



HAL
open science

Les monooxygénases du blé responsables de la désactivation du chlorotoluron

Ferdinand Cabanne, Christian Mougin, René Scalla

► **To cite this version:**

Ferdinand Cabanne, Christian Mougin, René Scalla. Les monooxygénases du blé responsables de la désactivation du chlorotoluron. 20ème congrès du Groupe Français des Pesticides, 1990. hal-01600403

HAL Id: hal-01600403

<https://hal.science/hal-01600403v1>

Submitted on 17 Mar 2023

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.

Les monooxygénases du blé responsables de la désactivation du chlorotoluron.

F. Cabanne, C. Mougin et M.C. Canivenc

Laboratoire de Malherbologie - INRA - BV 1540 - 21034 Dijon Cedex

Les monooxygénases végétales mériteraient d'être mieux connues car c'est souvent grâce à elles que le désherbage chimique des céréales est possible. On peut se faire une idée de leur importance en rappelant leur contribution dans la désactivation des herbicides.

- Elles sont capables de transformer une grande variété de structures par des réactions oxydatives. Presque toutes les familles d'herbicides possèdent une ou plusieurs matières actives qui peuvent être substrats de ces enzymes. Les métabolites formés sont principalement hydroxylés et N-déméthylés et sont en règle générale moins toxiques que les matières administrées.
- Elles apparaissent comme les facteurs limitants de la désactivation oxydative car les métabolites oxygénés s'accumulent peu ou pas.
- Elles assurent souvent à elles seules la désactivation des herbicides dans les céréales. De ce point de vue ces plantes se distinguent du soja, du maïs ou du sorgho qui disposent d'une deuxième voie désactivante via le glutathion et les transférases correspondantes.
- Elles présentent des activités dont les niveaux et les caractéristiques peuvent être très différents d'une espèce à une autre. Ces niveaux sont souvent élevés dans les cultures de monocotylédones tolérantes et plus faibles dans leurs espèces adventices sensibles. Ces différences sont à l'origine de plusieurs sélectivités d'herbicides utilisés sur ces cultures.
- Elles sont également impliquées dans certaines multirésistances d'espèces adventices qui résultent de l'application répétée d'un herbicide. Ces résistances ne peuvent pas être dues à des mutations de cibles car elles présentent des résistances croisées pour des herbicides présentant des modes d'action différents. Dans les exemples rapportés (résistances d'*Alopecurus myosuroides* au chlorotoluron en Grande Bretagne, et de *Lolium rigidum* au diclofop-méthyle ou à l'atrazine en Australie) aucune différence n'a pu être détectée entre les biotypes sensibles et résistants pour ce qui regarde l'absorption, la sensibilité des cibles et leur concentration, ou la migration des herbicides dans les plantes. Comme les herbicides utilisés pour la sélection des résistances peuvent être des substrats de monooxygénases et qu'il en est de même pour la plupart des herbicides impliqués dans les résistances croisées, il est postulé qu'un métabolisme oxydatif accru dans les biotypes résistants soit à l'origine des multirésistances. Cette hypothèse a déjà été confirmée dans le cas d'*A. myosuroides* (Jones et Caseley 1990).

Les phénylurées substituées constituent par ailleurs des substrats intéressants pour déterminer les capacités des plantes à désactiver des xénobiotiques par voie oxydative. Le nombre des analogues structuraux est élevé dans cette famille et certains d'entre eux peuvent être dégradés selon deux voies métaboliques. Ils peuvent subir soit une hydroxylation soit une ou deux N-déméthylations.

Malgré ces données un nombre réduit de travaux a été consacré à ces monooxygénases qui sont encore très mal connues. Nous avons donc entrepris de déterminer la nature des monooxygénases du blé qui hydroxylent et qui N-déméthylent le chlorotoluron.

Etudes *in vivo*. Les essais ont été conduits sur plantes et sur cellules pour déterminer si la métabolisation de l'herbicide était sensible aux inhibiteurs des monooxygénases à cytochrome P-450. La seule donnée dont nous disposions rapportait en effet que la déméthylation du monuron dans le coton était réalisée par une enzyme de ce type (Frear *et al.* 1969).

