



HAL
open science

Impacts de produits de dégradation de la sulcotrione sur la croissance racinaire

Sandra Maruel

► **To cite this version:**

Sandra Maruel. Impacts de produits de dégradation de la sulcotrione sur la croissance racinaire. 2014, 15 p. + annexes. hal-01268718

HAL Id: hal-01268718

<https://hal.science/hal-01268718>

Submitted on 5 Jun 2020

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.

*Master 1 Biologie et Environnement
Génomique, Ecophysiologie et Productions végétales*

**IMPACTS DE PRODUITS DE
DEGRADATION DE LA
SULCOTRIONE SUR LA
CROISSANCE RACINAIRE**

RAPPORT DE STAGE PRESENTE PAR :
Sandra MARUEL

Soutenu le mercredi 3 septembre 2014

MEMBRES DU JURY

Nathalie FOURNIER
Philippe MALAGOLI
Saïd MOUZEYAR

UMR 547-UBP/INRA

Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et Forestier

Université Blaise Pascal, Campus universitaire des Cézeaux,

24, avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France

Responsable du stage : Eric GOUJON

RESUME

Utilisés dans la protection des cultures, les produits phytosanitaires permettent une amélioration des rendements et de la qualité de la production. Cependant, l'usage intensif de ces produits a des conséquences négatives sur l'environnement et la santé humaine. De plus, en milieu naturel, les principes actifs perdent leur fonction première en se dégradant en des molécules dont les effets sont inconnus. Dans une optique de protection de l'environnement, l'étude de la toxicité de ces nouvelles molécules indésirables est donc devenue indispensable.

La sulcotrione, un herbicide de la famille des tricétones, est dégradable, notamment par la lumière. Cette dégradation conduit à la formation de produits dont la toxicité est étudiée. Nos travaux ont permis d'analyser l'impact de certains de ces produits de dégradation sur la croissance racinaire de différents modèles végétaux. Les résultats ont montré une croissance racinaire augmentée, dépendante de la concentration des traitements ainsi que de l'espèce végétale testée, mais les modes d'action de ces produits de dégradation restent encore à déterminer.

Ces résultats montrent qu'une molécule utilisée à l'origine comme herbicide peut évoluer au cours de sa dégradation et aboutir à la formation d'un composé ayant des propriétés surprenantes.

Mots-clé : croissance racinaire, produits de dégradation, produits phytosanitaires, sulcotrione, toxicité.

ABSTRACT

Pesticides are used to protect cultivated lands. They improve crop yields and production quality. Nevertheless, pesticides could have negative consequences and should be considered in environmental risk assessments and human health. In natural environment, these molecules could be degraded and formed compounds whose effects are unknown. The evaluation of these degradation products became essential.

Sulcotrione is a triketone herbicide and is quickly degraded by solar light. The toxicity of its degradation products is studied. The aim of this work was to analyze the impact of these degradation products on root growth of different plant models. Results have shown an improvement of root growth, which depends on concentration treatment and on the studied specie. The action mode of these products remains to be determined.

This results show that a molecule used as an herbicide can evolve and can be degraded in a compound which could have surprising properties.

Key-words : degradation products, pesticides, root growth, sulcotrione, toxicity.

LISTE DES ABREVIATIONS

CHD :1,3-Clyclo**H**ane**D**ione

CMBA :2-Chloro-4-Mesyl**B**enzoic **A**cid

EMS :Ethyl**M**éthane Sulfonate

HPLC : **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography

HPPD :**H**ydroxy**P**hényl**P**yruvate **D**ioxygénase

HSD :**H**onestly **S**ignificant **D**ifference

J_x : x jours après traitement

Pta : *Populus Tremula Alba*

T_{xh} : x heures après traitement

Xanthène292: Xanthene-1,9-dione-3,4-dihydro-6-methylsulfonyl

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	2
MATERIELS ET METHODES	4
Matériel végétal.....	4
Méthodes.....	5
Traitement chimique.....	5
Prélèvements	6
Analyse d'images / Statistiques.....	7
RESULTATS.....	8
Analyse des traitements	8
<i>Allium cepa</i>	8
Traitements solution A et solution B.....	8
Traitements solution X, solution A, solution B.....	8
<i>Gladiolus grandiflorus</i>	9
<i>Zea mays</i>	9
<i>Arabidopsis thaliana</i>	10
<i>Nicotiana tabacum</i>	10
<i>Populus tremula x alba</i>	10
DISCUSSION.....	11
CONCLUSIONS – PERSPECTIVES	14
REFLEXION PERSONNELLE	15

INTRODUCTION

Les produits phytosanitaires sont aujourd'hui largement utilisés en agriculture. Ils protègent les cultures en ralentissant ou en arrêtant le développement d'organismes indésirables. Ils ont un impact positif sur le rendement des cultures mais aussi sur la qualité de la production.

Chaque année, en France, 70 000 tonnes de produits phytosanitaires sont utilisées. Ces derniers ont certes un impact positif sur la production agricole, mais ils peuvent avoir des conséquences négatives sur l'environnement et la santé humaine. De plus, les principes actifs contenus dans ces produits phytosanitaires peuvent se dégrader en milieu naturel, produisant de nouvelles molécules dont les effets sont encore méconnus.

Le plan Ecophyto 2018 issu du Grenelle de l'environnement vise à réduire l'utilisation massive de ces produits phytosanitaires. C'est dans cette optique que le laboratoire de Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et Forestier (UMR 547 PIAF) développe un projet de recherche sur l'étude de la toxicité de pesticides ayant subi une dégradation. Cette dégradation, provoquée par la lumière (photodégradation), est réalisée et étudiée en collaboration avec le laboratoire de Photochimie (UMR 6505 CNRS) de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF). Il s'agit d'un travail interdisciplinaire mêlant la photochimie et la physiologie moléculaire des plantes. Le principe actif actuellement étudié par ces laboratoires est la sulcotrione, un herbicide de la famille des tricétones, commercialisé par Bayer et utilisé dans la culture du maïs.

Des méthodes ont été mises en place afin d'étudier la toxicité des produits de photodégradation de la sulcotrione au niveau génétique. Ainsi, *Allium cepa* constitue un bon modèle d'étude au niveau chromosomique car il permet d'identifier les anomalies se déroulant pendant la mitose.

Mon projet a été d'étudier l'impact de certains produits de dégradation de la sulcotrione sur la croissance racinaire de diverses espèces.

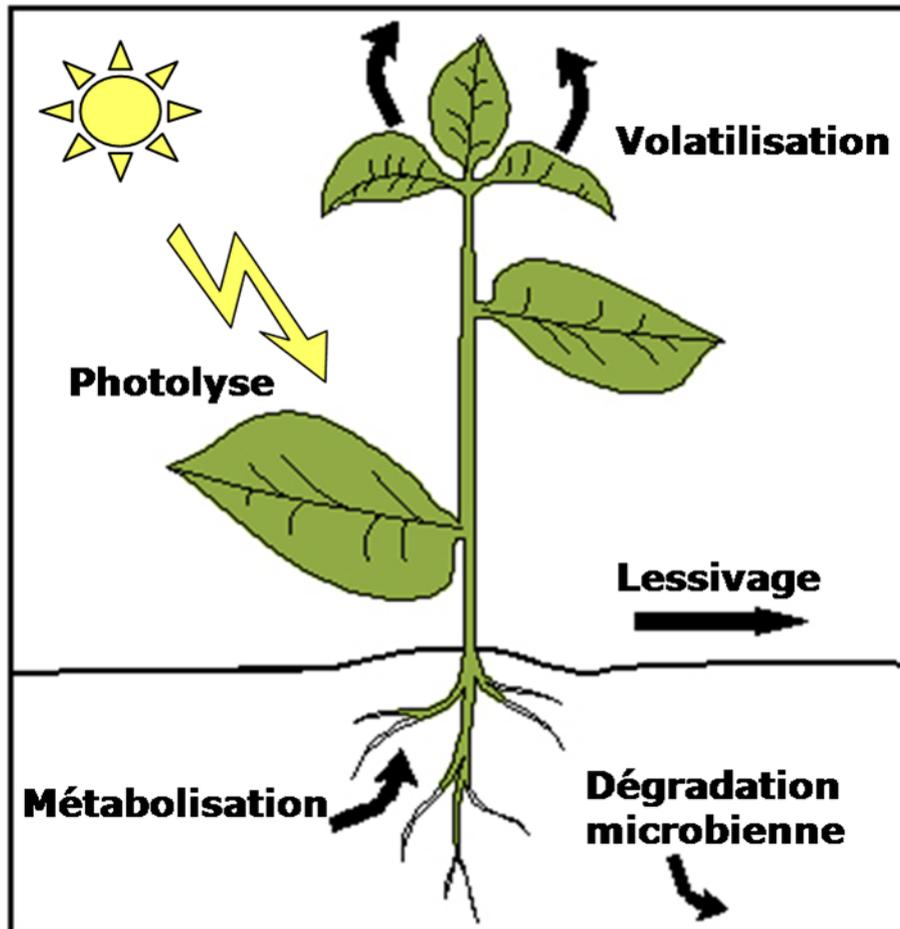


Figure 1. Schéma représentant les voies de dissipation d'un produit phytosanitaire en milieu naturel.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Les produits phytosanitaires sont des substances ou mélanges de substances qui permettent une protection des cultures et entraînent ainsi une amélioration des rendements. Ils se divisent en quatre catégories principales : les herbicides, les fongicides, les insecticides et les bactéricides.

Pendant la première et la seconde Guerre mondiale, l'industrie chimique s'est développée, et a permis l'apparition des premiers produits phytosanitaires, tels que le DDT (DichloroDiphénylTrichloroéthane), un insecticide. Actuellement la France est le troisième pays consommateur de produits phytosanitaires au monde, derrière les Etats-Unis et l'Inde. Le marché de ces produits est donc important d'un point de vue économique et agricole. Cependant, leur utilisation massive a des conséquences néfastes sur l'environnement et la santé humaine, l'effet hormono-mimétique du DDT en est un exemple (Keil *et al.*, 1976). Le plan Ecophyto 2018, mis en place par le Grenelle de l'environnement, vise à réduire l'utilisation des produits phytosanitaires.

Les produits phytosanitaires peuvent se répandre de différentes façons dans l'environnement (Figure 1). Ils peuvent être dispersés dans l'atmosphère lors de leur application et être disséminés à grande distance par rapport à leur point d'origine, entraînant ainsi des pollutions sur les eaux de surface mais aussi sur les eaux souterraines, comme les nappes phréatiques. Ces produits peuvent également être dispersés accidentellement dans l'environnement, suite à des stockages dans de mauvaises conditions ou à des techniques d'application mal adaptées. L'homme se retrouve ainsi en permanence en contact avec ces produits parfois toxiques, entraînant des cas de contamination, notamment suite à l'ingestion accidentelle de ces molécules (Graillot *et al.*, 2012).

