

# Développement d'un outil innovant pour l'évaluation de l'impact des herbicides $\beta$ -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



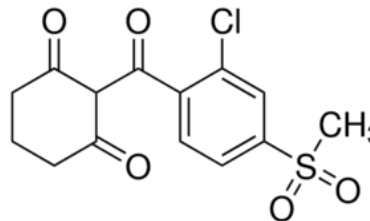
### Interdiction de l'atrazine en France



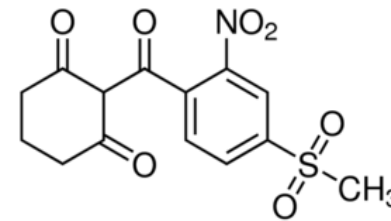
2003

### Herbicides $\beta$ -tricétones

Sulcotrione (1993)

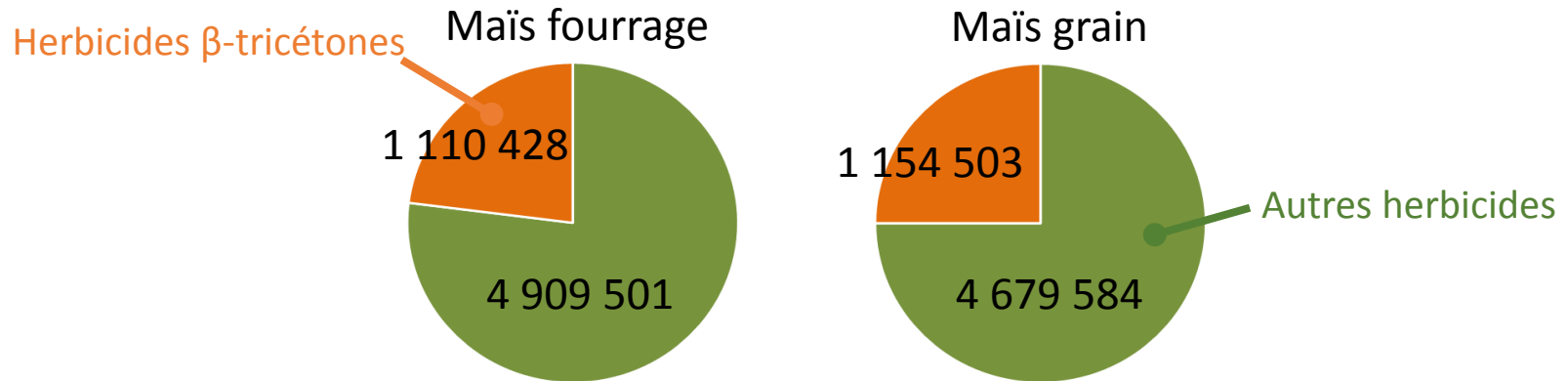


Mesotrione (2001)



## Intérêt des herbicides $\beta$ -tricétones :

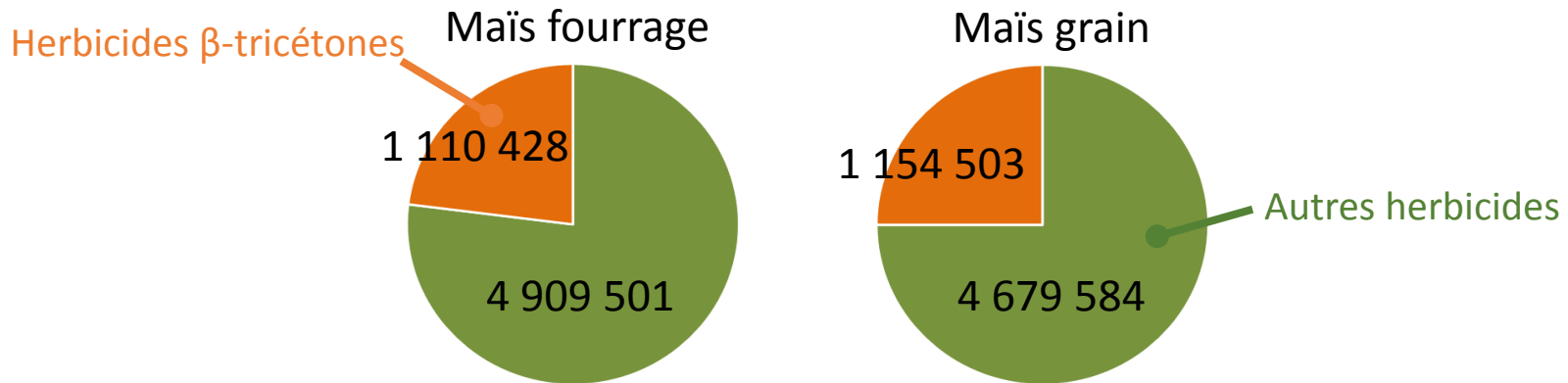
- ❖ Herbicides largement utilisés par les cultivateurs de maïs (*données de l'Agreste*)



