



HAL
open science

Activités toxiques et génotoxiques de la sulcotrione chez *Vicia faba*, en association ou non avec d'autres molécules de protection

Chaima Sta

► To cite this version:

Chaima Sta. Activités toxiques et génotoxiques de la sulcotrione chez *Vicia faba*, en association ou non avec d'autres molécules de protection. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2014. Français. NNT : 2014CLF22453 . tel-01124352

HAL Id: tel-01124352

<https://theses.hal.science/tel-01124352>

Submitted on 6 Mar 2015

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.

**Université Blaise Pascal,
France**

Université d'Auvergne

N° d'ordre 630

N° D.U. 2453

Thèse de Doctorat

Présentée à l'Université Blaise Pascal par

M^{lle} STA Chaima

En vue de l'obtention du titre de:

Docteur en Sciences Biologiques

de

l'Université de Carthage

et de

l'Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand)

**Activités toxiques et génotoxiques de la sulcotrione chez
Vicia faba , en association ou non avec d'autres
molécules de protection**

Soutenue publiquement le 25 avril 2014 devant le jury composé de :

Mme Huguette SALLANON (Professeur, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse)	Rapporteur
Mr Abdelilah CHAOUI (Maître de conférence, Université de Carthage, Bizerte)	Rapporteur
Mr. M-Fouad BOUZIDI (Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand)	Examineur
Mr Bassem JAMOSSI (Professeur, Institut Supérieur de l'Education et de la Formation Continue, Tunis)	Examineur
Mr Gérard LEDOIGT (Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand)	Directeur de thèse
Mr Ezzeddine FERJANI (Professeur, Université de Carthage, Bizerte)	Directeur de thèse
Mme Claire RICHARD (Directeur de Recherche CNRS, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand)	Invitée

Je dédie cette thèse à mes parents Ali et Nabila STA qui ont été les premiers à m'encourager à aller si loin dans les études, ainsi qu'à ma grand-mère "Ya".

Remerciements :

Ce travail de recherche a été réalisé au Laboratoire de Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et Forestier (PIAF) à l'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand. Ce document, tout en couronnant nos efforts, sanctionne la fin de notre Cours Universitaire. Il est le résultat d'un travail de longue haleine. Cette thèse n'aurait pas été possible, et n'aurait certainement pu être menée à son terme, sans la présence de certaines personnes que je me dois de remercier.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mon premier Directeur de thèse, Monsieur Gérard Ledoigt. Quoi dire, une personne exceptionnelle qui a su me soutenir tout au long de mon travail, toujours disponible à aider, prêt à m'épauler et encourager dans les moments difficiles. Je le remercie pour son encadrement, pour m'avoir fait confiance en me donnant ce sujet de thèse, de m'avoir accompagné toujours avec un mot d'encouragement positif et optimiste et surtout pour son amitié. Je tiens à lui exprimer toute ma profonde gratitude. De même, Je tiens à remercier mon deuxième Directeur de thèse, Mr Ezzeddine Ferjani pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Merci pour avoir accepté de me former scientifiquement. Merci de m'avoir fait confiance. Je le remercie pour sa compréhension.

Je tiens à remercier Mme Huguette Sallanon, Professeur de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, et Mr Abdelilah Chaoui, Maître de conférences de l'Université de Carthage, pour avoir évalué ce travail en tant que rapporteur. Je voudrais également remercier les autres membres du jury, Mr Bassem Jamoussi et Mme Claire richard, respectivement Professeur à l'Institut Supérieur de l'Education et de la Formation Continue à Tunis et Directeur de recherche CNRS, à l'Université Blaise pascal de Clermont Ferrand. Evidemment, un remerciement spécial à Mr M-Fouad Bouzidi, Professeur de l'Université Blaise Pascal, pour avoir présidé ce jury.

Je remercie tout spécialement les membres et les personnels actuels et passés de l'équipe PIAF, des personnes toujours très disposées à apporter leur aide. Je ne pourrai pas tous les citer, mais je les remercie sincèrement tous.

Un grand MERCI à Mr Jean-Louis Julien et Mr Jean-Marc Lobacarro.

Mes remerciements vont aussi à mes proches et mes amis qui, avec cette question récurrente, « quand est-ce que tu la soutiens cette thèse ? », bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final. Merci à Hedia, Monia, Ahmed, Amal, Omayma, Asma, Eric, Razik, Norbert, Dominique, Flo, Romain, stéphanie, Céline, Marie, Nouhé, Dalila, Annabelle, Sinda1, Sinda2, Halouma, David, Balkoussa, Imene, Slim, Salem, Khaled, Malek, Refka, Radhia, Lise, Bea, Josquin, Wiem, Camille, Aicha..... J'estime avoir eu beaucoup de chance de les connaître.