Les produits phytosanitaires ne sont pas stables et se transforment dans le temps (Chiron *et al.*, 2009). Ils peuvent subir différents types de dégradation : chimique (hydrolyse ou oxydation), biologique (métabolisation par les champignons, les bactéries ou autres organismes vivants) ou photochimique (dégradation par un photon interagissant avec la molécule cible) (Echavia *et al.*, 2009; Katagi, 2004). Les principes actifs ont une demi-vie variable selon leur nature et vont donc se transformer plus ou moins rapidement en milieu naturel pour donner des métabolites dont la structure et l'impact sur l'environnement sont inconnus (Hernández *et al.*, 2012). De nombreuses études sont aujourd'hui menées afin d'identifier ces nouvelles molécules et d'étudier leur toxicité (Cherrier *et al.*, 2004; Doublet *et al.*, 2009; Mamy *et al.*, 2005).

Dans cette étude, la sulcotrione, un herbicide de la famille des tricétones, mis au point par Bayer, a été analysé. Cette molécule est utilisée en post levée dans la culture de maïs pour réduire l'apparition d'adventices. Elle inhibe l'enzyme hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD), provoquant l'arrêt de la production des caroténoïdes. Cela entraîne un stress oxydatif qui conduit à un blanchiment et à la mort des jeunes plantules (Chaabane *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 1993). Les différentes voies de métabolisation de cette molécule dans les sols sont notamment étudiées par le laboratoire Microorganismes : génome et

environnement (LMGE de Clermont-ferrand) ainsi que le laboratoire de Chimie des Biomolécules et de l'Environnement(Perpignan). La photolyse de cette molécule est analysée au laboratoire de Photochimie de Clermont-Ferrand. Ainsi, il a pu être déterminé que la sulcotrione se dégrade en deux produits majeurs (Ter Halle et al., 2006). Le premier est un xanthène²⁹² (xanthene-1,9-dione-3,4-dihydro-6-methylsulfonyl), qui est obtenu après cyclisation de la sulcotrione en milieu acide. Le second comprend le CMBA (2-Chloro-4-Methylsulfonyl-BenzoicAcid) et le CHD (1,3-ClycloHaneDione), obtenus par hydrolyse (Chaabane *et al.*, 2005). La toxicité de la sulcotrione et de ses produits de dégradation a été étudiée sur les microorganismes, chez lesquels il a été montré que le xanthène 292 avait des effets plus toxiques que la sulcotrione sur les bactéries et les protozoaires(ter Halle *et al.*, 2009). Cette toxicité a aussi été observée sur modèle végétal comme *Vicia faba* (Sta *et al.*, 2012) ou *Allium cepa* (Goujon *et al.*, 2014), d'un point de vue génotoxique. L'étude séparée de xanthène²⁹² et CMBA a montré que chacune de ces molécules avait un effet génotoxique sur les méristèmes racinaires d'*Allium cepa* avec une fréquence d'anomalies chromosomiques plus importante après un traitement avec la molécule xanthénique 292 (travaux en cours). De plus, il a été observé que la solution de xanthène 292 n'est pas stable dans le temps, ce qui impliquerait une nouvelle voie de dégradation, probablement chimique.

Durant ce stage, j'ai pu étudier l'effet des différents produits dégradation du xanthène 292 sur la croissance racinaire de diverses espèces. La première espèce étudiée est *Allium cepa*, qui constitue un bon modèle d'étude de la toxicité d'un produit(Rank and Nielsen, 1993; Turkoglu, 2012). L'impact des produits de dégradation du xanthène 292 a également été étudié sur *Gladiolus grandiflorus* afin de voir si les résultats obtenus chez *Allium cepa* pouvaient s'étendre à d'autres espèces à bulbe, puis sur *Zea mays*, une autre monocotylédone a fort intérêt agronomique. Des expériences ont également été faites sur *Arabidopsis thaliana*, une plante très utilisée en laboratoire, et qui possède un large panel de mutants. Elle sera donc intéressante à étudier à l'avenir pour identifier les mécanismes mis en jeu suite à l'application des différents traitements. Enfin, l'effet sur l'hybride *Populus tremula alba* a été analysé afin d'étendre notre étude sur un modèle ligneux.

La croissance racinaire qui a été évaluée durant ce stage est obtenue par deux processus physiologiques. Le premier est la division cellulaire, qui se déroule au niveau de la zone méristématique. Dans cette zone de la racine, les cellules indifférenciées subissent des divisions successives pour générer des cellules qui seront à l'origine des tissus primaires, ce qui va permettre la croissance en longueur de la racine. Les divisions suivent un cycle qui va permettre la duplication du matériel génétique et la formation de deux cellules filles. Ce cycle se déroule en quatre étapes, décrites en Figure 2. Suite à ces divisions cellulaires, le second processus permettant la croissance racinaire est mis en place sous contrôle de l'auxine : il s'agit de l'élongation cellulaire ou auxèse (Figure 3).

L'objectif de notre étude a donc été de déterminer l'impact que pouvaient avoir les produits de dégradation du xanthène 292 sur la croissance racinaire et de voir si ces effets étaient reproductibles chez différentes espèces.

MATERIELS ET METHODES

Matériel végétal

Dans cette étude, divers organismes végétaux ont été utilisés. Une variété d'oignon nommée *Allium cepa* L. var. *aggregatum* ($2n=16$), appartenant à la famille des Amaryllidacées a d'abord été étudiée. Cette plante à bulbe est utilisée pour évaluer le potentiel toxique d'agents chimiques dans l'environnement (Chauhan *et al.*, 2007; Rank and Nielsen, 1993; Turkoglu, 2012). Elle a un faible coût, sa culture en hydroponie est très rapide et elle possède beaucoup de racines dont la croissance est uniforme. Cette espèce a servi de modèle principal à cette étude.

Une variété de glaïeul nommée *Gladiolus grandiflorus*, appartenant à la famille des Iridacées a ensuite été étudiée. Il s'agit d'une plante à bulbe simple à cultiver en hydroponie. Cette espèce a permis de voir si les résultats obtenus chez *Allium cepa* pouvaient être retrouvés chez une autre plante à bulbe.

Le maïs : *Zea mays* L., de la famille des Poacées ($2n=20$) est la troisième espèce à avoir été utilisée. Il s'agit d'une monocotylédone à fort intérêt agronomique. Cette plante a été cultivée en hydroponie.

Par la suite, l'arabette : *Arabidopsis thaliana* ($2n=10$) a été analysée. La culture a été faite en boîtes de Pétri sur milieu gélosé. Cette plante de la famille des Brassicacées est intéressante car elle a une culture rapide et la germination des graines peut être synchronisée en les plaçant à 4°C. Elle a servi de modèle chez les espèces dicotylédones et a permis d'observer l'influence des produits testés sur la germination.

Une culture cellulaire de tabac (*Nicotiana tabacum*) a également été réalisée. La culture cellulaire de cette Solanacée est facile à réaliser et la croissance est rapide. Ce modèle a permis d'observer l'influence des produits testés au niveau cellulaire.

Enfin, une expérience sur une variété d'hybride de peuplier nommée *Populus tremula x alba* (*Pta*), appartenant à la famille des Salicacées a été réalisée. Cette plante, cultivée en hydroponie, a servi de modèle chez les ligneux.

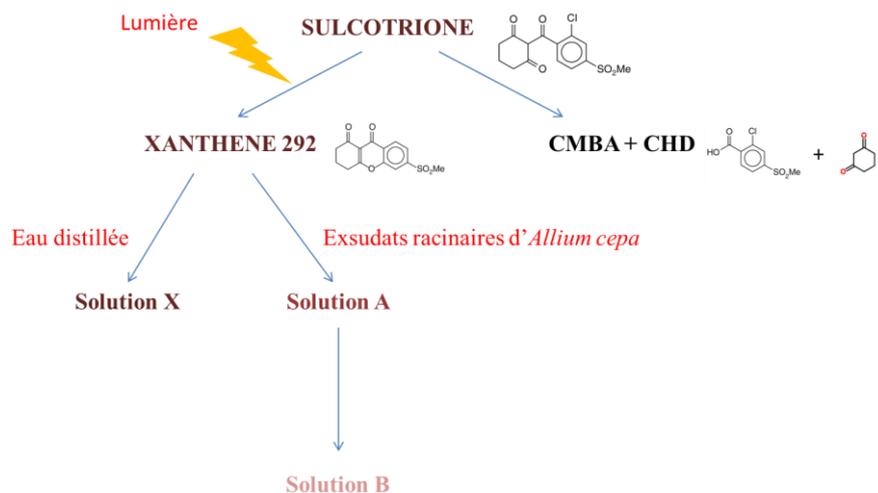


Figure 4. Schéma des différents produits de dégradation de la sulcotrione.

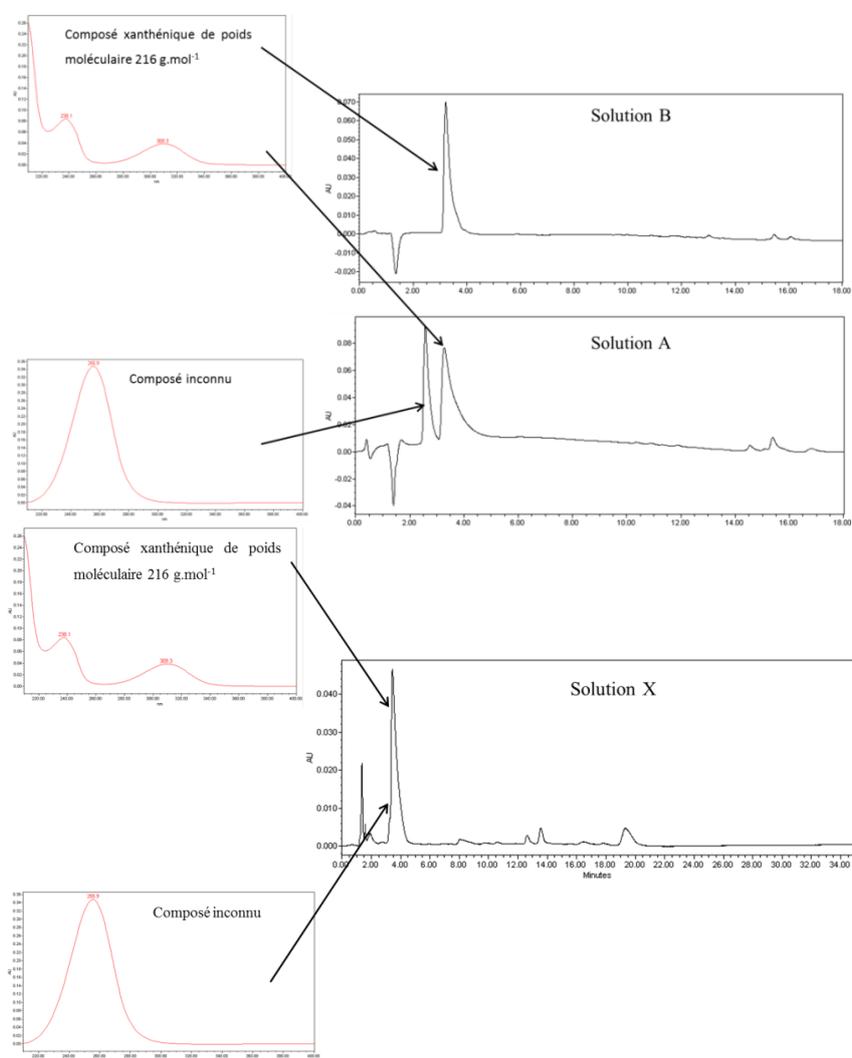


Figure 5. Profils HPLC des solutions X, A et B.