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

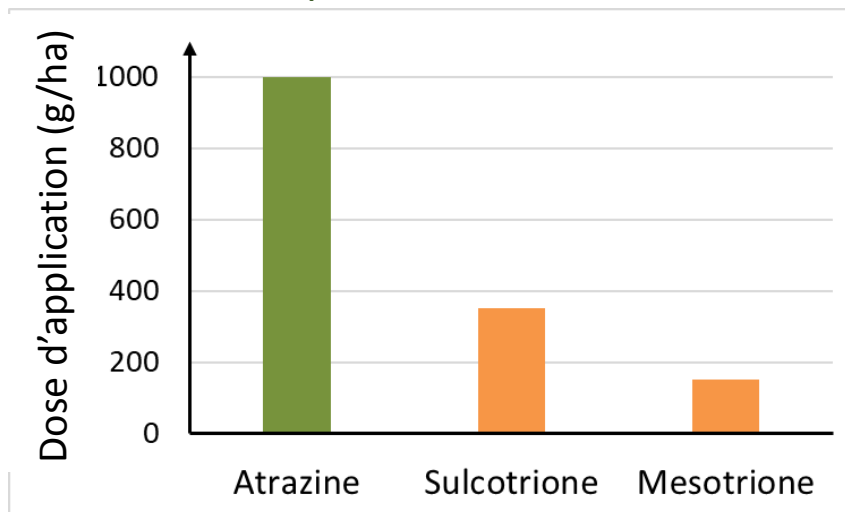
## Intérêt des herbicides $\beta$ -tricétones :

