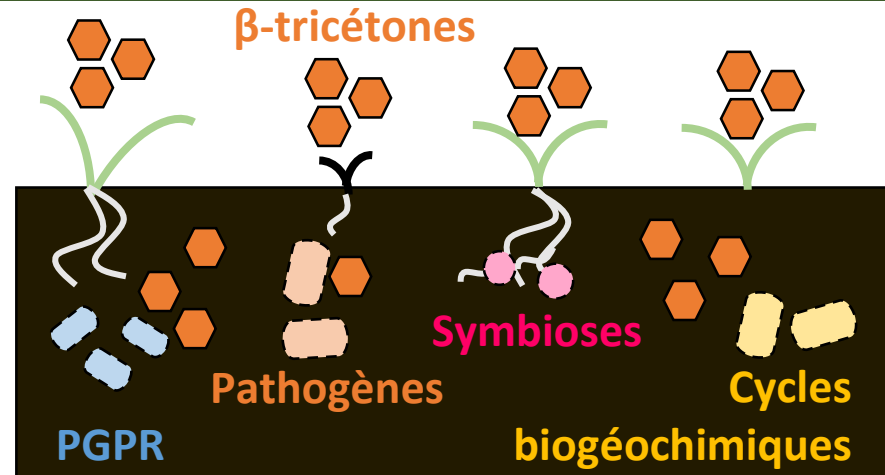
Les herbicides β -tricétones ont-ils un impact sur les bactéries du sol exprimant l'enzyme 4-HPPD ?

- ❖ Certaines souches bactériennes sont capables de dégrader les β -tricétones
(Calvayrac *et al.*, 2012 ; Romdhane *et al.*, 2016)
- ❖ La leptospermone (un β -tricétone d'origine naturelle, Myrtacées, genre *Callistemon*) modifie significativement et transitoirement la diversité des communautés microbiennes des sols
(pyroséquençage 16S, Romdhane *et al.*, 2016)
- ❖ Chez les cyanobactéries : la mesotrione et son formulant le Callisto® inhibent transitoirement la nitrification
(Crouzet *et al.*, 2016)

Les herbicides β -tricétones sont-ils à l'origine d'une modification des grandes fonctions écosystémiques des sols par leurs effets sur les communautés microbiennes ?



Les herbicides β -tricétones sont-ils à l'origine d'une modification des grandes fonctions écosystémiques des sols par leurs effets sur les communautés microbiennes ?



→ Evaluer l'abondance et la diversité des communautés bactériennes possédant l'enzyme 4-HPPD dans les sols exposés aux β -tricétones

→ Utiliser le gène *hppd* des communautés bactériennes comme marqueur fonctionnel d'exposition des sols aux β -tricétones

Impact écotoxicologique à 2 niveaux de toxicité

Test *in vitro*

Compréhension de l'effet des β -tricétones sur le métabolisme microbien

Tests de croissance et d'activité des bactéries en présence de doses croissantes d'herbicides
(Bioscreen et respirométrie)

Impact écotoxicologique à 2 niveaux de toxicité

Test *in vitro*

Compréhension de l'effet des β -tricétones sur le métabolisme microbien

Tests de croissance et d'activité des bactéries en présence de doses croissantes d'herbicide (Bioscreen et respirométrie)



Niveau I : Etudes en microcosmes

Détermination du scénario d'exposition : extraction de l'herbicide à chaque temps et calcul de sa cinétique de dissipation

Impact écotoxicologique : extractions ADN/ARN du sol et détermination de l'abondance (qPCR), de l'activité (RT-qPCR) et de la diversité (séquençage) des communautés bactériennes exposées

Impact écotoxicologique à 2 niveaux de toxicité

Test *in vitro*

Compréhension de l'effet des β -tricétones sur le métabolisme microbien

Tests de croissance et d'activité des bactéries en présence de doses croissantes d'herbicide (Bioscreen et respirométrie)