Profils HPLC des solutions X, A et B. Les trois solutions contiennent majoritairement le composé xanthénique de poids moléculaire 216g.mol⁻¹. Les solutions X et A contiennent également un composé inconnu en quantité non négligeable.

Méthodes

Traitement chimique

Lorsqu'elle est photodégradée, la sulcotrione, un herbicide de la famille des tricétones, donne deux produits majeurs : le xanthène 292, ainsi qu'un mélange de CMBA et de CHD. Les substances chimiques qui ont été testées dans cette étude sont des produits de dégradation du xanthène 292 (Figure 4).

La solution X (Figure 5) est issue de la dégradation du xanthène 292 dans de l'eau distillée. Les solutions A et B sont issues de la dégradation du xanthène 292 dans des exsudats racinaires d'*A. cepa*. La solution A (xanthène 292 et exsudats racinaires d'*A. cepa*) contient deux produits majeurs : un composé xanthénique de poids moléculaire 216 g.mol^{-1} , ainsi qu'un composé inconnu visible en HPLC mais dont la masse exacte reste à déterminer (Figure 5). La solution B (Figure 5), issue de la dégradation de la solution A dans le temps, contient majoritairement le composé xanthénique de poids moléculaire 216 g.mol^{-1} , le deuxième composé n'est plus détecté en chromatographie. Les autres molécules contenues dans ces solutions restant à de trop faibles concentrations, ne sont pas détectables et seront considérées comme négligeables. Les plantes modèles ont été traitées avec différentes concentrations de ces produits, dilués dans de l'eau distillée pour obtenir différentes gammes de dilution.

La solution X a été testée sur des bulbes d'*A. cepa* à une concentration de 1.10^{-5} M et sur *N. tabacum* à 5.10^{-6} M .

Pour la solution A, la gamme de dilution 1.10^{-7} M , 5.10^{-7} M , 1.10^{-6} M , 5.10^{-6} M , 1.10^{-5} M et 5.10^{-5} M a été testée sur *A. cepa* ; et la gamme 10^{-7} M et 5.10^{-6} M a été utilisée sur *A. thaliana*. Ce produit a également été testé à 5.10^{-6} M sur *G. grandiflorus* et *N. tabacum* et à 10^{-6} M sur *Pta*.

Pour la solution B, la gamme de dilution 1.10^{-7} M , 5.10^{-7} M , 1.10^{-6} M , 5.10^{-6} M , 1.10^{-5} M et 5.10^{-5} M a été testée sur *A. cepa* ; la gamme 5.10^{-7} M et 5.10^{-6} M a été utilisée sur *Z. Mays* et la gamme 1.10^{-7} M et 1.10^{-6} M sur *A. thaliana*. Ce produit a également été testé à 5.10^{-6} M sur le *N. tabacum* et à 10^{-6} M sur *Pta*.

La solution A étant issue d'un mélange entre xanthène 292 et exsudats racinaires d'*A. cepa*, des expériences ont été faites afin de voir si les exsudats racinaires d'*A. cepa* avaient eux aussi un impact sur la croissance racinaire. Les exsudats racinaires d'*A. cepa* ont été testés sur *A. cepa*, *A. thaliana*, *N. tabacum* et *Pta*.

L'éthyl méthane sulfonate (EMS) a été utilisé comme témoin positif dans cette étude. Sa formule chimique est $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3\text{S}$ et il a un poids moléculaire de $124,16 \text{ g.mol}^{-1}$. Il s'agit d'un composé génotoxique, fréquemment utilisé (Cavas, 2011; Rank and Nielsen, 1993). Il a été utilisé à 250 mg/L sur *A. Cepa* et sur *Z. mays*.

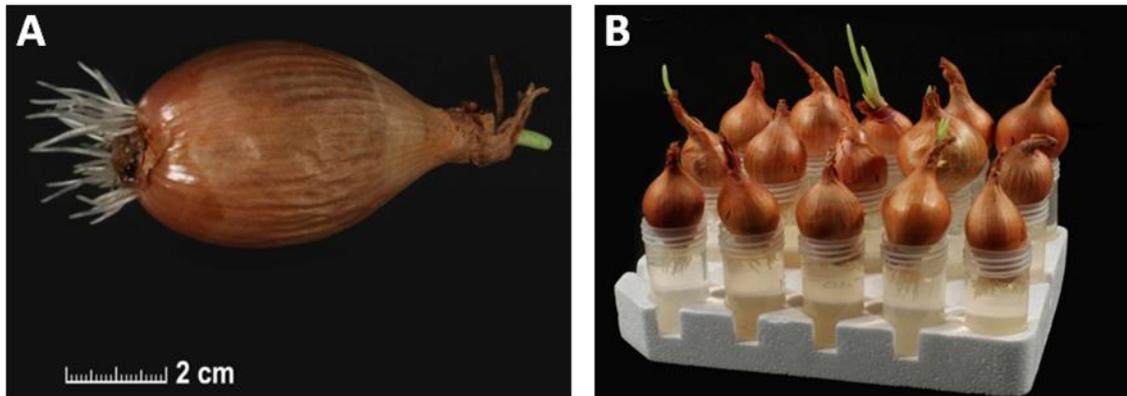


Figure 6. Photographies d'*Allium cepa* L. var. *aggregatum* seul (A) et en culture hydroponique (B).

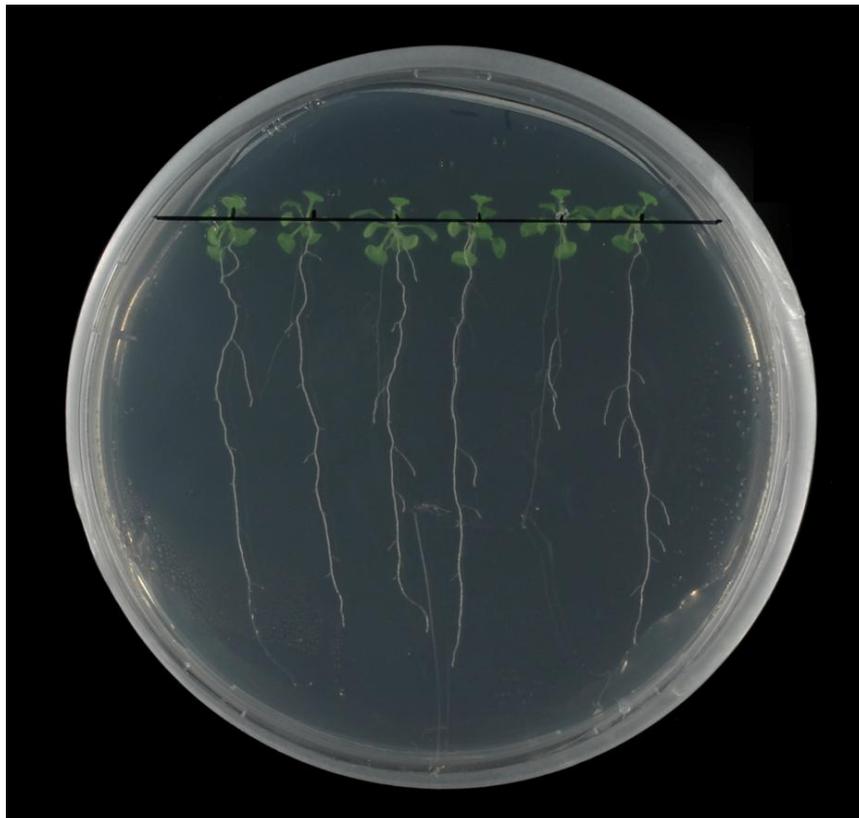


Figure 7. Photographie d'une boîte de Pétri utilisée pour la culture d'*Arabidopsis thaliana*.

Pour *A. cepa* et *G. grandiflorus*, un traitement à l'eau distillée a été réalisé afin de constituer un témoin négatif. Pour *Z. mays*, *A. thaliana*, *N. tabacum* et *Pta*, un traitement eau distillée ajoutée au milieu de culture a été réalisé afin de constituer un témoin négatif.

Prélèvements

Pour *A. cepa*, des bulbes de diamètre équivalent ont été choisis. Les plateaux ont été légèrement coupés puis les bulbes ont été placés un à un dans des tubes de 40mL contenant de l'eau distillée, de manière à ce que le plateau touche la surface de l'eau (Figure 6). Ils ont ensuite été placés à l'obscurité et à une température de 23°C. Après 48h de préculture, les racines ayant atteint entre 1 et 2 cm de longueur, les bulbes ont été traités avec la solution X, la solution A, la solution B, les exsudats racinaires d'*A. cepa*, de l'EMS ou de l'eau distillée, à raison de trois répétitions par traitement, puis placés à l'obscurité et à 23°C pendant 48h. Des photographies ont été prises à T_{0h}, c'est-à-dire juste avant traitement et à T_{48h}, correspondant à 48h après le début du traitement. Pour le traitement avec la solution B, des photographies ont été prises à T_{0h}, T_{19h}, T_{24h}, T_{43h} et T_{48h}.

Pour *G. grandiflorus*, six bulbes de taille homogène ont été choisis puis placés un à un dans des tubes en verre de 120mL, contenant de l'eau distillée, de manière à ce que le plateau touche la surface de l'eau. Ils ont subi une phase de préculture de 96h à l'obscurité, à 23°C. Ils ont ensuite été traités avec la solution A ou de l'eau distillée, à raison de trois répétitions par traitement, pour une durée de 48h à l'obscurité et à 23°C. Des photographies ont été faites à T_{0h} et T_{48h}.

Douze plants de *Z. mays* de taille équivalente (stade 3 feuilles), ayant été cultivés dans un milieu contenant de la vermiculite, ont été sélectionnés. Les racines ont été rincées à l'eau distillée puis les plantes ont été placées, de façon indépendante, dans des tubes de 15mL contenant de la solution nutritive (Annexe 1) mélangée au traitement solution B, à de l'EMS ou à de l'eau distillée, de manière à avoir trois répétitions par traitement, durant 28 jours avec une photopériode de 18h de jour et 6h de nuit et à 23°C. Les racines ont été gardées à l'obscurité. Des photographies ont été faites tous les sept jours.