- ❖ 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

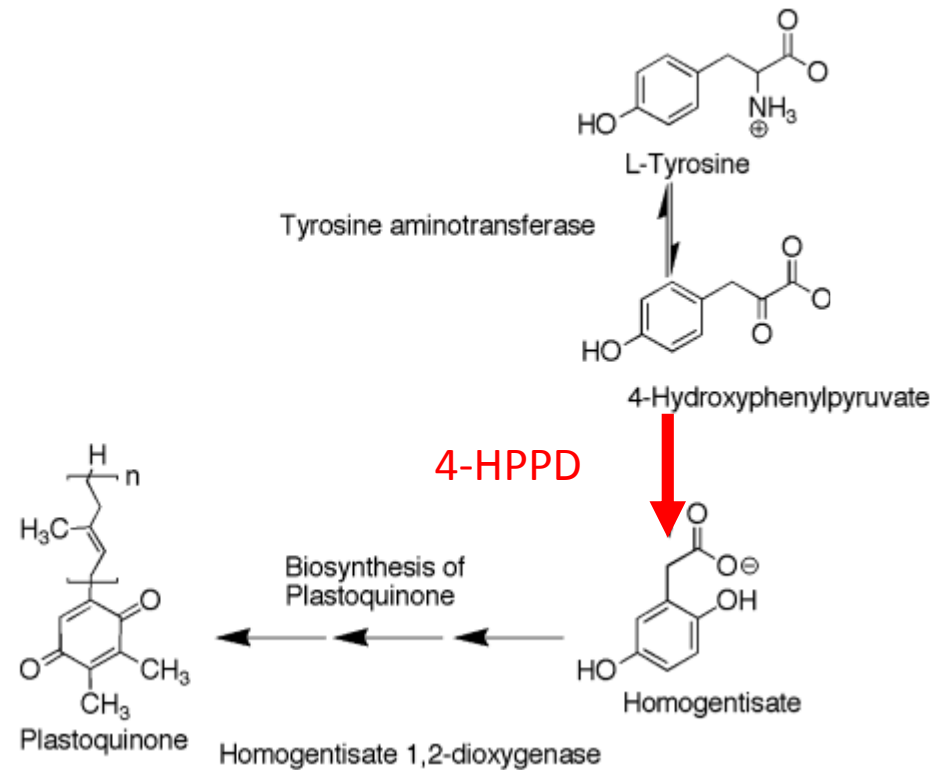


Doses d'application de différents herbicides (g/ha)

Près de 680 tonnes  
d'herbicides  $\beta$ -tricétones  
vendues en 2011 !

## Mode d'action des herbicides $\beta$ -tricétones :

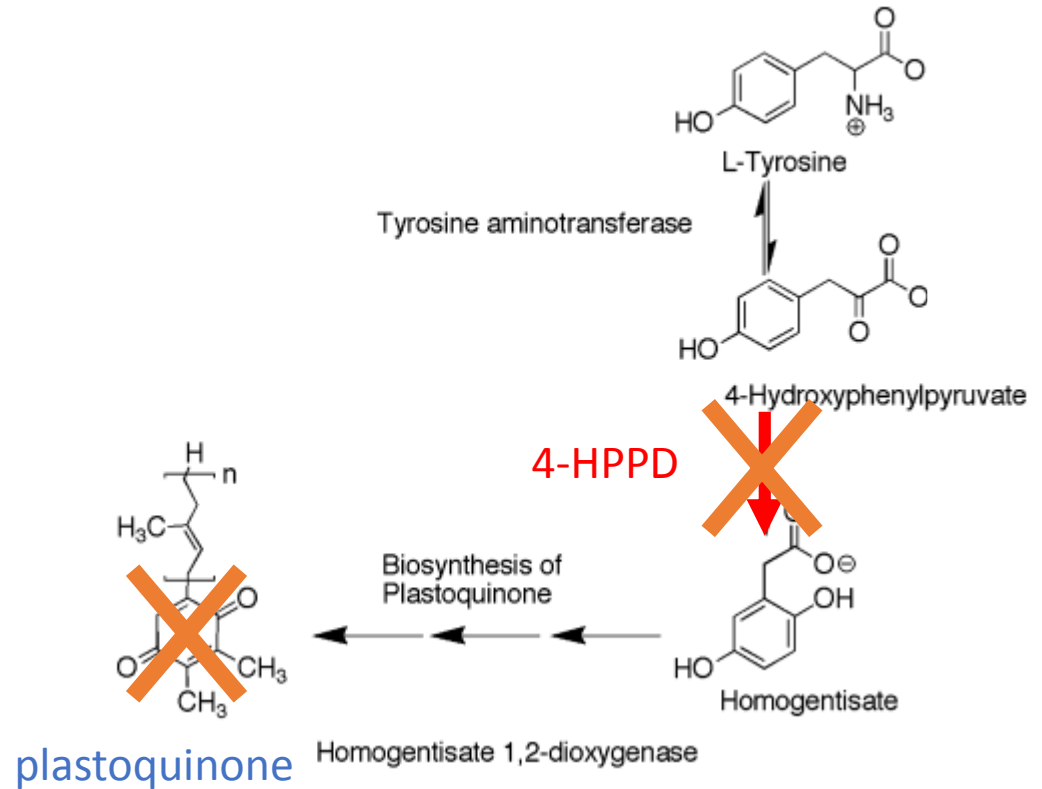
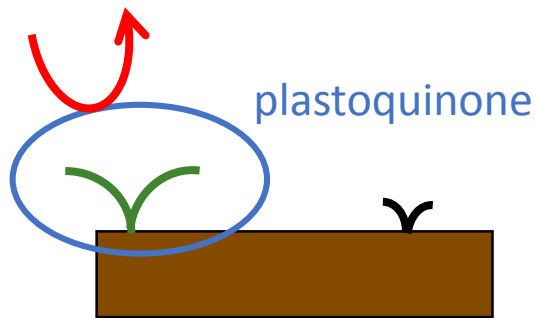
- ❖ Ciblent la 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (**4-HPPD**) chez de nombreuses dicotylédones