Résumé

La toxicité cellulaire potentielle de la sulcotrione 2-(2-chloro-4-(methylsulfonyl)benzoyl)-1,3-cyclohexanedione, un herbicide sélectif tricétonique a été évaluée sur *Vicia faba* et *Allium cepa*. La génotoxicité a été étudiée sur une culture hydroponique pour des traitements à différentes concentrations de sulcotrione 10^{-5} , 10^{-4} et 2.10^{-4} M pendant 45 h. Nos résultats ont montré que la sulcotrione provoque une augmentation dose-dépendante de la fréquence des micronoyaux dans les cellules méristématiques des racines. Elle induit des altérations chromosomiques à la concentration la plus faible (10^{-5} M) mais aussi une baisse de l'indice mitotique, ce qui indique l'effet mutagène puissant de cette molécule. C'est le premier travail montrant une génotoxicité de la sulcotrione. Les signes d'intoxication se manifestent par les perturbations de la croissance foliaire et racinaires accompagnées d'un brunissement des racines traitées de *Vicia faba*. Sulcotrione, Mikado[®], marc de raisin et des mélanges de sulcotrione ou Mikado[®] et de marc de raisin induisent la mort cellulaire. La présence des herbicides ainsi que celle des cocktails ont entraîné l'installation d'un état de stress oxydant caractérisé par une production accrue d'H₂O₂. La production de radicaux d'oxygène actif s'accompagne d'une augmentation de la production de MDA et un accroissement de la mort cellulaire. L'ajout de l'extrait de raisin aux herbicides, soit à la sulcotrione ou au Mikado[®], modifie l'expression des gènes habituellement associés au stress cellulaire. Les cocktails et les herbicides modifient l'expression des gènes *hsp70.1*, *cat*, *ubiquitin*, *APX*, *CuZnSOD cy* et *CuZnSOD ch*. Des mécanismes de défense, d'induction de gènes associés au stress et de génotoxicité sont discutés.

Abstract

Potential cell toxicity of sulcotrione 2-(2-Chloro-4-(methylsulfonyl)benzoyl)-1,3-cyclohexanedione), a selective triketonic herbicide was evaluated on *Vicia faba* and *Allium cepa*. Genotoxicity was studied in hydroponic culture conditions for treatment at different pesticide concentrations 10^{-5} , 10^{-4} and 2.10^{-4} M for 45 h. Our results showed that sulcotrione treatments caused a dose dependent increase of micronucleus frequencies in root meristematic cells. Sulcotrione induced chromosomal alterations at the lowest concentration used (10^{-5} M) when incubated for 42 h. We have shown a decrease in mitotic index, indicating a potent mutagenic effect of this element. This is the first report for the genotoxicity of such a sulcotrione herbicide. It induced a growth inhibition in both leaves and roots and a brownish color in treated roots. Sulcotrione, trade mark Mikado[®], grape marc and mixtures of sulcotrione or Mikado[®] and grape marc induce cell death. The herbicides, cocktails of products with sulcotrione, such as adjuvant in commercial product, induced several changes for antioxidant cell state characterized by an overproduction of H₂O₂. Production of harmful radicals was accompanied by increased production of MDA and increase of the cell death rate. Addition of grape extracts to herbicides, either sulcotrione or Mikado[®], had different effects and results in different expression of genes usually associated to cell stress. Mixture of grape marc and herbicides enhanced transcript accumulation for different effects and results in different expression of some stress-related genes like *hsp70.1*, *cat*, *ubiquitin*, *APX*, *CuZnSOD cy* et *CuZnSOD ch*. Mechanisms which could be associated to gene expression, cell defense and genotoxicity are discussed.

Sommaire

	Page
Liste des abréviations	9
Introduction	14
Chapitre 1 : étude bibliographique	19
I. Pesticides:	21
I.1. Historique de l'utilisation des pesticides en agriculture	21
I.2. Les pesticides : une problématique environnementale majeure	23
I.3. Effets des produits phytosanitaires	25
I.4. La famille des herbicides tricétoniques	27
I.4.1. Contexte historique	27
I.4.2 La substance active	27
I.4.3. Mode d'action de la substance active	31
I.4.4. Comportement dans les différents compartiments de l'environnement	37
II. Photoprotecteurs	39
III. Le stress oxydant chez les plantes	41
III.1. origines	41
III.2. Formation des EOR	43
III.3. Formation des ENR	47
III.4. Rôles des EOR dans la signalisation	49
III.4.1. Les lésions moléculaires	49
III.4.2. Les systèmes enzymatiques de dégradation des EOR	53

