

**DIAGSOL : DÉVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU MARQUEUR FONCTIONNEL
D'EXPOSITION DES HERBICIDES BETA-TRICÉTONES
DANS LES SOLS AGRICOLES.**

Thèse de Clémence **THIOUR-MAUPRIVEZ**¹

Analysée par Jacques **GASQUEZ**²

Directrice de thèse : Lise **BARTHELMEBS**, Professeur, Université Perpignan *Via Domitia* (UPVD), BAE-LBBM, Perpignan.

Codirecteur de thèse : **Fabrice MARTIN-LAURENT**, Directeur de recherche, INRAE, UMR AgroEcologie, Dijon.

La thèse de Clémence Thiour-Mauprivez s'attaque à un problème très actuel de l'agriculture en relation avec le besoin d'avoir le moins possible d'impacts négatifs sur les écosystèmes pour préserver le sol des pesticides et des herbicides, en particulier ceux qui sont appliqués sur des millions d'hectares. Ces molécules sont susceptibles de polluer l'environnement et donc d'altérer les services écosystémiques (SE) de l'écosystème agricole. Ces différents services que l'Homme retire des écosystèmes, aussi bien l'approvisionnement en produits tangibles, que le fonctionnement des écosystèmes, les apports intangibles de la perception de l'environnement et même ce qui assure le bon fonctionnement des grands cycles de la biosphère, sont dégradés dans beaucoup de régions du globe par suite d'altérations des écosystèmes. En France, pour étudier l'état des écosystèmes, l'Evaluation Française des Ecosystèmes et des Services Ecosystémiques s'appuie sur des groupes de travail spécialisés sur les principaux écosystèmes. Très peu sont dans un état favorable de conservation. Pour le groupe de travail agricole, l'INRAE a défini 14 SE, dont plusieurs correspondent à l'état et à la vie du sol, milieu dans lequel s'inscrit le sujet de cette thèse. Les sols sont un haut lieu des SE du milieu agricole et hébergent un maximum d'organismes qui vont se trouver confrontés à des pollutions, surtout herbicides. Pour être homologué en Europe, un herbicide est testé pour démontrer qu'il n'a pas d'effet inacceptable pour l'Homme et les écosystèmes terrestres et aquatiques aux doses d'utilisation. Ces études *a priori* d'écotoxicologie sur les microorganismes ne portent que sur le taux de nitrification et de minéralisation du carbone. Ces tests ne fournissent aucune donnée sur l'abondance, la diversité et l'activité des microorganismes qui ont d'autres fonctions dans l'écosystème. Aussi, l'EFSA a relevé le besoin de définir de nouveaux indicateurs pour préserver les SE, et donc protéger les microorganismes non cibles des herbicides en particulier.

¹Thèse de doctorat de l'université de Perpignan *Via Domitia*. Ecole doctorale ED 305 Spécialité Biologie, dans les unités de recherche Biocapteurs-Analyses-Environnement (BAE-LBBM), équipe projet du LBBM USR 3579 Sorbonne Université-CNRS, Perpignan et AgroSup Dijon, INRAE, UMR1347 Agroécologie, Dijon. Soutenue le 28 octobre 2020.

² Directeur de recherches honoraire de l'INRAE, membre correspondant de l'Académie d'agriculture de France (section 1 Productions Végétales).

L'objectif de cette thèse était de tenter de vérifier si des organismes non cibles portaient la trace d'un herbicide et pouvaient être impactés dans leur métabolisme. Dans l'affirmative, pourraient-ils constituer un marqueur d'exposition au produit et devenir un indicateur de la qualité de fonctionnement des sols pour une évaluation aussi bien *a priori* qu'*a posteriori* des produits de protections des plantes ? Le sujet de l'étude retenu, déjà étudié par les équipes d'accueil à Perpignan et Dijon, a été fixé sur les herbicides β -tricétones, famille d'herbicides de post-levée sélectifs du maïs, utilisés en remplacement de l'atrazine.

La cible des β -tricétones, l'enzyme 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD), présente chez de nombreuses bactéries du sol peut-elle être utilisée comme marqueur de l'effet de ces herbicides sur les sols ? Le travail visait à développer des outils d'analyses à différentes échelles biologiques : du gène *hppd*, à la communauté de bactéries présentant cette enzyme. Aucun outil n'étant encore développé pour travailler sur l'HPPD, il a d'abord fallu créer différents outils pour vérifier l'hypothèse de départ. Dans l'affirmative, cela pourrait conduire à l'élargir à d'autres classes d'herbicides, ciblant également d'autres enzymes présentes chez les micro-organismes.

Le texte de la thèse se distribue en six parties :

- Un premier et long chapitre de présentation bibliographique très détaillée partant d'une approche générale sur la notion de SE, passant par les effets des produits de protection des plantes, puis au besoin de développer de nouveaux indicateurs de fonctionnement des écosystèmes et aboutissant à l'objectif de la thèse.

Les quatre chapitres suivants développent le travail de thèse lui-même, en se fondant sur autant d'articles parus ou à paraître présentant les résultats de la thèse :

- D'abord, le premier portait sur la détermination du gène de la HPPD comme marqueur des β -tricétones dans le sol à partir d'une longue revue avec une imposante bibliographie "Effects of Herbicide on Non-Target Micro-organisms: Towards a New Class of Biomarkers?" publiée dans *Science of Total Environment*. Ce gène s'est avéré très présent dans les sols.