Mode d'action des herbicides  $\beta$ -tricétones :

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

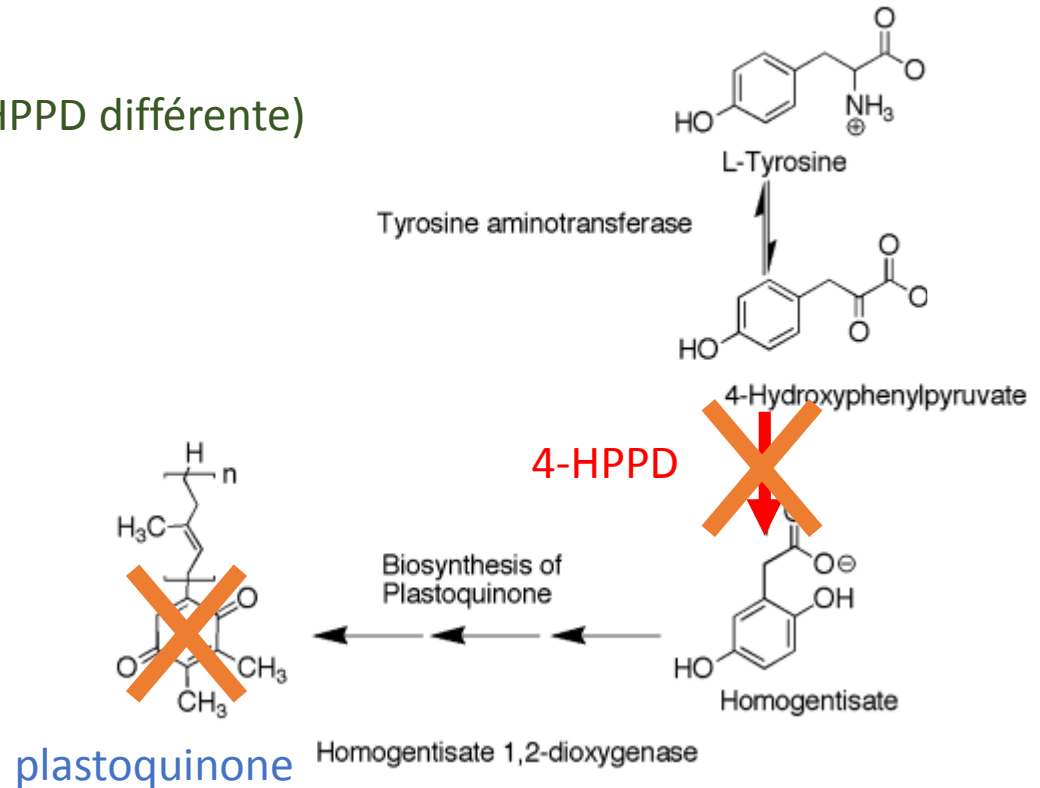
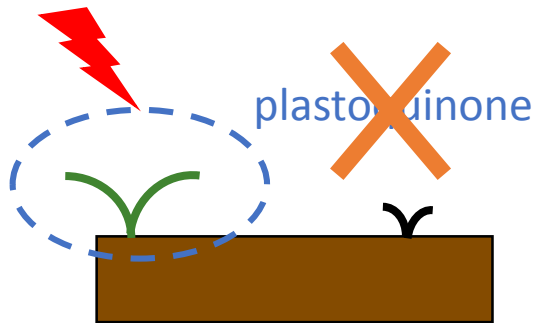
Radicaux libres, lumière