IV. Expression des gènes	61
V. Génotoxicité	65
V.1. Les critères de génotoxicité	65
V.1.1. Mode d'action et effets des génotoxiques	65
V.2. Les tests de génotoxicité sur les végétaux supérieurs	69
V.2.1. Avantages et limites	69
V.2.2. Historique	73
V.3. Le test des micronoyaux	73
V.3.1. Principe	75
V.3.2. Applications	77
V.3.3. Devenir d'une cellule micronucléée	81
VI. Mort cellulaire	81
VII. Le modèle biologique	83
VII.1. La plante	83
VII.1.1. Classification	83
VII.1.2. Aspect, particularités et culture	85
VII.1.3. Caryotype et cycle cellulaire	85
VII.2. Intérêt en écotoxicologie	87
Chapitre 2 : Matériels et méthodes	91
I. Matériel végétal et conditions de culture	93
II. Génotoxicité et quelques symptômes de toxicité	93
III. Dosage des pigments photorécepteur	97
IV. Analyse des lipoperoxydes membranaires	99
V. Dosage du peroxyde d'hydrogène	99
VI. Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes	101
VII. Mort cellulaire et extraction ARN	103

Chapitre 3 : Exposition de <i>Vicia faba</i> à la sulcotrione : un pesticide qui induit la génotoxicité	121
Chapitre 4 : Les réponses cellulaires de <i>Vicia faba</i> à la sulcotrione et l'extrait de marc de raisin	141
Chapitre 5 : La toxicité de l'herbicide et de son produit formulé sur le métabolisme oxydant de <i>Vicia faba</i>	177
I. Effet du marc de raisin, l'herbicide ou le mélange sur la teneur en eau	179
II. Effet du marc de raisin, l'herbicide et le mélange sur la croissance foliaire	179
III. Effet du marc de raisin, de l'herbicide et du mélange des deux sur l'accumulation des lipoperoxydes	179
IV. Effet du marc de raisin, de l'herbicide et du mélange sur la production de peroxyde d'hydrogène	181
V. Effet du marc de raisin, l'herbicide et le mélange sur l'activité de la catalase	183
VI. Effet du marc de raisin, l'herbicide ou le mélange sur l'activité de GPX	185
Chapitre 6 : Effet de la sulcotrione et ses photoproduits sur <i>Allium cepa</i>	187
Discussion générale	193
Conclusion générale et perspectives	205
Références bibliographiques	213
Annexes	243

Liste des abréviations

ACTA: Association de coordination des techniques agricoles
ADN: Acide désoxyribonucléique
ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire
AOX: Alternative oxidase
Apx: Ascorbate peroxidases
ARN: Acide ribonucléique
ARN_m: Acide ribonucléique messenger
ATP: Adénosine triphosphate
BSA: Bovin serum albumin
Cat: Catalase
CHBA: 5,7-diceton-7-(2 chloro-4-methylsulfonylphenyl) heptanoic acid
CL₅₀: concentration létale médiane
CMBA: 2-chloro-4-methylsulfonylbenzoïc acid
Cu-Zn SODCy: Cu-Zn superoxyde dismutase cytosolique
Cu-ZnSODCh: Cu-Zn superoxyde dismutase chloroplastique
DDT: Dichlorodiphényltrichloroéthane
DHA: Déhydroascorbate
DJA: Dose journalière admissible
DL50: Dose létale médiane
ENR: espèces nitrées réactives
EOR: espèces oxygénées réactives
Gpx : Glutathion peroxydase
GSH: Glutathion
GST: Glutathion-S-transferase
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HAP: Hydrocarbure aromatique polycyclique
Hcl: Acide chlorhydrique
HM: Hydrazide maleique
HPPD : Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
HSP : Heat shock proteins
IM: Indice mitotique
LA: Acide lipoïque
LH: Acide gras insaturé
LO·: Radical alkoxy
LOO·: Radical peroxy
LOOH: Hydroperoxyde
MCN: Micronoyaux
MDA : Malondialdéhyde
MDHA: Monodéhydroascorbate
MF: Matière fraîche
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO·: Oxyde nitrique
NO₂·: Dioxyde d'azote
NOS: NO synthase
NTBC : 2-(2-nitro-4-fluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione
O₂⁻ : Anion superoxyde
OH·: Radical hydroxyle
OH·: Radicaux hydroxyles
ONOO⁻ : Peroxynitrite
PCD: Programmed Cell Death
PCR: Polymerase chain reaction