Niveau I : Etudes en microcosmes



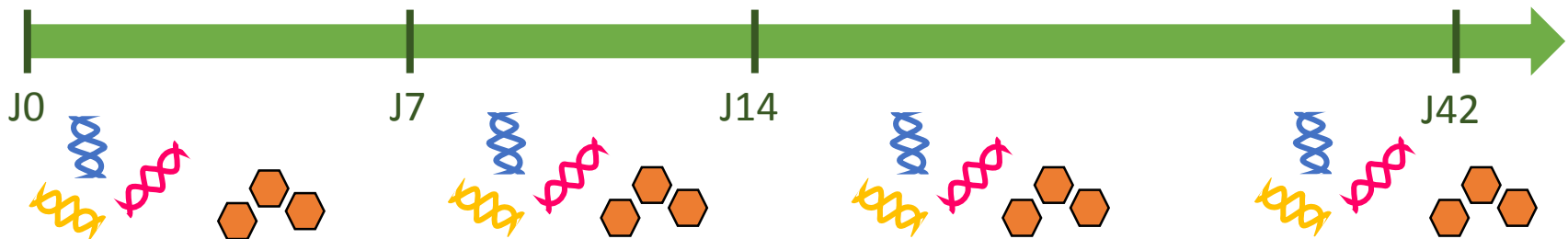
Témoin



Sulcotrione DA



Sulcotrione DA10



Impact écotoxicologique à 2 niveaux de toxicité

Test *in vitro*

Compréhension de l'effet des β -tricétones sur le métabolisme microbien

Tests de croissance et d'activité des bactéries en présence de doses croissantes d'herbicide (Bioscreen et respirométrie)



Niveau I : Etudes en microcosmes



Témoin



Sulcotrione DA



Sulcotrione DA10



Niveau II : Etudes au champ

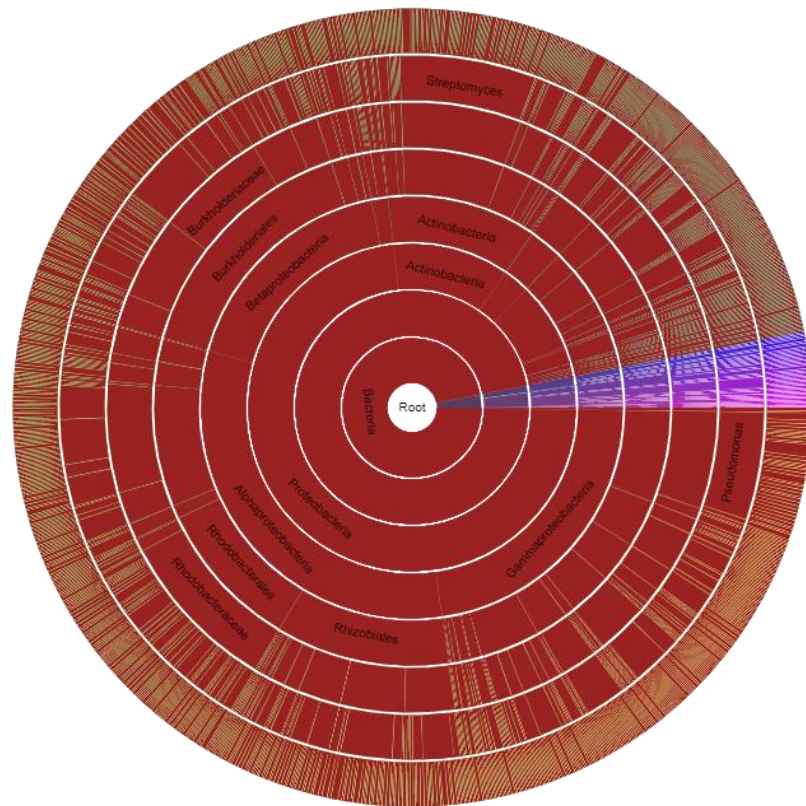
Application des outils moléculaires au champ : utilisation de parcelles traitées avec des herbicides β -tricétones.

Etudes in silico :

- ❖ Dessin d'amorces visant à amplifier les gènes *hppd* chez les bactéries du sol