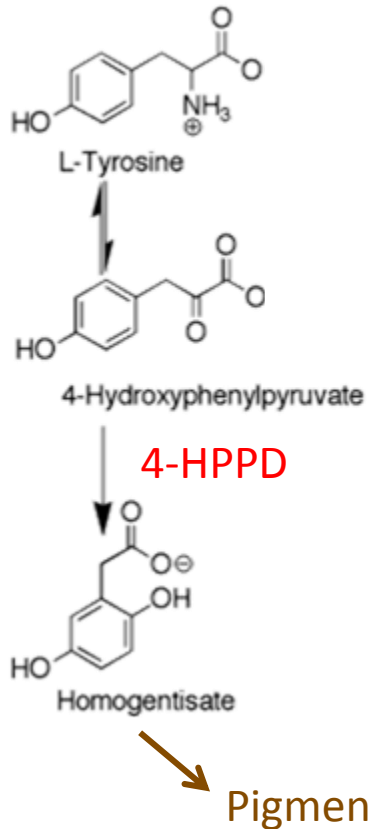
## Mode d'action des herbicides $\beta$ -tricétones :

- ❖ 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**

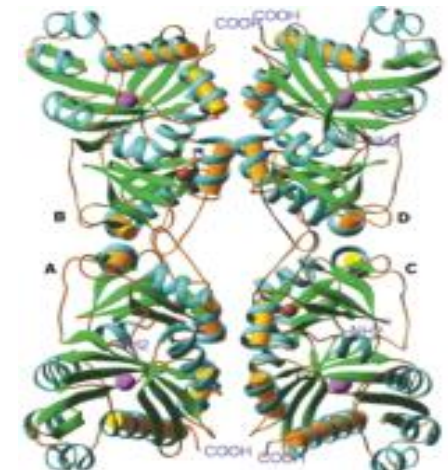


## Etat des connaissances :



- ❖ 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)



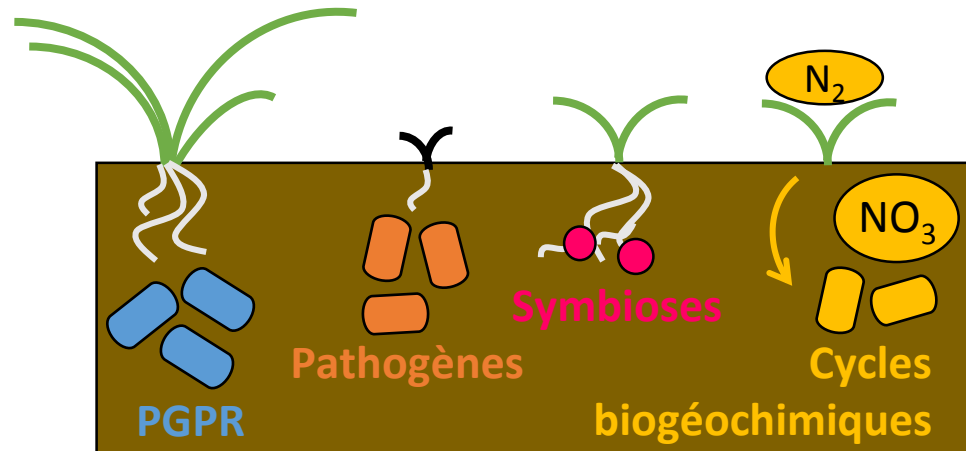


## D'un point de vue écotoxicologique :

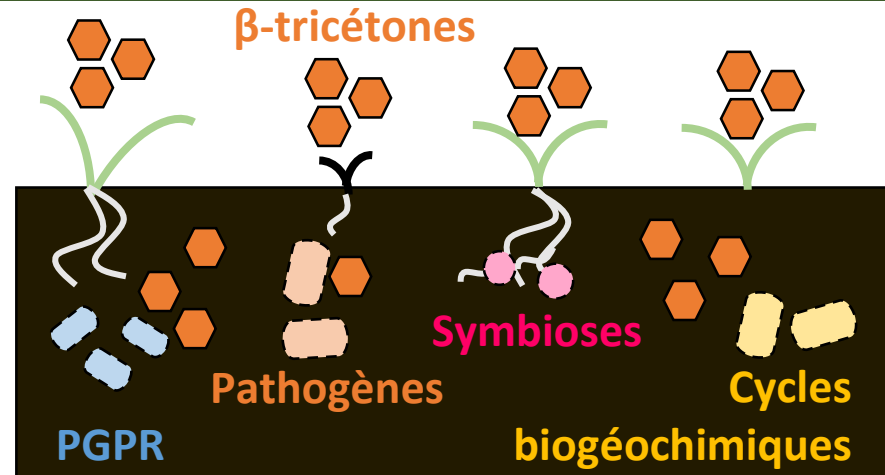
Les herbicides  $\beta$ -tricétones ont-ils un impact sur les bactéries du sol exprimant l'enzyme 4-HPPD ?