A.thaliana a été cultivée dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Murashige et Skoog (Annexe 2). Des graines ont été sélectionnées de façon aléatoire, stérilisées avec de l'éthanol 70% puis placées dans la gélose à 1 cm d'intervalle, ce qui correspond à six graines par boîte (Figure 7). Les traitements solution A, solution B, exsudats racinaires d'*A. cepa* ou eau distillée ont été mélangés au milieu de culture. Trois boîtes par traitement ont été réalisées. Elles ont été placées 72h à 4°C afin de synchroniser la germination des graines. Elles ont ensuite été déposées à la verticale, en chambre de culture, à 23°C, avec une photopériode correspondant à 18h de jour et 6h de nuit. Des photographies ont été prises à 4, 11 et 18 jours après le début du traitement.

La culture cellulaire de *N. tabacum* a été réalisée dans des boîtes à 6 puits d'environ 6mL. Des cellules âgées de cinq jours ont été repiquées dans du milieu BY2 (Annexe 3) puis réparties dans les puits comprenant les traitements solution X, solution A, solution B, exsudats racinaires d'*A. cepa* ou eau distillée, à raison de trois répétitions par traitement. Les boîtes ont été mises sous agitation à 140 rotations par minute, à l'obscurité et à 24°C. Des mesures de Densité Optique à 600nm ont été effectuées toutes les 24h.

Douze plants de *Pta* issus de culture *in vitro* ont été utilisés. Ils ont été transférés en hydroponie et placés dans des béciers contenant un mélange de solution nutritive (Annexe 1) et de solution A, de solution B, d'exsudats racinaires d'*A. cepa* ou d'eau distillée, et aérés en permanence avec un bullage d'air. Les racines ont été maintenues à l'obscurité. Trois plants de *Pta* ont été utilisés par traitement. Les plantes ont été placées en chambre de culture avec une photopériode de 18h de jour et 6h de nuit, à 23°C. Des photographies ont été prises tous les sept jours.

Analyse d'images / Statistiques

Les mesures de la croissance racinaire ont été réalisées entre la base et l'extrémité de la racine, à l'aide du logiciel ImageJ version 1.48. Les calculs permettant de déterminer cette croissance sont les suivants : croissance racinaire = (longueur T_{48h} – longueur T_{0h}) pour *A. cepa* et *G. grandiflorus* ; croissance racinaire = (longueur J_{14} – longueur J_0) pour *Z. mays* ; croissance racinaire = (longueur J_{18} – longueur J_0) pour *A. thaliana* et croissance racinaire = (longueur J_8 – longueur J_0) pour *Pta*. Six mesures par plantes, ont été faites pour *A. cepa* et *G. grandiflorus*. Pour *Z. mays*, *A. thaliana* et *Pta*, une mesure par plante a été réalisée sur la racine principale.

Pour *A. cepa* et *N. tabacum*, des ANOVAs en mesures répétées ont été réalisées avec le logiciel Statistix9. Pour *A. cepa*, *G. grandiflorus*, *Z. mays*, *A. thaliana* et *Pta*, des ANOVAs à un facteur ont été réalisées avec le logiciel JMP Pro 10. Des tests HSD de Tukey, avec une erreur seuil de 0,05 ont été utilisés afin d'établir des groupes homogènes.

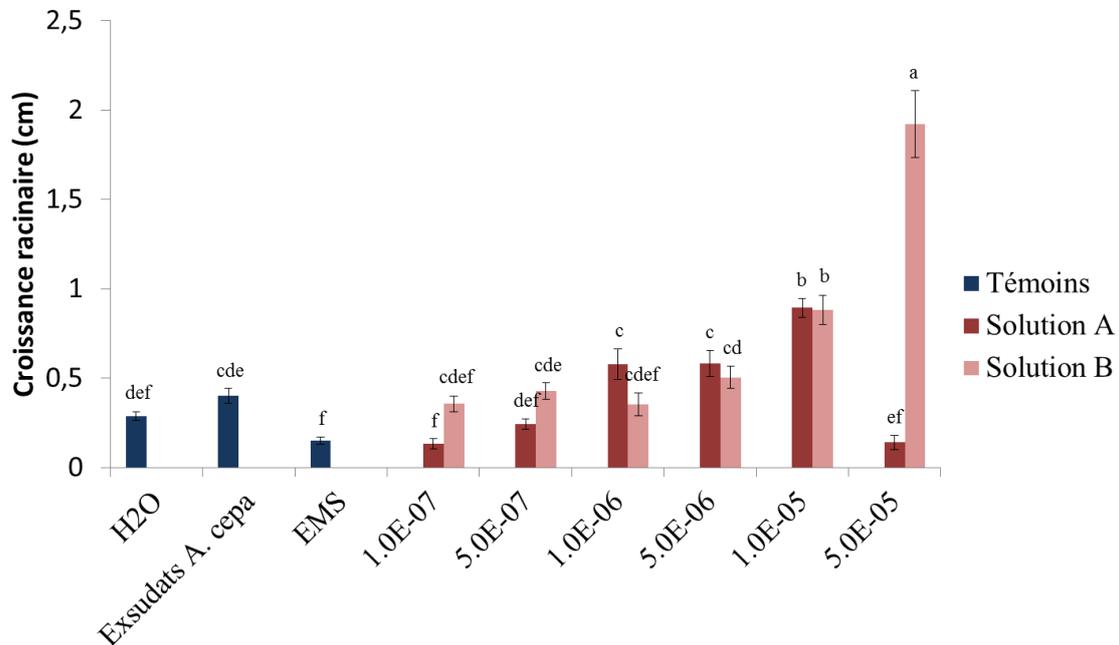


Figure 8. Mesure de la croissance racinaire des bulbes d'*Allium cepa* en cm entre T_{0h} et T_{48h}, suivant diverses concentrations en solution A et solution B (mol.l⁻¹).

Mesure de la croissance racinaire entre T_{0h} et T_{48h} des bulbes d'*Allium cepa* traités avec les solutions A et B, aux concentrations: 5.10⁻⁵M, 1.10⁻⁵M, 5.10⁻⁶M, 1.10⁻⁶M, 5.10⁻⁷M, 1.10⁻⁷M; des bulbes traités avec des exsudats racinaires d'*Allium cepa*; des bulbes traités avec de l'EMS à une concentration de 250mg.L⁻¹ et des bulbes témoins (H₂O).

Test statistique appliqué à raison de trois répétitions par traitement : ANOVA à un facteur suivi d'un test HSD de Tukey (afin de comparer tous les échantillons entre eux).

Les lettres indiquent des différences significatives entre traitements (seuil alpha de 0.05).

RESULTATS

Analyse des traitements

Lors de cette étude, différentes solutions ont été testées, toutes issues de la dégradation du xanthène 292, lui-même issu de la dégradation de la sulcotrione. Chacune de ces solutions a tout d'abord été analysée en chromatographie (HPLC) pour déterminer leur composition (Figure 5). La première solution issue de cette dégradation est X. Elle correspond à la dégradation du xanthène 292 dans de l'eau et est constituée de plusieurs molécules dont un composé xanthénique de poids moléculaire 216 g.mol^{-1} . Un mélange entre du xanthène 292 et des exsudats racinaires d'*A. cepa* a donné la solution A, qui contient deux produits majeurs : un composé xanthénique de poids moléculaire 216 g.mol^{-1} et un composé inconnu. Dans le temps, cette solution A se dégrade et donne la solution B, qui elle, contient majoritairement le composé xanthénique de poids moléculaire 216 g.mol^{-1} .

Allium cepa

Traitements solution A et solution B

Une première expérience a été faite afin de voir si les solutions A et B avaient un impact différent sur la croissance racinaire d'*A. cepa*. Les mesures de la croissance racinaire effectuées sur *A. cepa*, en fonction des traitements solution A, solution B et exsudats racinaires d'*A. cepa*, entre T_{0h} et T_{48h} , ont permis d'obtenir la Figure 8.

Pour le témoin négatif (H_2O), une croissance racinaire de 3mm entre T_{0h} et T_{48h} a été obtenue. Pour le témoin positif (EMS), cette croissance est moindre, elle est de 1mm. Une différence de la croissance racinaire est visible entre les solutions A et B à la concentration 5.10^{-5}M ; celle-ci étant de 1mm pour la solution A et de 19mm pour la solution B. La solution A, à cette concentration, aurait un effet négatif sur la croissance racinaire par rapport à la solution B. Par ailleurs, il a été observé qu'à cette concentration, les racines des bulbes traités avec la solution A avaient un aspect « pâteux », comme celui qui était obtenu pour les bulbes traités avec de l'EMS, ce qui pourrait signifier qu'à 5.10^{-5}M , la solution A serait à l'origine de la mort des cellules des racines d'*A. cepa*. Cet histogramme permet également de mettre en avant que plus la concentration en solution A ou solution B augmente, plus la croissance racinaire augmente et diffère significativement des témoins négatifs. Ainsi, pour la concentration 1.10^{-5}M , les traitements A et B sont à l'origine d'une croissance racinaire de 9mm.

Traitements solution X, solution A, solution B

L'impact des solutions X, A et B, à une concentration de 1.10^{-5}M , sur la croissance racinaire d'*A. cepa*, entre T_{0h} et T_{48h} , a ensuite été testé. L'objectif était de voir s'il y avait une différence de la croissance racinaire suite à l'application des traitements correspondant aux différents stades de

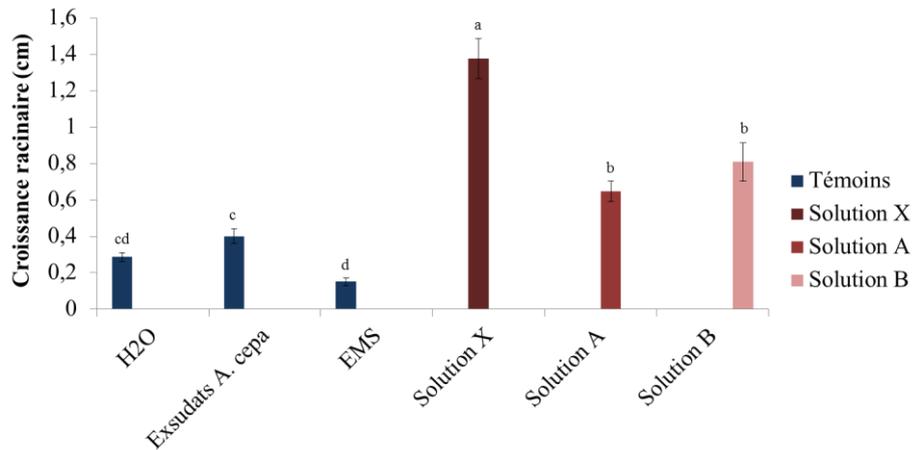


Figure 9. Mesure de la croissance racinaire de bulbes d'*Allium cepa* en cm entre T_{0h} et T_{48h}, traités avec la solution X, la solution A, la solution B, des exsudats racinaires d'*Allium cepa*, de l'EMS ou de l'eau distillée.