Le travail le plus complet a été réalisé avec l'aminobenzotriazole (ABT), un inhibiteur suicide des enzymes à cyt P-450 qui forme des liaisons covalentes avec les azotes des noyaux tétrapyrroliques. Sur la base de la croissance des plantes, Gaillardon a montré que l'ABT agit comme un synergiste de l'herbicide en rendant toxiques des doses très peu toxiques par elles-mêmes. D'autres effets synergistes mais moins spectaculaires ont également été obtenus avec le pipéronylbutoxyde (un synergiste d'insecticides) et le prochloraz (un inhibiteur de cyt P-450 fongiques).

Il est bien établi maintenant que la synergie de l'ABT est spécifiquement corrélée à une inhibition de l'hydroxylation et de la déméthylation du chlorotoluron dans le blé. Cependant comme l'ABT est également capable d'inhiber des peroxygénases, on a complété nos informations en s'adressant à des inhibiteurs qui complexent le fer hémique des cyt P-450. On a utilisé notamment des fongicides et des régulateurs de croissance qui sont impliqués dans la synthèse des gibberellines ou dans la synthèse des stérols de plantes et de champignons. Une inhibition facilement interprétable a été fournie par la paclobutrazole qui ne présentait aucune phytotoxicité cellulaire aux doses utilisées. Ainsi, les expériences faites avec les inhibiteurs rendaient acceptable l'hypothèse selon laquelle les enzymes de l'oxygénation du chlorotoluron dans le blé appartiendraient à la famille des oxygénases à cyt P-450.

Deux raisons ont incité à rechercher des stimulateurs de ces activités. Les cyt P-450 animaux sont connus pour être des enzymes inductibles. Ensuite les concentrations de cyt P-450 étant environ dix fois plus faibles dans les tissus végétaux que dans le foie de rat, leurs

augmentations ne pouvaient qu'être utiles avant d'entreprendre des études *in vitro*.

Avec le phénobarbital il n'a jamais été possible de stimuler la dégradation du chlorotoluron. En revanche le 2,4-D et le cyométrilile sont apparus comme des stimulateurs à condition d'être administrés 24 - 72 heures avant l'herbicide. Les cultures de cellules de blé non chlorophylliennes (autorisant le dosage des P-450) prétraitées avec un composé aussi simple que le 2,4-D constituaient un matériel bien adapté pour l'étude des oxygénases de la désactivation des herbicides.

Etudes *in vitro*. L'hydroxylation et la N-déméthylation du chlorotoluron ont été obtenues pour la première fois *in vitro* en utilisant une fraction microsomale isolée de cellules de blé prétraitées (Mougin *et al.* 1990). Les autres fractions cellulaires récoltées au cours de l'isolement des microsomes ne métabolisaient pas l'herbicide, du moins en présence de NADPH. Les deux réactions notées dans les microsomes affichaient une totale dépendance vis-à-vis de l'oxygène moléculaire et du NADPH. Aucun autre élément réducteur ne semblait apte à remplacer NADPH et aucune synergie entre NADH et NADPH n'a été décelée. Les deux activités ne se montraient affectées ni par le mercaptoéthanol ni par le KCN, inhibiteurs respectifs de la peroxygénase du methiocarb et des peroxydases.

L'implication de la NADPH-cyt P-450 réductase dans l'expression de l'hydroxylase et de la N-déméthylase est démontrée par les inhibitions produites par le p-CMB, des analogues structuraux de NADPH et des composés accepteurs d'électrons tels que la ménadione, le DCPIP ou le cytochrome c. Enfin l'inhibition de l'hydroxylase par le CO, détectable à l'obscurité et partiellement levée à la lumière, autorise à proposer que cette activité soit assurée par une monooxygénase à cyt P-450.