- ❖ Certaines souches bactériennes sont capables de dégrader les  $\beta$ -tricétones  
(Calvayrac *et al.*, 2012 ; Romdhane *et al.*, 2016)
- ❖ La leptospermone (un  $\beta$ -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<sup>®</sup> inhibent transitoirement la nitrification  
(Crouzet *et al.*, 2016)

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



Les herbicides  $\beta$ -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  $\beta$ -tricétones

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

## Impact écotoxicologique à 2 niveaux de toxicité

Test *in vitro*

### **Compréhension de l'effet des $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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



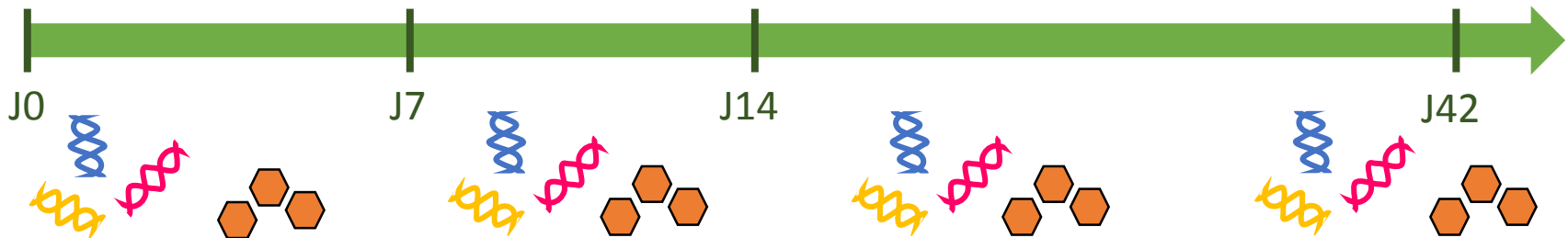
Témoin



Sulcotrione DA



Sulcotrione DA10



## Impact écotoxicologique à 2 niveaux de toxicité

Test *in vitro*

### Compréhension de l'effet des $\beta$ -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

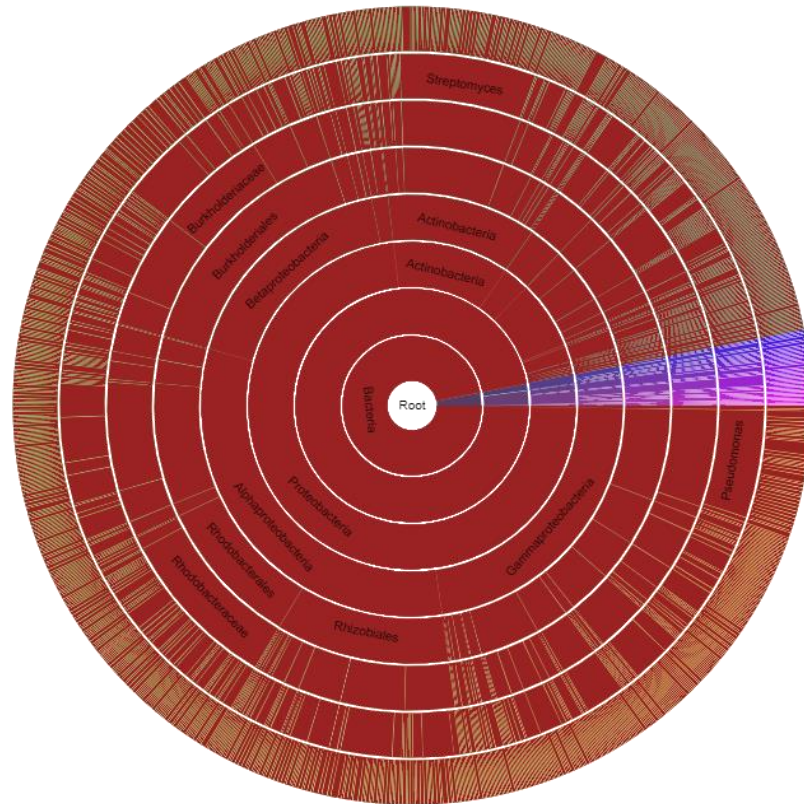
**Application des outils moléculaires au champ** : utilisation de parcelles traitées avec des herbicides  $\beta$ -tricétones.