Mesure de la croissance racinaire entre T_{0h} et T_{48h} des bulbes d'*Allium cepa* traités avec la solution X à une concentration de 1.10^{-5} M; des bulbes traités avec la solution A à une concentration de 1.10^{-5} M; des bulbes traités avec la solution B à une concentration de 1.10^{-5} M; des bulbes traités avec des exsudats racinaires d'*Allium cepa*; des bulbes traités avec de l'EMS à une concentration de 250mg.L^{-1} et des bulbes témoins (H₂O).

Test statistique appliqué à raison de trois répétitions par traitement : ANOVA à un facteur suivi d'un test HSD de Tukey (afin de comparer tous les échantillons entre eux).

Les lettres indiquent des différences significatives entre traitements (seuil alpha de 0.05).

dégradation du xanthène 292. Cela a également permis de voir si l'impact des solutions A et B était différent de celui causé par le traitement solution X. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 9.

Pour le témoin négatif, la croissance racinaire des bulbes d'*A. cepa* est de 3mm. Cette croissance est de 4mm pour les bulbes traités avec les exsudats racinaires d'*A. cepa* et ne diffère pas de celle des témoins négatifs. Pour les témoins positifs, la croissance racinaire est de 1mm. Les traitements X, A et B sont à l'origine d'une croissance racinaire significativement augmentée par rapport aux témoins négatifs : celle-ci est de 14mm, 7mm et 8mm respectivement. Le traitement X a tout de même un effet significativement plus important que celui obtenu avec les solutions A et B. Il semblerait qu'une ou plusieurs molécules contenues dans ces différentes solutions soient à l'origine d'une croissance racinaire augmentée chez *A. cepa*.

Gladiolus grandiflorus

L'impact de la solution A, à une concentration de $5 \cdot 10^{-6}M$, sur la croissance racinaire des bulbes de *G. grandiflorus* a été étudié, afin de confirmer les observations faites sur *A. cepa*. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 10.

La croissance racinaire a été mesurée entre T_{0h} et T_{48h} . Pour le témoin négatif (H_2O), la croissance racinaire est de 5mm. Elle est de 13mm pour les bulbes traités avec la solution A. Il y a une différence significative entre la croissance racinaire obtenue avec le traitement H_2O et le traitement A. La solution A est à l'origine d'une augmentation de la croissance racinaire par rapport aux témoins négatifs, chez les bulbes de *G. grandiflorus*.

Zea mays

La solution B a été testée sur des plants de *Z. mays*, aux concentrations $5 \cdot 10^{-6}M$ et $5 \cdot 10^{-7}M$. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 11.

Pour les témoins négatifs (H_2O), la croissance racinaire est de 25mm. Elle est de 1mm pour les témoins positifs (EMS). Pour les plants traités avec la solution B à $5 \cdot 10^{-7}M$, cette croissance racinaire est augmentée : elle est de 100mm (Figure 12). Ceci diffère significativement de la croissance racinaire obtenue avec le même traitement à la concentration de $5 \cdot 10^{-6}M$, qui est de 11mm. Par ailleurs, il a été observé que les racines des plants traités avec la solution B à $5 \cdot 10^{-6}M$ avaient un aspect « pâteux », comme celui qui était observé chez les témoins positifs. La solution B, à cette concentration, serait peut-être à l'origine d'une mort des cellules racinaires de *Z. mays*.

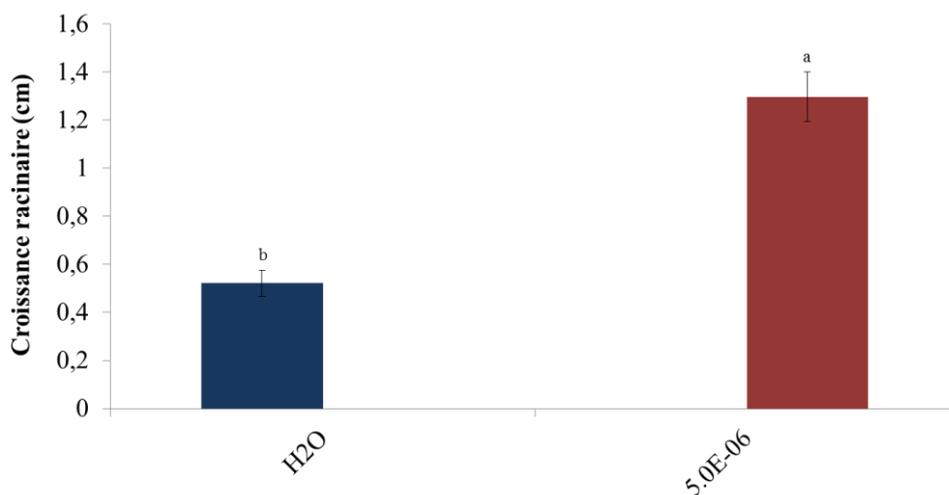


Figure 10. Mesure de la croissance racinaire des bulbes de *Gladiolus grandiflorus* en cm entre T_{0h} et T_{48h}, traités avec la solution A ou de l'eau distillée.

Mesure de la croissance racinaire entre T_{0h} et T_{48h} des bulbes de *Gladiolus grandiflorus* traités avec la solution A à une concentration de 5.10⁻⁶M et des bulbes témoins (H₂O).

Test statistique appliqué à raison de trois répétitions par traitement : ANOVA à un facteur suivi d'un test HSD de Tukey (afin de comparer les échantillons entre eux).

Les lettres indiquent des différences significatives entre traitements (seuil alpha de 0.05).

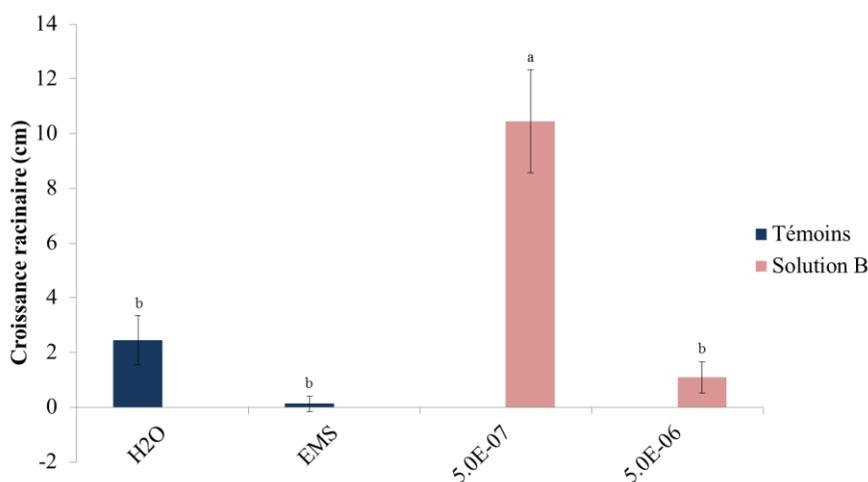


Figure 11. Mesure de la croissance racinaire de *Zea mays* en cm entre J₀ et J₁₄, traités avec la solution B, de l'EMS ou de l'eau distillée.

Mesure de la croissance racinaire entre J₀ et J₁₄ des plants de *Zea mays* traités avec la solution B aux concentrations de 5.10⁻⁶M et 5.10⁻⁷M; des plants traités avec de l'EMS à une concentration de 1750mg.L⁻¹ et des plants témoins (H₂O).

Test statistique appliqué à raison de trois répétitions par traitement : ANOVA à un facteur suivi d'un test HSD de Tukey (afin de comparer les échantillons entre eux).

Les lettres indiquent des différences significatives entre traitements (seuil alpha de 0.05).

Arabidopsis thaliana

L'impact des solutions A et B sur la germination des graines et la croissance racinaire d'*A. thaliana* a été testé à diverses concentrations. Les résultats sont présentés en Figure 13. Pour la solution A, les concentrations $1.10^{-7}M$, $1.10^{-6}M$ et $5.10^{-6}M$ ont été testées. Cependant il y a eu des contaminations dans les boîtes contenant la solution A à $1.10^{-6}M$, ce qui explique que les résultats ne soient pas présentés ici. Pour la solution B, l'effet obtenu suite à l'application des concentrations $1.10^{-7}M$ et $1.10^{-6}M$ a été analysé. Les mesures de la croissance racinaire ont été faites entre J_0 et J_{18} .

Pour les témoins négatifs (H_2O), la croissance racinaire est de 46mm. Aucun traitement n'a induit un effet significativement différent de celui obtenu pour les témoins H_2O et exsudats racinaires d'*A. cepa*. Cependant, une différence significative est tout de même constatée entre les solutions A et B à la concentration $1.10^{-7}M$. Par ailleurs, il a été constaté un retard de germination, ainsi qu'un développement anarchique des cellules au niveau de la partie aérienne, ressemblant à un cal, des plantes traitées avec la solution A à $5.10^{-6}M$ (Figure 14).

Nicotiana tabacum

Les solutions A et B ont été testées sur la culture cellulaire de *N. tabacum* afin de voir leur impact au niveau cellulaire. Cependant, les résultats obtenus ne sont pas exploitables car les conditions de culture en puits n'ont pas permis une croissance homogène des cellules. Un travail de mise au point serait donc nécessaire pour poursuivre ce type d'expérimentations sur ce modèle.

Populus tremula x alba

Les solutions A et B ont été testées sur *Pta* à la concentration $1.10^{-6}M$, entre J_0 et J_{15} . Les résultats obtenus sont présentés en Figure 15.

Pour les témoins négatifs (H_2O), la croissance racinaire est de 55mm. Elle est de 3mm pour la solution A et de 8mm pour la solution B. Les croissances obtenues pour ces deux traitements à la concentration $1.10^{-6}M$ diffèrent significativement de celles obtenues pour les témoins négatifs. Ces deux solutions sont à l'origine d'une baisse de la croissance racinaire par rapport aux témoins négatifs.