Liste des abréviations

Prx : Peroxyrédoxine
PSII :PhotosystèmeII
q.s.p: Quantité suffisante pour
RNase: Ribonucléase
ROS: **R**eactive **O**xygen **S**pecies
RT: Reverse Transcription
RT-PCR: Real Time-PCR
S: Sulcotrione
SAU : Surface agricole utile
SDS: Sodium dodécyl sulfate
SOD: Superoxide dismutase
TBA: Acide thiobarbiturique
TCA: Acide trichloroacétique
TEPP: Tetraethyl pyrophosphate
Tm: Melting Temperature
UE: Unité enzymatique
¹O₂ : Oxygène singulet

INTRODUCTION

Une large utilisation des pesticides depuis plusieurs décennies a conduit à leur dissémination dans tous les milieux de l'environnement et pour certains à une persistance sur le long terme. Cependant si les pesticides sont d'abord apparus bénéfiques, leurs effets secondaires nocifs ont été rapidement mis en évidence. Leur toxicité obligée, liée à leur structure moléculaire, ne se limite pas en effet aux seules espèces que l'on souhaite éliminer, mais pose un problème environnemental notamment pour l'équilibre des écosystèmes et la santé de l'homme (Meyer *et al.*, 2003 ; Viel *et al.*, 1998). En effet, de nombreuses données attestent de leur présence dans les fluides biologiques des populations humaines, même après leur interdiction pour les plus persistants. La question des effets des pesticides sur la santé suscite des inquiétudes dans l'opinion publique et constitue une préoccupation inscrite depuis plusieurs années dans l'agenda politique. Plusieurs rapports parlementaires ont récemment alimenté le débat. Ainsi des études ont montré la présence de résidus de pesticides dans les aliments (Cunniff P *et al.*, 1995) ainsi que dans les eaux souterraines et superficielles (Di Corcia *et al.*, 1992) que les institutions nationales et supranationales s'efforcent d'identifier et de limiter (plan national Ecophyto 2018, législation Européenne REACH,...).

La question se pose de manière encore plus cruciale chez les exploitants agricoles et tous les professionnels qui sont amenés à manipuler, parfois massivement, de nombreuses substances, tout au long de leur carrière. Même si la disponibilité et l'utilisation des pesticides sont encadrées par des réglementations, la question du risque demeure présente.

Les herbicides de la famille chimique des tricétones, mis sur le marché dans les années 90, ont été homologués dans certains itinéraires techniques agricoles, notamment en maïsiculture, «bénéficiant» du retrait de substances actives comme l'atrazine. Ces molécules de nouvelle génération (mésotrione et sulcotrione), employées à doses inférieures à celles de l'atrazine (150 - 450 g.Ha⁻¹ vs 1200 g.Ha⁻¹) ont été qualifiées de composés « présentant des risques minimes pour l'environnement » (Mitchell *et al.*, 2001). Toutefois, les incertitudes sur l'ampleur de ces nouveaux herbicides ont laissé poser des questions sur les risques qui sont liés à l'exposition. Le comportement de ces composés est fortement conditionné par plusieurs processus, parmi lesquelles la photodégradation. Cette dernière limite la longévité des matières actives et libère des photoproduits ne possédant plus l'activité herbicide et peuvent présenter un impact toxicologique. Afin de réduire la formation de ces photoproduits et augmenter l'activité de l'herbicide, la recherche des molécules à propriété photoprotectrice pouvant être ajoutées aux solutions formulées de l'herbicide a été développée. Des

flavonoïdes extraits de plantes jouent efficacement ce rôle et leur utilisation en tant que photoprotecteurs des matières actives semble prometteuse.

Dans cette optique, le travail de cette thèse a pour objectif principal l'évaluation de la toxicité de la sulcotrione et de son produit formulé. L'objectif secondaire est de réduire son impact dans l'environnement en proposant l'ajout de l'adjuvant qui était cherché dans les résidus viticoles afin d'empêcher la dégradation du produit actif et d'augmenter son activité.

Ce travail est structuré en six chapitres suivant une introduction générale.

Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique sur les produits phytosanitaires et leur impact environnemental suivi d'un rappel général de leurs effets sur les cellules.

Dans le deuxième chapitre, l'ensemble des méthodes expérimentales ainsi que le matériel utilisé dans ce travail sont présentés.

Le troisième chapitre étudie l'exposition de *vicia faba* à la sulcotrione : un pesticide qui induit la **génotoxicité**.

Les **réponses cellulaires** de *Vicia faba* à la sulcotrione et l'extrait de marc de raisin sont présentées dans le quatrième chapitre.

Le cinquième chapitre porte sur les **symptômes de toxicité** causé par l'herbicide ainsi que son produit formulé et l'étude du **métabolisme oxydant** chez *Vicia faba*.

Le sixième chapitre porte sur **l'effet des photoproduits de la sulcotrione** sur une autre plante, *Allium cepa*.