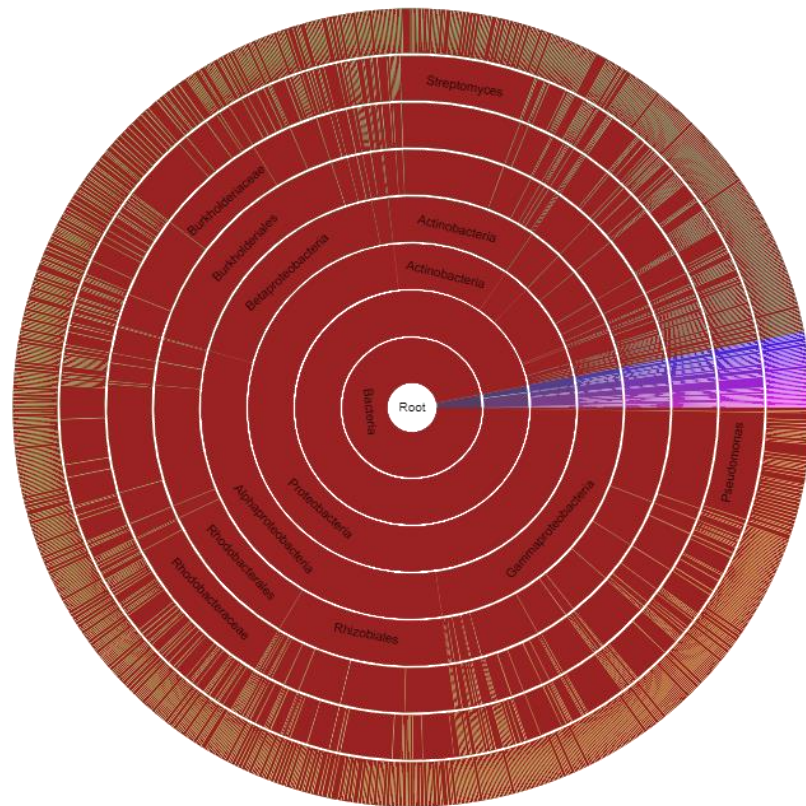
1313 séquences protéiques

Nettoyage des séquences protéiques répertoriées sur Pfam database (<http://pfam.xfam.org>)



Etudes in silico :

- ❖ Dessin d'amorces visant à amplifier les gènes *hppd* chez les bactéries du sol



1313 séquences protéiques

Nettoyage des séquences protéiques répertoriées sur Pfam database (<http://pfam.xfam.org>)



1230 séquences nucléotidiques

Recherche des séquences nucléotidiques correspondantes sur GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

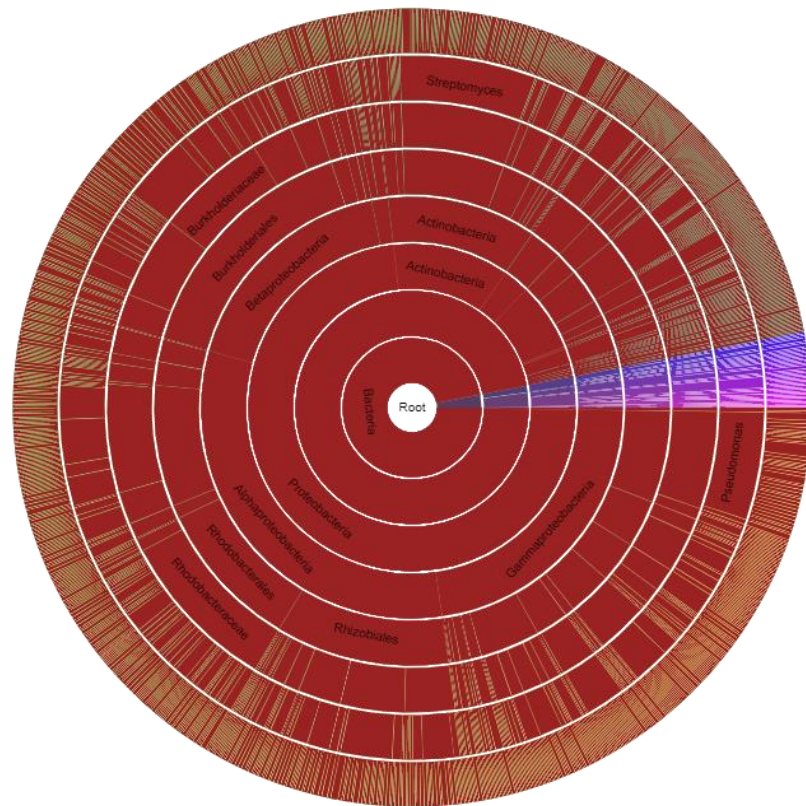


450 à 600 séquences nucléotidiques

Dessin d'amorces spécifiques à ces séquences via DeGePrime (Hugerth *et al.*, 2014) et j-CODEHOP (Boyce *et al.*, 2009)

Etudes in silico :

- ❖ Dessin d'amorces visant à amplifier les gènes *hppd* chez les bactéries du sol



1313 séquences protéiques

Nettoyage des séquences protéiques répertoriées sur Pfam database (<http://pfam.xfam.org>)



1230 séquences nucléotidiques

Recherche des séquences nucléotidiques correspondantes sur GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)



450 à 600 séquences nucléotidiques

Dessin d'amorces spécifiques à ces séquences via DeGePrime (Hugerth *et al.*, 2014) et j-CODEHOP (Boyce *et al.*, 2009)