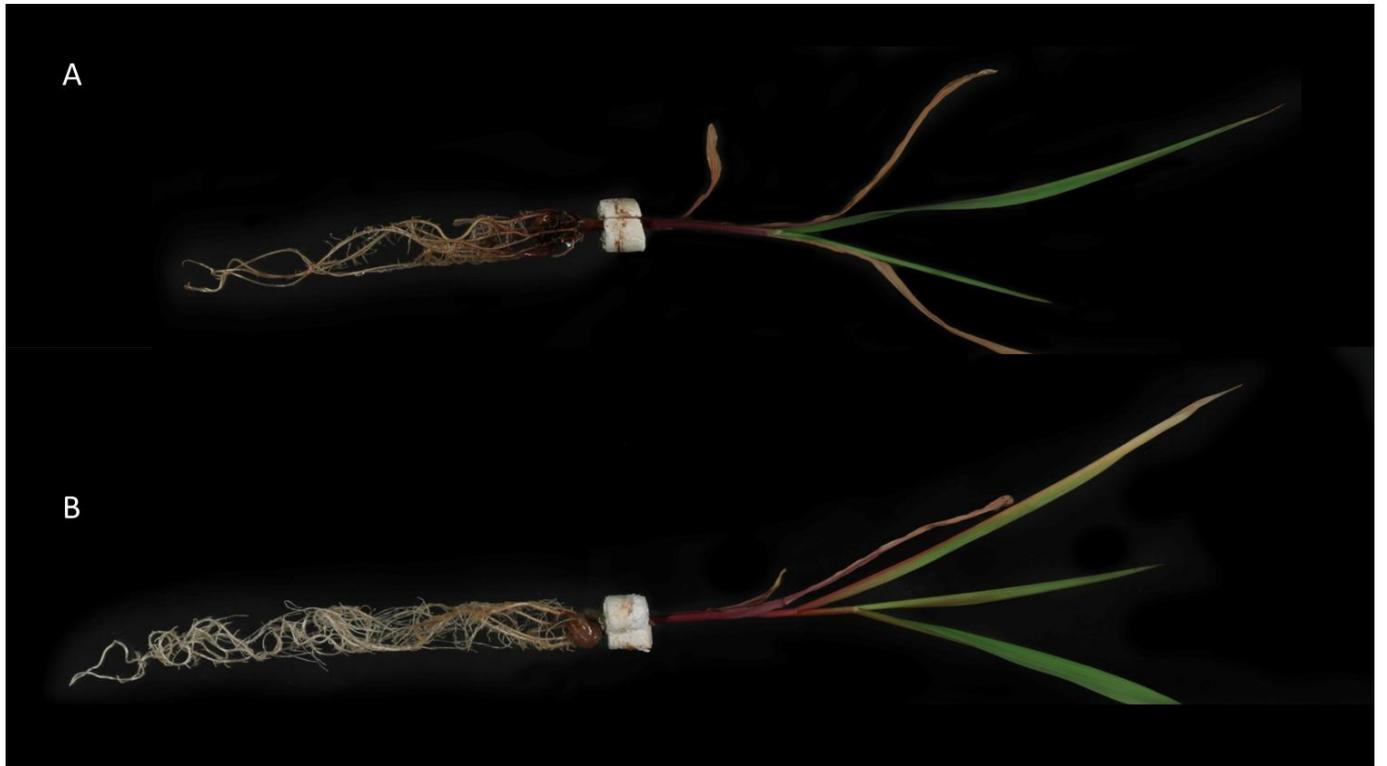


Figure 12. Photographies de deux plants de *Zea mays*, un témoin (A) et l'autre traité avec la solution B à $5.10^{-7}M$ (B).

DISCUSSION

L'objectif de cette étude a été de voir l'effet de différents produits issus de la dégradation d'un herbicide, la sulcotrione, sur la croissance racinaire de diverses espèces. Des études antérieures avaient permis de voir l'impact d'autres produits de dégradation de la sulcotrione sur l'index mitotique et la fréquence d'aberrations chromosomiques chez *A. cepa* (Goujon *et al* 2014).

Les expérimentations menées ont permis de voir l'impact que pouvaient avoir les solutions X, A et B, correspondant à différents stades de dégradation du xanthène 292 (lui-même issu de la photodégradation de la sulcotrione), sur la croissance racinaire. Ces différentes solutions ont des impacts différents en fonction des concentrations et des espèces étudiées.

D'après les analyses HPLC, les trois solutions contiennent toutes en majorité un composé xanthénique de poids moléculaire $216\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Or il a été observé qu'à $1\cdot 10^{-5}\text{M}$, tous ces traitements sont à l'origine d'une augmentation de la croissance racinaire par rapport aux témoins négatifs chez *A. cepa* (Figure 9). Il pourrait donc être imaginé que le composé xanthénique de poids moléculaire $216\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, commun aux solutions X, A et B, et présent en grande majorité, soit à l'origine de l'augmentation de la croissance racinaire. Cette croissance racinaire est aussi observée chez *G. grandiflorus* à une concentration de $5\cdot 10^{-6}\text{M}$, et chez *Z. mays* à une concentration de $5\cdot 10^{-7}\text{M}$.

Par ailleurs, il a été constaté qu'à $5\cdot 10^{-5}\text{M}$, la solution A n'est plus à l'origine d'une augmentation de la croissance racinaire et qu'elle provoquerait peut-être une mort des cellules des racines, alors que la solution B à la même concentration est à l'origine d'une croissance racinaire augmentée par rapport aux témoins. Il pourrait donc être supposé que la différence observée entre les effets causés par la solution A ou la solution B serait due à la présence du composé inconnu contenu dans la solution A et observé dans les profils HPLC (Figure 5). Ce dernier pourrait peut-être inhiber l'effet du composé xanthénique de poids moléculaire $216\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et ainsi empêcher une augmentation de la croissance racinaire. Une autre hypothèse serait que ce composé, à forte concentration, serait de nature toxique pour *A. cepa* et entraînerait une mort cellulaire.

Pour compléter ces résultats il serait intéressant de tester le composé xanthénique de poids moléculaire $216\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ seul, qui, d'après les résultats obtenus, serait potentiellement la molécule d'intérêt, et observer ses effets sur la croissance racinaire d'*A. cepa*. Ainsi, il serait possible de déterminer les concentrations optimales et les doses létales de cette molécule.

Cependant, il ne faut pas oublier que dans les solutions étudiées, ce composé xanthénique de poids moléculaire $216\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ est mélangé à d'autres molécules, et qu'il pourrait perdre ses propriétés inductrices de la croissance racinaire lorsqu'il est seul. Il pourrait être imaginé que ce composé agirait en synergie avec d'autres composés et qu'il y aurait donc plusieurs molécules d'intérêt, cela reste bien entendu à confirmer.

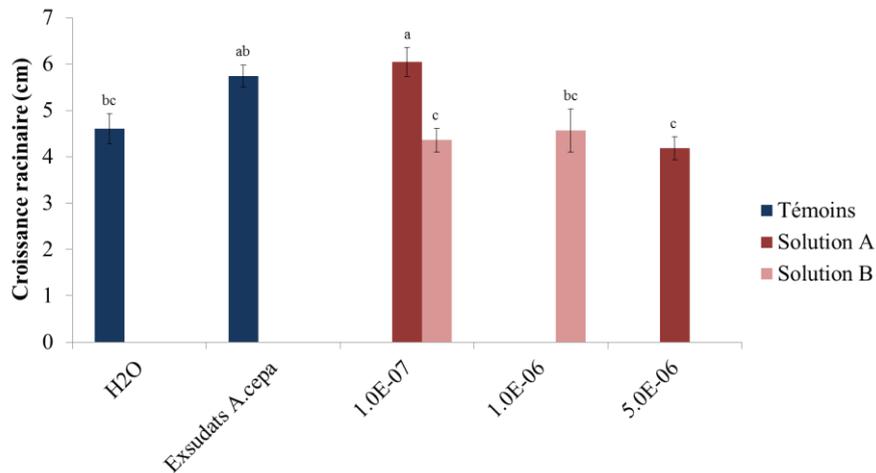


Figure 13. Mesure de la croissance racinaire des plants d'*Arabidopsis thaliana* en cm entre J₀ et J₁₈, traités avec la solution A, la solution B, des exsudats racinaires d'*Allium cepa* ou de l'eau distillée.

Mesure de la croissance racinaire entre J₀ et J₁₈ des plants d'*Arabidopsis thaliana* traités avec la solution A aux concentrations $5.10^{-6}M$ et $1.10^{-7}M$; la solution B aux concentrations $1.10^{-6}M$ et $1.10^{-7}M$; les exsudats racinaires d'*Allium cepa* ou de l'eau distillée (H₂O).

Test statistique appliqué à raison de trois répétitions par traitement : ANOVA à un facteur suivi d'un test t de Student (afin de comparer les échantillons entre eux).

Les lettres indiquent des différences significatives entre traitements (seuil alpha de 0.05).



Figure 14. Photographie montrant le développement anarchique des cellules de la partie aérienne des *Arabidopsis thaliana* traitées avec la solution A à $5.10^{-6}M$, 45 jours après traitement.

Enfin, chez *A. thaliana*, un retard de germination, ainsi qu'un développement anarchique des cellules situées dans la partie aérienne, ressemblant à un cal, ont été constatés chez les plantes traitées avec la solution A à 5.10^{-6} M. Cela pourrait signifier que cette solution agirait sur le contrôle hormonal impliqué dans la croissance racinaire, en mimant l'effet de certaines hormones, soit directement soit indirectement. Le retard de germination pourrait être en lien avec les gibbérellines et le développement anarchique des cellules pourrait être lié à la balance hormonale entre auxines et cytokinines.

Ainsi, plusieurs hypothèses peuvent être émises quant aux mécanismes que les molécules d'intérêt pourraient toucher (Figure 16). La première hypothèse (Hypothèse 1) serait que ces molécules d'intérêt agiraient au niveau de la zone méristématique et pourraient déréguler le cycle cellulaire, augmentant ainsi le nombre de divisions cellulaires. Cela expliquerait l'induction de la croissance racinaire chez *A cepa*, *G grandiflorus* et *Z mays* ainsi que le développement anarchique des cellules chez *A thaliana*. L'hypothèse 1a (Figure 16) serait que les molécules d'intérêt auraient un impact sur le déroulement des phases G1, S et G2. Ces dernières pourraient agir sur les étapes de contrôle nécessaires au passage d'une phase à l'autre. En dérégulant ces points de contrôle, les molécules pourraient être à l'origine d'un nombre de mitoses plus important et donc d'une augmentation de la croissance racinaire. Le passage d'une phase à l'autre au cours du cycle cellulaire se fait par une succession d'activation et d'inactivation de complexes CDK/Cyclines et tout ceci est contrôlé par des phytohormones et des sucres. Il pourrait être imaginé que les molécules d'intérêt agiraient directement ou indirectement pour favoriser l'effet de ces phytohormones, permettant ainsi d'activer et d'inactiver ces complexes protéiques et de stimuler le cycle cellulaire. Une expérience d'immunodétection visant à détecter les complexes CDK/Cyclines activés pourrait être réalisée. Par ailleurs, une cytométrie en flux pourrait être réalisée afin de voir le ratio de G0/G1 par rapport à G2.