Le septième chapitre représente la discussion générale.

Enfin nous concluons et ouvrons des perspectives d'études et d'applications.

CHAPITRE 2 :
MATERIELS ET METHODES

I. Matériel végétal et conditions de culture

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est la fève (*Vicia faba*), variété : Aguadulce.

- *Germination des graines :*

Les graines de *Vicia faba* sont triées et désinfectées par un lavage à l'eau de Javel (10 %) pendant 20 min, puis rincées abondamment à l'eau distillée pour lessiver les produits de conservation ayant adhéré à la graine.

Pour faciliter et homogénéiser leur germination, les graines sont placées dans de l'eau distillée pendant une nuit. Elles sont ensuite, mises à germer entre deux couches de coton imbibé continuellement par de l'eau distillée. La germination se fait à l'obscurité et à une température de $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

II. Génotoxicité et quelques symptômes de toxicité

- *Culture hydroponique et traitements:*

Après 4 jours de germination, les plantules sont repiquées dans des bacs contenant un milieu nutritif hydroponique continuellement aéré par des pompes d'aquarium. Les solutions nutritives sont renouvelées tous les deux jours pour éviter les variations de pH et l'épuisement des ions minéraux. La culture se déroule en salle climatisée sous condition maîtrisées : 16 h de lumière/8h d'obscurité, à une température $25^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$ et à une humidité relative de 65 (± 5)%. L'intensité lumineuse au niveau des plantules, assurée par des lampes de mercure, est de $150\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Les plantules sont cultivées sur un milieu nutritif équilibré enrichi en macro- et oligoéléments.

Macro-éléments :

Les macro-éléments sont préparés individuellement et apportés dans le milieu nutritionnel à des concentrations définies:

KNO₃.....2mM

KH₂PO₄1mM

Ca(NO₃)₂ ,4H₂O.....2.5mM

MgSO₄ ,7H₂O.....1mM

Oligo-éléments :

Les oligo-éléments, excepté le fer, sont réunis dans une solution mère unique et apportés au milieu nutritionnel aux concentrations finales suivantes:

MnSO₄ , 7H₂O 10μM

ZnSO₄ ,7H₂O.....1μM

CuSO₄ ,5H₂O.....1μM

H₃BO₄.....30μM.

(NH₄)₆ Mo₇O₂₄0.03μM

Quant au fer, il est apporté à une concentration de 50μM dans le milieu nutritif et fourni sous forme de complexe Fe-K-EDTA préparé selon les indications de Jacobson (1951).

Les tests sont répétés six fois. Les graines de *Vicia faba* sont germées et repiquées dans des solutions nutritives (témoins négatifs), Pour un litre de solution nutritive standard, 5 ml de solution de macroéléments, 1 ml de la solution d'oligoéléments (*tableau 1*) et 3 ml de solution de Fer-EDTA sont apportés. L'ensemble est versé dans un bécher gradué puis le volume est ramené avec de l'eau distillée à 1 litre puis ajusté à pH = 7. Lorsque les racines des plantules germées atteignent une longueur de 2 à 3 cm, elles sont placées dans des pots de 1 litre contenant la solution nutritive de Hoagland standard (pH = 7) (Knasmuller *et al.* 1998).

- *Traitement par l'herbicide et récolte des plantules :*

Différents produits sont ajoutés aux solutions nutritives pour le traitement de plantules. L'hydrazide maléique à 4x10⁻³M est cultivé comme témoin positif, l'hydrazide maléique est connue pour sa capacité à induire des micronoyaux chez *Vicia faba* (Marcano et al., 2004). Pour les traitements. Les plantules de *Vicia faba* âgées de 12 jours sont traitées par la sulcotrione ajoutée dans la solution nutritive, à trois concentrations différentes, (10⁻⁵,10⁻⁴ et

2×10^{-4} M). Pour chaque traitement, 3 répliquats sont réalisés. Les plantules sont récoltées après 45 heures de traitement.

Les plantules sont fractionnées en deux parties : racines et feuilles (stade deux premiers étages foliaires). Les racines sont lavées dans trois bains successifs d'eau distillée puis séchées entre deux couches de papier filtre.

Les lots destinés à l'étude de la croissance sont mis à sécher dans l'étuve à 70°C pendant 48 heures après avoir pesé leurs masses de matière fraîche et mesuré les longueurs des racines et de la surface foliaire. D'autres lots sont placés immédiatement dans l'azote liquide pour une utilisation ultérieure.