Etape suivante : Dessiner un autre couple ciblant les 600 autres séquences afin d'accéder à l'intégralité des 4-HPPD bactériennes retrouvées dans les sols

Validation des couples d'amorces à partir de souches pures

Gène *hppd* *Variovorax paradoxus* EPS



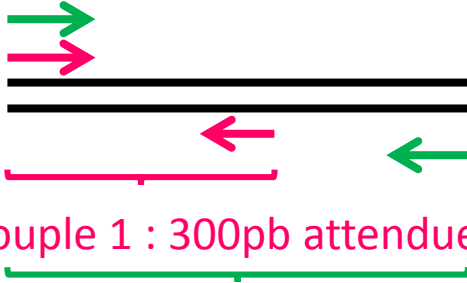
Couple 1 : 300pb attendues

Couple 2 : 500pb attendues



Validation des couples d'amorces à partir de souches pures

Gène *hppd* *Variovorax paradoxus* EPS



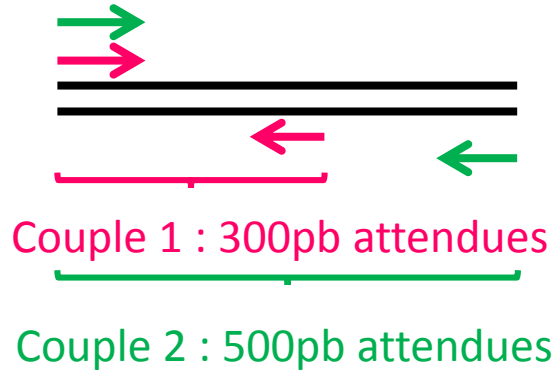
Couple 1 : 300pb attendues

Couple 2 : 500pb attendues



Validation des couples d'amorces à partir de souches pures

Gène *hppd* *Variovorax paradoxus* EPS



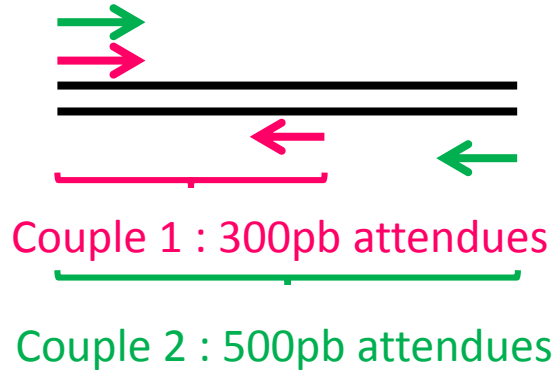
Premiers résultats de séquençage Sanger

Couple 1 : à partir d'ADN extraits des microcosmes de sol de Perpignan

Clone	Souche bactérienne à laquelle appartient la 4-HPPD	Pourcentage d'identité
1	<i>Chitinophagaceae bacterium</i> IBVUCB1	89%
2	<i>Sphingomonas</i> sp. URHD0057	86%
3	<i>Lysobacter</i> sp. Root494	95%
4	Gammaaproteobacterium	82%
5	<i>Sphingomonas</i> sp. URHD0057	86%
6	<i>Sphingomonas</i> sp. URHD0057	92%
7	<i>Lysobacter</i> sp. Root494	92%

Validation des couples d'amorces à partir de souches pures

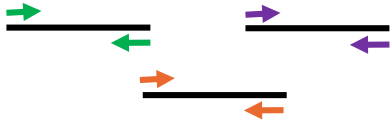
Gène *hppd* *Variovorax paradoxus* EPS



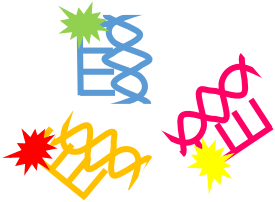
Premiers résultats de séquençage Sanger

Couple 2 : à partir d'ADN extraits des microcosmes de sol de Perpignan

Clone	Souche bactérienne à laquelle appartient la 4-HPPD	Pourcentage d'identité
1	Gammaproteobacterium	91%
2	<i>Methylocadum</i>	75%
3	<i>Sphingomonas japsi</i>	92%
4	<i>Mastigocladus laminosus</i>	90%
5	<i>Sphingomonas japsi</i>	95%
6	Betaproteobacterium	84%
7	<i>Sphingomonas</i> sp. URHD0057	85%
8	<i>Shewanella stibiresistens</i>	85%



→ Design d'amorces groupe-spécifiques



→ Validation des outils moléculaires



→ Microcosmes de sol avec les formulations commerciales de la sulcotrione et de la mesotrione



→ Tests des outils en champs



Merci de votre attention