L'hypothèse 1b (Figure 16) serait que les molécules d'intérêt agiraient en favorisant certaines étapes de la mitose, qui correspond à la dernière phase du cycle cellulaire. Pour le savoir, il faudrait réaliser des coupes cytologiques des racines ayant subi ces divers traitements et faire des mesures d'index mitotique. Un index mitotique plus important chez les racines traitées indiquerait que les molécules d'intérêt agiraient sur le nombre de divisions cellulaires. De plus, il serait possible de déterminer si une phase de la mitose serait favorisée par le traitement. Au cours de cette étude, des mesures de fréquences d'aberrations chromosomiques pourraient également être effectuées afin de voir si les molécules pourraient être à l'origine d'un nombre d'aberrations plus élevé. Par ailleurs, l'expérience réalisée sur *N. tabacum* pourrait être refaite, après mise au point, afin de voir s'il y a des différences de densité cellulaire entre les cultures traitées et les cultures témoins. Une densité optique globalement plus importante chez les traitées au cours du temps signifierait que les molécules d'intérêt entraîneraient une plus grande multiplication cellulaire et agiraient donc au niveau du cycle cellulaire.

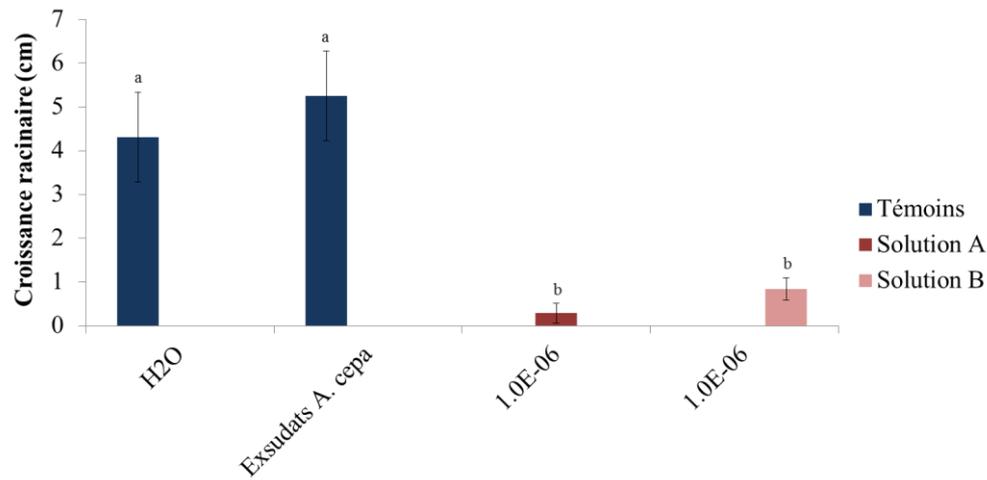


Figure 15. Mesure de la croissance racinaire des plants de *Pta* en cm entre J₀ et J₈, traités avec la solution A, la solution B, des exsudats racinaires d'*Allium cepa* ou de l'eau distillée.

Mesure de la croissance racinaire entre J₀ et J₈ des plants de *Pta* traités avec la solution A et la solution B à la concentration 1.10^{-6} M; des exsudats racinaires d'*Allium cepa* et des plants témoins (H₂O).

Test statistique appliqué à raison de trois répétitions par traitement : ANOVA à un facteur suivi d'un test t de Student (afin de comparer les échantillons entre eux).

Les lettres indiquent des différences significatives entre traitements (seuil alpha de 0.05).

L'hypothèse 2 (Figure 16) serait que les molécules d'intérêt agiraient au niveau de la zone d'élongation cellulaire. Pour le savoir, des coupes longitudinales de racines de bulbes d'*A. cepa* incluses en paraffine pourraient être réalisées et des mesures de taille des cellules situées dans la zone d'élongation cellulaire pourraient être effectuées afin de voir s'il y a des différences entre des racines traitées et des racines témoins. L'élongation cellulaire est contrôlée par l'auxine, qui, en activant les ATPases membranaires, induit une sortie de protons. Il y a alors une hyperpolarisation de la membrane plasmique et ouverture des canaux ioniques, provoquant une entrée d'ions K^+ et une augmentation de la pression osmotique. Tout ceci permet une entrée d'eau et une élongation cellulaire est alors possible. Une expérience consistant à faire germer des graines d'*A. thaliana* génétiquement modifiées contenant une construction comportant le promoteur du gène DR5 (inductible par l'auxine) couplé à un gène rapporteur (GUS ou GFP par exemple) dans des milieux contenant les différents traitements pourrait être réalisée. Une induction du gène rapporteur plus importante dans les racines traitées indiquerait une action directe ou indirecte du traitement sur la signalisation par l'auxine (Felten *et al.*, 2010).

Par ailleurs, pour déterminer si certains traitements peuvent provoquer une mort cellulaire, il serait possible de réaliser une coloration des tissus au bleu d'Evan's ou avec du diacétate de fluorescéine, qui permettent de déterminer si la membrane des cellules est intacte ou non, et donc si les cellules sont vivantes ou mortes.

En ce qui concerne les expérimentations sur *Z. mays*, qui est une plante d'intérêt agronomique, les résultats obtenus sont prometteurs mais doivent encore être confirmés. Ainsi, des expériences pourraient être réalisées sur des gammes de concentrations plus larges. Par ailleurs, les études menées ici ont été faites en hydroponie. Il serait intéressant de voir ce qu'il se passe lorsque la plante est cultivée en terre.

Enfin, les expériences faites sur *Pta*, constituent les premiers essais sur un modèle ligneux. Il a pu être remarqué que le temps de réalisation et la mise en place de ces tests étaient relativement long et que l'étude était coûteuse puisqu'elle demande des plants issus de culture *in vitro*. Il s'agit donc d'un modèle peu adapté pour une première analyse mais reste pertinent pour observer les effets d'une molécule sur un modèle ligneux.

Au cours de cette étude, il a été observé que les produits de dégradation du xanthène 292 provoquaient une augmentation de la croissance racinaire chez les espèces *A. cepa*, *G. grandiflorus* et *Z. mays*, qui sont toutes trois des monocotylédones, alors qu'elles n'avaient pas d'effet sur la croissance racinaire d'*A. thaliana* et inhibaient la croissance racinaire de *Pta*, ces deux dernières espèces étant des dicotylédones. Il pourrait être imaginé qu'il existe une différence de sensibilité à ces solutions entre les monocotylédones et les dicotylédones, mais cela reste à confirmer. Ainsi, dans cette étude, peut-être que les concentrations testées sur les dicotylédones n'ont pas permis d'observer la même chose que chez les monocotylédones, à savoir une augmentation de la croissance racinaire. Il faudrait donc réitérer les expériences faites sur *A. thaliana* et *Pta*, à des concentrations différentes.

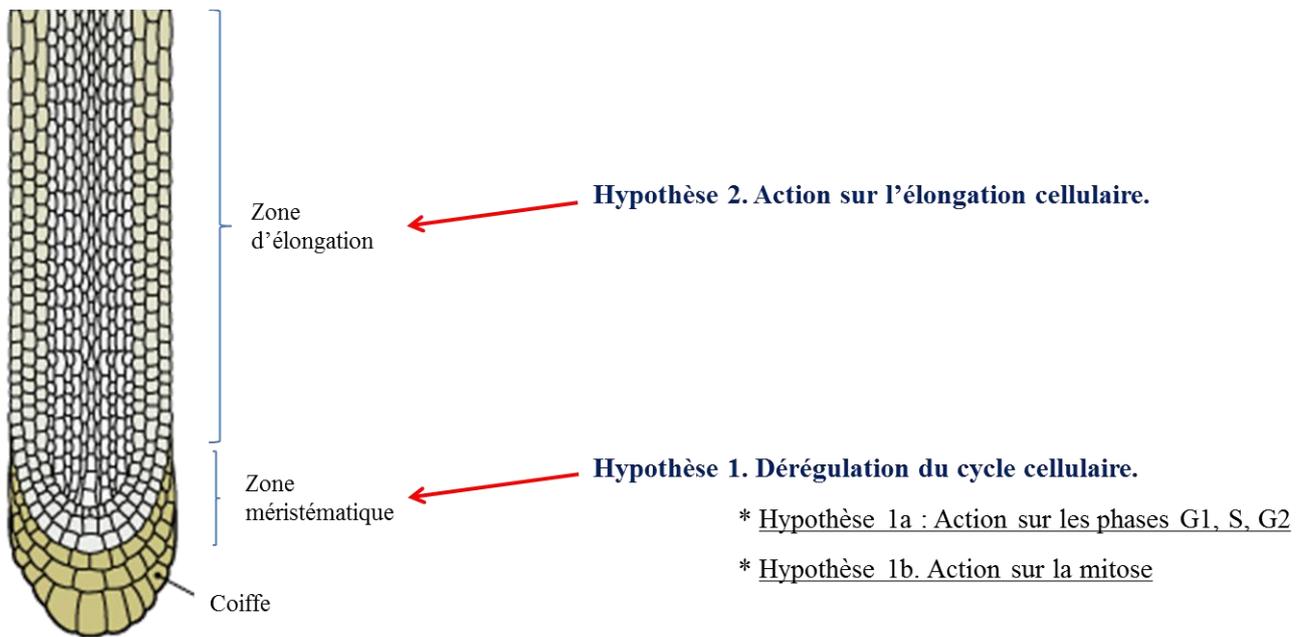


Figure 16. Schéma montrant les potentielles zones d'action de la ou des molécules d'intérêt.

CONCLUSIONS – PERSPECTIVES

Entre la première et la seconde Guerre mondiale, l'essor de la chimie organique a permis le développement massif des produits phytosanitaires. Au fil des années, ceux-ci sont apparus comme indispensables à la protection des cultures. Ils ont permis l'éradication d'un grand nombre de maladie parasitaires, assurant ainsi une production alimentaire de qualité, mais aussi une amélioration des rendements. Cependant, leur utilisation régulière et intensive s'est révélée néfaste pour l'environnement et la santé humaine. Les molécules issues de la dégradation des principes actifs de ces produits en milieu naturel, ainsi que leurs effets sur l'environnement sont aujourd'hui mal connus. Le plan Ecophyto 2018, mis en place par le Grenelle de l'environnement et visant à réduire l'utilisation de ces produits phytosanitaires a permis le développement de nombreux projets de recherche sur ce sujet.

La sulcotrione, un herbicide de la famille des tricétones, mis au point par Bayer est utilisé dans la culture de maïs. Celle-ci peut se dégrader en plusieurs molécules, dont le xanthène 292. Notre étude a permis de voir que le mélange issu de la dégradation de ce xanthène 292 permet une augmentation de la croissance racinaire chez certains modèles tels que *A. cepa*, *G. grandiflorus* et *Z. mays*. Ce mélange est également à l'origine d'un retard de germination et d'un développement anarchique des cellules de la partie aérienne chez *A. thaliana*. Au vu de ces résultats, il pourrait être supposé que ces produits de dégradation auraient un impact sur le cycle cellulaire ou sur le contrôle hormonal permettant la croissance du système racinaire.

Nos résultats sont cependant le fruit d'un premier essai et les expériences menées demandent à être approfondies, notamment chez *Z. mays*, une plante d'intérêt agronomique. Enfin, après avoir confirmé les effets de la ou des molécules purifiées et déterminé leur mode d'action sur la croissance racinaire en laboratoire, il serait intéressant d'étendre ces études en milieu naturel, en champs par exemple. Ceci permettrait de déterminer si ces dernières pourraient avoir un intérêt agronomique.