- *Indice mitotique et numérisation des micronoyaux*

Lors de la récolte, 2 à 3 cm de zones méristématiques sont récupérés et fixés dans une solution de Carnoy contenant de l'acide acétique et de l'éthanol (v/v :1/3) durant une nuit, à l'obscurité et à 4°C. Les racines sont conservées dans l'éthanol 70%. Lors de l'utilisation, elles sont rincées à l'eau distillée pendant 10 min puis hydrolysées par HCl (1N) qui permet la dissociation des structures cellulaires. La partie méristématique est écrasée sur une lame de microscopie et colorés par l'orcéine (Ma *et al.* 1995). Les micronoyaux commencent à être visibles au grossissement x400. L'indice mitotique se réfère au nombre des cellules en division comptées sur 100 cellules (grossissement x400). Ensuite la préparation est observée en microscopie photonique (grossissement x 1000) pour le comptage de micronoyaux. Trois étalements sont réalisés pour chaque replicat afin de décompter 1000 cellules par lames, soit 9000 cellules pour chaque traitement (Souguir *et al.*, 2008).

En ce qui concerne les dosages postérieurs les plantules de fèves ont été traitées par l'herbicide (sulcotrione), son produit formulé Mikado[®] l'extrait naturel de raisin Acys (marc de raisin) puis un mélange de ce dernier avec l'herbicide ou son produit formulé.

III. Dosage des pigments photorécepteur

Les feuilles sont immergées dans l'acétone 80% puis placées à l'obscurité et au froid. Après 24 h, l'échantillon est broyé puis filtré sur gaze. Le résidu est repris dans l'acétone 80%. Le filtrat obtenu est centrifugé pendant 5 min à une vitesse de 3 000 rpm. Le culot est repris dans l'acétone jusqu'à ce qu'il prenne une coloration blanche. La densité optique est

ensuite mesurée au spectrophotomètre pour les longueurs d'onde 450, 645 et 663 nm. Les concentrations en chlorophylles a et b et en caroténoïdes sont déterminées à l'aide des équations proposées par Mac Kinney (1941) et Arnon (1949). Les résultats sont exprimés en mg/g MF.

IV. Analyse des lipoperoxydes membranaires

1. Extraction :

Les racines et les feuilles fraîches de plantules de fève sont broyées dans une solution tampon formée de 0.5% d'acide thiobarbiturique (TBA) et de 20% d'acide trichloroacétique (TCA) (m/v:1/10) avec une pincée de sable de fontainebleau stérile. Le broyat est chauffé dans un bain-marie à 95°C pendant 30 min. Pendant cette incubation, un complexe se forme entre le TBA et les composés aldéhydiques, essentiellement le malondialdéhyde (MDA) : TBA-MDA. La réaction est arrêtée par un refroidissement immédiat dans un bain de glace. Après centrifugation à 10 000xg pendant 10 min, le surnageant est récupéré pour un dosage colorimétrique des lipoperoxydes.

2. Dosage :

Les concentrations en lipoperoxydes sont déterminées par la méthode de Heath et Packer (1968). Les produits de peroxydation lipidique, qui réagissent avec le TBA sont principalement le MDA et les endoperoxydes (Buege et Aust, 1978). Le dosage est effectué par spectrophotométrie. L'absorbance du complexe TBA-MDA est mesurée à 532 nm contre un blanc constitué de la solution tampon d'extraction. La densité optique est corrigée par une lecture à 600 nm. La concentration de MDA est calculée en utilisant son coefficient d'extinction molaire ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

$$\text{MDA (nmol/g MF)} = \frac{(A_{532} - A_{600}) \times V}{155 \times \text{MF}} \times 1000$$

A = Absorbance

V = Volume de l'extrait (mL)

MF = Matière végétale fraîche (g)

V. Dosage du peroxyde d'hydrogène

La matière végétale fraîche est broyée dans une solution de 0.1% TCA à raison de 10 mL/g de matière fraîche. Le broyat est ensuite centrifugé à 12 000xg pendant 15 min à 4°C. Un volume

de surnageant est incubé en présence de solution tampon phosphate 0.1M ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$; pH 7) et NaCl 0.1M. on ajoute 1ml de rouge de phénol (0.2mg/ml) et HRP (0.1mg/ml) suivi d'une incubation de 15 min à 37°C. on arrête la réaction avec 5 μ l de NaOH 1M.

La densité optique est mesurée à 610 nm (Sroka *et al.*, 2003).

VI. Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes

1. Extraction

Le matériel végétal est broyé dans un mortier maintenu dans la glace en présence d'une pincée de sable stérile.

Le tampon d'extraction, à raison de 5mL pour 1g de matière végétale, est composé de:

- **Phosphate de potassium $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$50mM, pH 7**
- **Ascorbate de Sodium.....5mM**
- **EDTA.....0.2mM**

Le broyat est ensuite centrifugé à 12 000xg pendant 15 min. Le surnageant récupéré représente la fraction des protéines solubles ou extrait brut.