## Etudes in silico :

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

1313 séquences protéiques

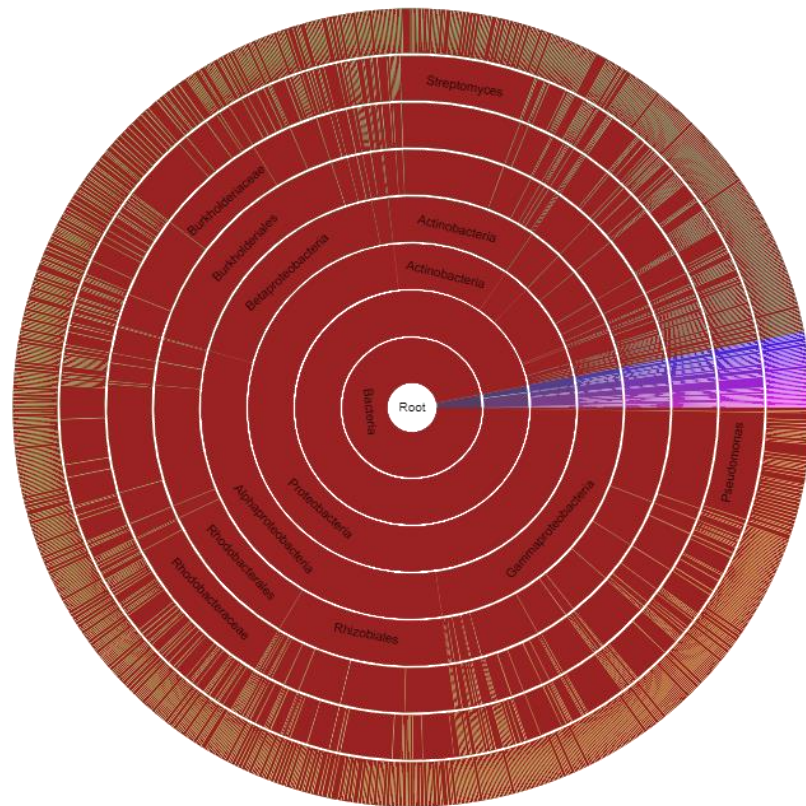
Nettoyage des séquences protéiques répertoriées sur Pfam database (<http://pfam.xfam.org>)