REFLEXION PERSONNELLE

L'utilisation des produits phytosanitaires et l'impact qu'ils peuvent avoir sur l'environnement, la santé humaine et les organismes vivants sont à mon sens des questions d'actualité mais également d'avenir. Je pense en effet que des études sur la réglementation de l'utilisation de ces produits, le développement de méthodes alternatives, et le contrôle des bioagresseurs sont à poursuivre. Elles permettraient notamment de répondre à une demande alimentaire future importante, en lien avec l'augmentation de la population mondiale, tout en respectant les équilibres écologiques.

Ce stage, accès sur l'étude de l'impact des produits de dégradation d'un herbicide sur le système racinaire, était étroitement lié à cette thématique que j'affectionne particulièrement. Il m'a permis de mettre en pratique mes acquis théoriques issus de mon cursus universitaire, mais également d'approfondir et d'enrichir mes connaissances sur le sujet des produits phytosanitaires. J'ai pu découvrir comment fonctionnait le monde de la recherche, apprendre les bonnes pratiques à adopter en laboratoire et me familiariser avec la démarche scientifique. J'ai parfois rencontré des difficultés dans mes manipulations ou ai dû faire face à des imprévus ou à des résultats qui ne me permettaient pas de répondre aux questions posées. Tout cela m'a permis d'acquérir de l'autonomie et de la prise d'initiatives, mais également d'apprendre à faire face et de gérer les imprévus. Enfin, ce stage m'a conforté dans l'idée que l'un de mes objectifs de carrière était de travailler sur l'impact que les produits phytosanitaires peuvent avoir sur l'environnement et/ou pour le développement de méthodes alternatives à l'utilisation de ces produits, dans une optique de protection de l'environnement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cavas, T.** (2011). In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food Chem. Toxicol.***49**, 1431–1435.
- Chaabane, H., Cooper, J.-F. F., Azouzi, L. and Coste, C.-M. M.** (2005). Influence of soil properties on the adsorption-desorption of sulcotrione and its hydrolysis metabolites on various soils. *J. Agric. Food Chem.***53**, 4091–4095.
- Chauhan, L. K. S., Kumar, M., Paul, B. N., Goel, S. K. and Gupta, S. K.** (2007). Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or isoproturon on human peripheral lymphocytes and mouse bone marrow cells. *Environ. Mol. Mutagen.***48**, 636–643.
- Cherrier, R., Perrin-Ganier, C. and Schiavon, M.** (2004). Degradation of sulcotrione in a brown soil amended with various organic matters. *Agronomie***24**, 29–33.
- Chiron, S., Comoretto, L., Rinaldi, E., Maurino, V., Minero, C. and Vione, D.** (2009). Pesticide by-products in the Rhone delta (Southern France). The case of 4-chloro-2-methylphenol and of its nitroderivative. *Chemosphere***74**, 599–604.
- Doublet, J., Mamy, L. and Barriuso, E.** (2009). Delayed degradation in soil of foliar herbicides glyphosate and sulcotrione previously absorbed by plants: consequences on herbicide fate and risk assessment. *Chemosphere***77**, 582–9.
- Echavia, G. R. M., Matzusawa, F. and Negishi, N.** (2009). Photocatalytic degradation of organophosphate and phosphonoglycine pesticides using TiO₂ immobilized on silica gel. *Chemosphere***76**, 595–600.
- Felten, J., Legué, V. and Ditengou, F. A.** (2010). Lateral root stimulation in the early interaction between *Arabidopsis thaliana* and the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: is fungal auxin the trigger? *Plant Signal. Behav.***5**, 864–7.
- Goujon, E., Sta, C., Trivella, A., Goupil, P., Richard, C. and Ledoigt, G.** (2014). Genotoxicity of sulcotrione pesticide and photoproducts on *Allium cepa* root meristem. *Pestic. Biochem. Physiol.***113C**, 47–54.
- Graillot, V., Takakura, N., Hegarat, L. Le, Fessard, V., Audebert, M. and Cravedi, J.** (2012). Genotoxicity of Pesticide Mixtures Present in the Diet of the French Population. *Environ. Mol. Mutagen.***53**, 173–184.
- Hernández, A. F., Parrón, T., Tsatsakis, A. M., Requena, M., Alarcón, R. and López-Guarnido, O.** (2012). Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. *Toxicology*.
- Katagi, T.** (2004). Photodegradation of pesticides on plant and soil surfaces. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol 182* (ed. Ware, G. W.), pp. 1–189. New York: Springer.

- Keil, J. E., Caddy, R. G., Loadholt, C. B., Hennigar, G. R. and Walker, E. M.** (1976). Prolonged ingestion of commercial DDT and PCB; effects on progesterone levels and reproduction in the mature female rat. *Arch. Environ. Contam.***3**, 479–490.
- Mamy, L., Barriuso, E. and Gabrielle, B.** (2005). Environmental fate of herbicides trifluralin, metazachlor, metamitron and sulcotrione compared with that of glyphosate, a substitute broad spectrum herbicide for different glyphosate-resistant crops. *Pest Manag. Sci.***61**, 905–916.
- Rank, J. and Nielsen, M. H.** (1993). A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex-mixtures. *Hereditas***118**, 49–53.
- Schulz, a, Ort, O., Beyer, P. and Kleinig, H.** (1993). SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Febs Lett.***318**, 162–166.
- Sta, C., Ledoigt, G., Ferjani, E. and Goupil, P.** (2012). Exposure of *Vicia faba* to sulcotrione pesticide induced genotoxicity. *Pestic. Biochem. Physiol.***103**, 9–14.
- Ter Halle, A., Drncova, D. and Richard, C.** (2006). Phototransformation of the herbicide sulcotrione on maize cuticular wax. *Environ. Sci. Technol.***40**, 2989–2995.
- Ter Halle, A., Wiszniowski, J., Hitmi, A., Ledoigt, G., Bonnemoy, F., Bonnet, J. L., Bohatier, J. and Richard, C.** (2009). Photolysis of the herbicide sulcotrione: formation of a major photoproduct and its toxicity evaluation. *Pest Manag. Sci.***65**, 14–18.
- Turkoglu, S.** (2012). Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. *Pestic. Biochem. Physiol.***103**, 224–230.

Annexe 1 : Solution nutritive pour la culture hydroponique de *Z. mays* et *Pta*

Macro-éléments :

	PM	Molarité (M)	Quantité (g.L ⁻¹)
NaCl	58.44	0.17	10
MgSO ₄ , 7H ₂ O	246.48	1.10	270
(NH ₄) ₂ SO ₄	132.13	0.55	72.5
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	236.15	1.46	345
KNO ₃	101.1	2.00	202
K ₂ HPO ₄	174.18	1.10	192
KH ₂ PO ₄	136.09	1.10	150

Micro-éléments :

	PM	Molarité (M)	Quantité (mg) pour 200mL
(NH ₄) ₂ MoO ₄	196.01	0.51	100
MnSO ₄ , H ₂ O	169.02	3.61	610
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	287.53	3.06	880
H ₃ BO ₃	61.83	9.06	560
CuSO ₄	159.6	1.23	196

Mascolate de fer (2% final)

Annexe 2 : Solution mères du milieu Murashige and Skoog

Macro-éléments(10X)

	1000 mL
NH ₄ NO ₃	16.5 g
KNO ₃	19 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	4.4 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	3.7 g
KH ₂ PO ₄	1.7 g

- Solution à autoclaver 20 minutes à 120°C et conserver à 4°C.

Vitamines MS (200X)

	1000 mL
Acide nicotinique	100 mg
Pyridoxine hydrochloride	100 mg
Thiamine hydrochloride	20 mg

- Solution à stériliser par filtration et conserver à 4°C.

Oligo-éléments (1000X)

	100 mL
H ₃ BO ₃	620 mg
MnSO ₄ , H ₂ O	1690 mg
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	1060 mg
KI	83 mg
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	25 mg
CuSO ₄ , 5H ₂ O	2.5 mg
CoCl ₂ , 6H ₂ O	2.5 mg
(ou CoCl ₂)	(1.36 mg)

- Solution à autoclaver 20 minutes à 120°C et conserver à 4°C.

Fer (FeNaEDTA) : 2 g dans 500 mL

Myo-inositol (100X) : 5 g dans 500 mL

- Solutions à autoclaver 20 minutes et conserver à 4°C.

Annexe 3 : Milieu de culture BY-2

Murashige et Skoog	4.3 g
Saccharose	30 g
Thiamine	1.0 mL
Myo-inositol	2.0 mL
2.4-D	1.0 mL
H ₂ O	Qsp 1000 mL

Le milieu est ajusté à pH 5.8.

Stériliser le milieu nutritif 20 minutes à 120°C.

RESUME

Utilisés dans la protection des cultures, les produits phytosanitaires permettent une amélioration des rendements et de la qualité de la production. Cependant, l'usage intensif de ces produits a des conséquences négatives sur l'environnement et la santé humaine. De plus, en milieu naturel, les principes actifs perdent leur fonction première en se dégradant en des molécules dont les effets sont inconnus. Dans une optique de protection de l'environnement, l'étude de la toxicité de ces nouvelles molécules indésirables est donc devenue indispensable.

La sulcotrione, un herbicide de la famille des tricétones, est dégradable, notamment par la lumière. Cette dégradation conduit à la formation de produits dont la toxicité est étudiée. Nos travaux ont permis d'analyser l'impact de certains de ces produits de dégradation sur la croissance racinaire de différents modèles végétaux. Les résultats ont montré une croissance racinaire augmentée, dépendante de la concentration des traitements ainsi que de l'espèce végétale testée, mais les modes d'action de ces produits de dégradation restent encore à déterminer.

Ces résultats montrent qu'une molécule utilisée à l'origine comme herbicide peut évoluer au cours de sa dégradation et aboutir à la formation d'un composé ayant des propriétés surprenantes.

Mots-clé : croissance racinaire, produits de dégradation, produits phytosanitaires, sulcotrione, toxicité.

ABSTRACT

Pesticides are used to protect cultivated lands. They improve crop yields and production quality. Nevertheless, pesticides could have negative consequences and should be considered in environmental risk assessments and human health. In natural environment, these molecules could be degraded and formed compounds whose effects are unknown. The evaluation of these degradation products became essential.

Sulcotrione is a triketone herbicide and is quickly degraded by solar light. The toxicity of its degradation products is studied. The aim of this work was to analyze the impact of these degradation products on root growth of different plant models. Results have shown an improvement of root growth, which depends on concentration treatment and on the studied specie. The action mode of these products remains to be determined.

This results show that a molecule used as an herbicide can evolve and can be degraded in a compound which could have surprising properties.

Key-words : degradation products, pesticides, root growth, sulcotrione, toxicity.