2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford (1976). Le principe de cette méthode est basé sur la liaison du Bleu de Coomassie G-250 avec les liaisons peptidiques; ce qui entraîne un changement du maximum d'absorption du colorant de 465 nm à 595 nm.

Une partie aliquote de l'extrait est additionnée à 2.5mL du colorant. La coloration se développe dans un temps minimum de 5 min mais ne dépassant pas 30 min. L'absorbance est lue à 595 nm. La gamme étalon est réalisée avec des concentrations croissantes de BSA.

3. Détermination de l'activité de la catalase

L'activité de la catalase est mesurée par la diminution de la densité optique à 240 nm ($\epsilon = 0.036 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) due à la consommation de H_2O_2 (Aebi, 1984).

Le milieu réactionnel est formé de :

- $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$25mM, pH 7
- H_2O_230mM

La réaction est déclenchée par l'ajout de l'extrait protéique.

4. Détermination de l'activité de la gaïacol peroxydase

L'activité de la gaïacol peroxydase est déterminée selon la méthode de Fielding et Hall (1978). Cette activité est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 470 nm due à la polymérisation du gaïacol en tétragaiacol en présence de peroxyde d'hydrogène selon la réaction:



Le coefficient d'extinction molaire du tétragaiacol est de 26.6 mM⁻¹ cm⁻¹. La réaction est initiée par l'addition de l'extrait protéique.

Le milieu réactionnel est formé par :

- $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$25mM, pH 7
- H_2O_210mM
- Gaïacol.....9mM

VII. Mort cellulaire et extraction ARN

Les expérimentations ont été effectuées sur terreau en serre, sur le site du campus des Cézeaux. La température de la serre a été maintenue entre 14 et 26 °C au cours de l'étude.moléculaires et de mort cellulaire sont effectuées respectivement par pulvérisation ou infiltration.

Le témoin négatif est représenté par la solution nutritive standard (SNS) (racines non traitées). Le traitement consiste en l'infiltration en la pulvérisation de feuilles de *Vicia faba*, par les solutions herbicides ou témoin. Les concentrations C1 utilisées pour le traitement des plantes

sont 10^{-5} M de sulcotrione, 2.4×10^{-3} M de MikadoTM, 0.9mg (0.08% anthocyane) de marc de raisin (Acys). Le mélange de marc de raisin et sulcotrione est en proportion de 3/1 (p/p).

Les solutions MikadoTM et marc de raisin sont en rapport 0.9/1 (p/v), afin d'obtenir un rapport similaire à celui du mélange contenant la sulcotrione, sachant que le MikadoTM contient 300 g.L⁻¹ de sulcotrione. C2 et C3 sont respectivement deux et trois fois la concentration C1. Les échantillons témoins sont aussi pulvérisés ou infiltrés par de l'eau ultrapure.

a. *Mesure de l'intégrité cellulaire :*

La mort cellulaire indiquant la perte de l'intégrité de la membrane plasmique est mesurée spectrophotométriquement à l'aide de l'absorption de la solution de bleu Evans (Baker et Mock, 1994). L'intensité de la couleur est proportionnelle au nombre de cellules mortes.

Dix spots (trous) réalisés par feuille de *Vicia faba*. Les disques foliaires sont prélevés puis incubés dans une solution de 0.025% bleu Evans (m/v) pendant 30 min. ces disques sont rincés jusqu'à l'obtention d'une eau claire puis broyés dans 800µL d'une solution de 0,1% SDS (p/v).

b. *Extraction des ARN totaux et PCR quantitative en temps réel :*

1. Extraction des ARN

Les échantillons sont broyés dans l'azote liquide, empêchant ainsi tout réchauffement des tissus pouvant être à l'origine de la dégradation des ARN par les RNases (très fragiles à l'extraction). (Annexe II)

On ajoute 1mL de Tri-Reagent pour l'extraction d'ARN. Le Tri-Reagent permet de maintenir l'intégrité des acides nucléiques tout en dégradant les composants cellulaires.

L'addition de chloroforme, réagissant avec le phénol du Tri-Reagent, suivie d'une étape de centrifugation permet la séparation de l'homogénat en 2 phases :

- une phase organique contenant du chloroforme et du phénol.
- une phase aqueuse contenant les acides nucléiques.

Après récupération de la phase aqueuse, l'ajout d'isopropanol permet la précipitation des ARN. Après centrifugation, on obtient un culot d'ARN qui sera lavé à l'éthanol 70% afin d'éliminer les traces de sels et permettra un séchage rapide du culot.