## 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/>)

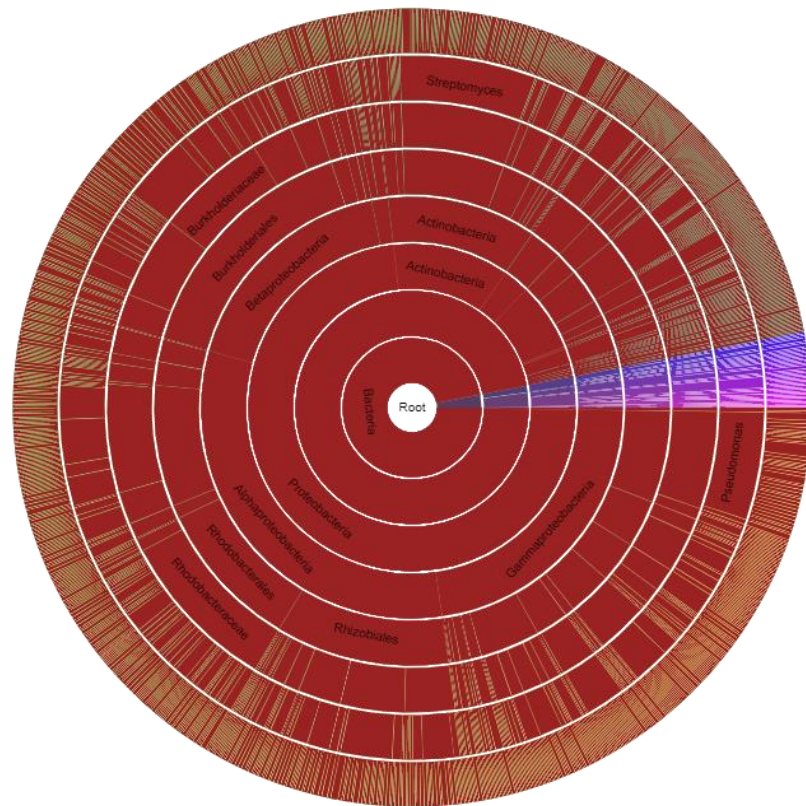


450 à 600 séquences nucléotidiques

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



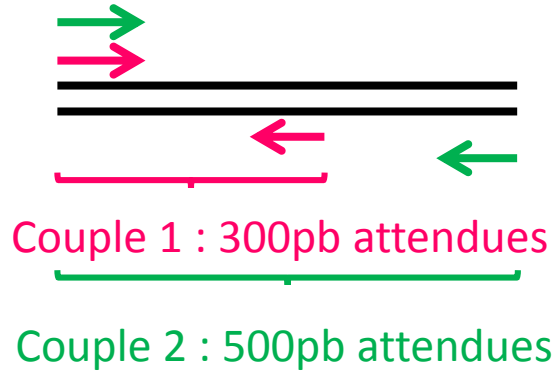
Couple 1 : 300pb attendues

Couple 2 : 500pb attendues



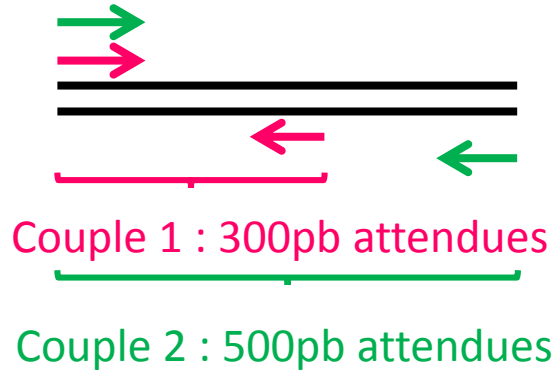
## Validation des couples d'amorces à partir de souches pures

Gène *hppd* *Variovorax paradoxus* EPS



## Validation des couples d'amorces à partir de souches pures

Gène *hppd* *Variovorax paradoxus* EPS



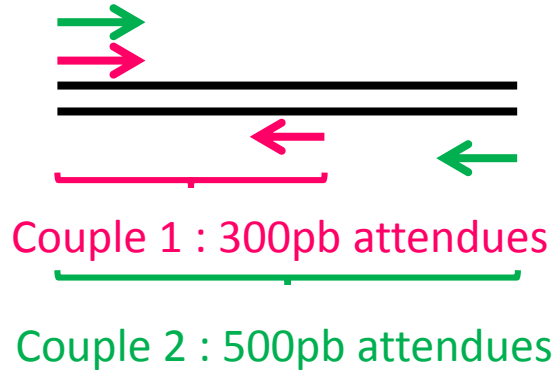
## Premiers résultats de séquençage Sanger

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	Gamma proteobacterium	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

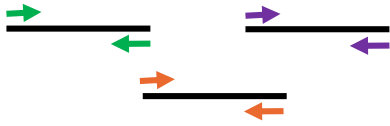
Gène *hppd* *Variovorax paradoxus* EPS



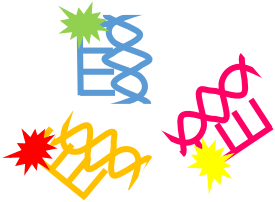
## Premiers résultats de séquençage Sanger

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