- Le suivant a porté sur la détermination *in vitro* des effets des β -tricétones sur six souches pures possédant cette enzyme, organisé autour d'un article à soumettre à *Applied Microbiology and Biotechnology* « Assessing the effects of β -tricétone herbicides on bacterial HPPD : from a molecular study to an enzymatic assay ». Ces expérimentations ont permis d'identifier des souches bactériennes d'origine tellurique répondant différemment en fonction de l'herbicide et de la dose appliquée, certaines étant très sensibles.

- En troisième lieu, l'étude a porté sur le développement d'un outil moléculaire pour étudier l'abondance et la diversité de la communauté bactérienne possédant l'enzyme HPPD. Ce chapitre s'organise autour de l'article « Design of a Degenerate Primer Pair to Target a Bacterial Functional Community: The *Hppd* Bacterial Gene Coding for the Enzyme Targeted by Herbicides, a Study Case.» publié dans *Journal of Microbiological Methods*. Ce travail a permis de développer des amorces spécifiques à la communauté *hppd*.

- Enfin, la validation de l'outil moléculaire a été développée dans l'article « Assessing the effects of β -triketone herbicides on the soil bacterial and *hppd* communities: a lab-to-field experiment. » publié dans *Frontiers in Microbiology*. Des études en microcosmes de sol au laboratoire et en plein champ ont été menées sur la communauté *hppd*. L'abondance, la composition et la diversité de la communauté *hppd* des différents sols étudiés ont été mesurées, suite à l'exposition, ou non, à des herbicides. Mais, il s'est avéré que les β -tricétones n'ont pas d'effet sur l'abondance, la diversité et l'activité des communautés bactériennes totale et HPPD des sols testés. Ce pourrait être la conséquence d'une dégradation rapide de ces herbicides.

- En conclusion, pour développer le biomarqueur, l'étude a conduit à la construction d'amorces *in silico* spécifiques au gène *hppd*, à la mesure *in silico* des interactions entre l'enzyme bactérienne HPPD et les inhibiteurs β -tricétones, à la mesure de l'inhibition de l'activité

enzymatique sur des populations bactériennes HPPD qui expriment l'enzyme HPPD et à la mesure de l'abondance et de la diversité de la communauté bactérienne *hppd* du laboratoire aux champs, couplée à la détermination du devenir des β -tricétones dans les sols pour qualifier le scénario d'exposition des microorganismes à ces molécules.

L'activité enzymatique de l'HPPD de certaines souches bactériennes sensibles peut effectivement servir de biomarqueur grâce à une réponse dose-dépendante. C'est la première fois qu'est étudiée l'inhibition de l'activité enzymatique sur des populations bactériennes environnementales non transformées et qu'il est proposé d'utiliser cette activité comme marqueur de l'impact éco-toxicologique *a priori* des herbicides β -tricétones. Ces résultats ont cependant soulevé le fait qu'il s'avère encore difficile de travailler en écotoxicologie à l'échelle de la communauté. Cette étude montre également que cette approche pourrait être appliquée à d'autres familles d'herbicides, ciblant aussi des enzymes présentes dans les bactéries du sol.

La présentation de ce travail est très claire, précise et sans discours inutile. L'ensemble est éclairé par des schémas imagés et très explicites pour décrire aussi bien des concepts que la structure du travail et des enzymes en trois dimensions ou que les conclusions. Aussi bien les articles que la thèse sont étayés par une bibliographie très abondante. Le travail original de cette thèse ouvre une voie nouvelle de propositions d'indicateurs, aussi bien d'écotoxicité des herbicides que de mesures de l'état de fonctionnement de l'écosystème agricole au niveau du sol en utilisant les spécificités de différentes disciplines chez plusieurs équipes éloignées, malgré les contraintes du confinement. Il mérite que cette analyse figure sur le site de l'Académie d'agriculture de France, à titre de valorisation.

Publications :

Thiour-Mauprivez, C.; Martin-Laurent, F.; Calvayrac, C.; Barthelmebs, L., 2019. – Effects of Herbicide on Non-Target Microorganisms: Towards a New Class of Biomarkers? *Sci. Total Environ.* 684, 314–325. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.230>

Thiour-Mauprivez, C., Devers-Lamrani, M., Mounier, A.; Beguet, J.; Spor, A.; Calvayrac, C.; Barthelmebs, L.; Martin-Laurent, F., 2020. – Design of a Degenerate Primer Pair to Target a Bacterial Functional Community: The *Hppd* Bacterial Gene Coding for the Enzyme Targeted by Herbicides, a Study Case. *J. Microbiol. Methods*, 170, 105839. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105839>

Thiour-Mauprivez, C.; Devers-Lamrani, M.; Bru, D.; Béguet, J.; Spor, A.; Mounier, A.; Alletto, L.; Calvayrac, C.; Barthelmebs, L.; Martin-Laurent, F., 2020. – Assessing the effects of β -triketone herbicides on the soil bacterial and *hppd* communities: a lab-to-field experiment., *Front Microbiol* 11: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.610298>