Quant à la N-déméthylase, deux caractéristiques la différencient de l'hydroxylase. Une déméthylation pouvait être obtenue en anaérobiose en présence de l'hydroperoxyde de cumène et la déméthylation produite en présence de NADPH ne paraissait pas sensible au CO. Ces deux caractéristiques ne conduisent pas pour autant à rejeter l'hypothèse cyt P-450 pour cette oxygénase. Il est rappelé qu'une déméthylation du chlorotoluron a pu être acquise en présence de NADPH, que la p-chloro-N-méthylaniline déméthylase de l'avocat (une oxygénase à cyt P-450) peut fonctionner en présence d'un peroxyde organique, et que l'aromatase humaine de l'androstènedione (une oxygénase à cyt P-450) est insensible au CO. D'autres résultats sont nécessaires pour confirmer ce point.

Lorsque le chlorotoluron était administré en prétraitement, il était capable d'augmenter la concentration des cyt P-450 dans les fractions microsomales et de stimuler sa propre dégradation.

Les spécificités de substrats de l'hydroxylase et de la N-déméthylase ont été évaluées lors d'une série d'incubations faites en présence d'analogues structuraux du chlorotoluron. Les taux d'inhibition variaient en fonction des substituants du cycle aromatique. Les inhibitions n'étaient pas bien corrélées avec le caractère hydrophobe des composés testés mais plutôt avec les paramètres électroniques des substituants.

L'absence d'inhibition produite par l'isoproturon peut être rapprochée de l'absence de résistance croisée qui a été notée entre le chlorotoluron et l'isoproturon dans des lignées de blé isogéniques pour la tolérance au chlorotoluron (Snape *et al.* 1989). Ainsi ces deux herbicides qui sont désactivés dans le blé selon des voies métaboliques similaires, feraient appel à des enzymes différents.

Conclusions. Les résultats obtenus *in vitro* sont venus confirmer les hypothèses issues des travaux conduits *in vivo*. Selon toute vraisemblance l'oxygénation du chlorotoluron serait réalisée dans le blé par deux systèmes enzymatiques du type cyt P-450. Cette conclusion est en accord avec des résultats similaires publiés récemment par d'autres équipes intéressées par l'hydroxylation des herbicides dans les plantes. Ainsi l'hydroxylation du diclofop dans le blé paraît dépendre d'un cyt P-450 (McFadden *et al.* 1989; Zimmerlin et Durst 1990). Un cyt P-450 semble aussi hydroxyler le bentazon dans le maïs (McFadden *et al.* 1990). Dans ces exemples les activités étaient aussi détectées à l'aide de microsomes isolés d'un matériel végétal prétraité (anhydride naphthalique).

L'hydroxylation de quelques herbicides *in vitro* ne doit pas faire oublier que d'autres progrès sont nécessaires avant qu'elle puisse être réalisée dans tout matériel végétal et avec n'importe quel pesticide. Curieusement les microsomes de blé actifs vis-à-vis du chlorotoluron ne transforment pas le diclofop et inversement. Il n'a pas encore été possible non plus de détecter une déméthylation significative du chlorotoluron à l'aide de microsomes de *Veronica persica* qui possèdent pourtant des concentrations relativement élevées de cyt P-450 ainsi que de bonnes activités cinnamate et laurate hydroxylases. La nature des déméthylases de *Veronica persica* reste une énigme.

Références

- Jones OTG et Caseley JC (1989) Brighton Crop Protection Conference, 1175.
 Frear DS, Swanson HR et Tanka FS (1969) *Phytochemistry* 8, 2157.
 Mouglin C, Cabanne F, Canivenc MC et Scalla R (1990) *Plant Sc.* 66, 195.
 Snape JW, Parker BB, Leckie D et Nevo E (1989) Long Ashton. Sympo. 29.
 McFadden JJ, Frear DS et Mansager ER (1989) *Pestic Bioch Phys.* 34, 92.
 Zimmerlin A et Durst F (1990) *Phytochemistry* 29 (6), 1729.
 McFadden JJ, Gronwald JW et Eberlein CV (1990) *B. B. R. C.* 168, 206.