Le culot est resuspendu dans un volume d'eau minimum. Une nouvelle centrifugation est réalisée afin d'éliminer les dernières insolubilités. Le surnageant contient alors les ARN solubilisés et purifiés.

2. Dosage des ARN par spectrophotométrie

Le dosage des ARN est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre UV. Il permet d'une part de vérifier la pureté des ARN obtenus et d'autre part de connaître leur concentration. Tous les échantillons sont amenés à une concentration identique en ARN. Le dosage est effectué avec la solution d'ARN dilué 100 fois.

La densité optique est mesurée à deux longueurs d'onde différentes : $\lambda = 260 \text{ nm}$ (maximum d'absorption des acides nucléiques) et $\lambda = 280 \text{ nm}$ (maximum d'absorption des protéines). Le rapport $R = DO_{260} / DO_{280}$ permet de déterminer le niveau de contamination protéique des ARN : $R \geq 1,8$ correspond à une bonne déprotéinisation.

La relation : $DO (260 \text{ nm}) = 1 \longleftrightarrow [ARN] = 40 \mu\text{g} / \text{ml}$ permet de déterminer la concentration en ARN de chaque échantillon ($[ARN] = (40 \cdot 100 \cdot DO_{260}) / 1000$).

Chaque échantillon est ramené à une concentration identique d'ARN pour plus d'homogénéité.

3. Electrophorèse des ARN sur gel d'agarose

Cette étape permet de vérifier l'intégrité des ARN. On fait migrer $1 \mu\text{g}$ d'ARN en présence de $5 \mu\text{L}$ de tampon de charge sur un gel d'agarose 1% (Annexe II).

Les ARN sont visualisés sur une table UV grâce au BET ajouté lors de la préparation du gel. Le BET est un agent intercalant qui s'insère entre les bases des acides nucléiques et qui présente, lorsqu'il est intercalé, une fluorescence orange sous UV courts (environ 300 nm). La visualisation nette des bandes des ARN ribosomiques 28S, 18S et 5S témoigne d'une bonne intégrité des ARN.

4. Synthèse des ADN complémentaires

La synthèse d'ADNc se fait par transcription inverse des ARNm à partir de 800ng d'ARN. (Annexe II).

Une première étape de dénaturation des ARN est réalisée (2 min à 70 °C). Celle-ci est indispensable pour déplier les éventuelles structures secondaires. En effet, il est possible que l'ARN (simple brin) se soit hybridé sur lui-même en formant une boucle. Dans ce cas, la reverse transcriptase ne peut pas synthétiser l'ADNc en entier.

Après dénaturation des échantillons d'ARN, un milieu réactionnel est ajouté. Il contient une solution tampon pour le maintien du pH optimal (8-9) de l'enzyme RT (MMLV), du MgCl₂ indispensable à l'activité de l'enzyme RT, des dNTP (nucléotides), des amorces oligonucléotidiques constituées d'une série de thymines qui s'hybrident à la queue poly (A) des ARNm, un inhibiteur de RNases et l'enzyme RT catalysant la synthèse des ADNc (à ajouter extemporanément).

La synthèse de l'ADNc est réalisée pendant 30 min à 48°C. La réaction est arrêtée en inactivant l'enzyme à 95°C pendant 5 min.

5. " Polymerase Chain Reaction" : PCR

La PCR correspond à une amplification d'un fragment d'ADN matrice délimité par des amorces spécifiques. La PCR comporte 3 étapes :

- La dénaturation des ADN permettant de séparer les deux brins complémentaires;
- L'hybridation des amorces sens et anti-sens aux ADN matrices grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable : le T_m ("Melting Temperature") déterminé selon la formule prenant en compte le pourcentage en GC :
$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C).$$
- L'élongation permet à l'ADN polymérase thermostable de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui lui est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel.

5.1. RT- PCR de contrôle

La RT-PCR comporte deux étapes clés : une étape de transcription inverse (RT) qui permet de synthétiser les ADNc à partir des ARNm, et une étape d'amplification par réaction

de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques encadrant la région cible de ces ADNc. Cette technique permet d'étudier l'expression des gènes ainsi que leurs variations relatives en le comparant à celles de l'actine, gène dont l'expression est considérée comme constante. La PCR témoin est donc réalisée à partir de 0.2 à 1ng d'ADNc (Annexe II) et en présence des amorces désignées. Les produits PCR sont ensuite séparés sur un gel d'agarose à 1.2 %.

5.2. PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel permet de mesurer une quantité de transcrits accumulés dans une condition expérimentale donnée. La quantité d'ADN issue de l'amplification est enregistrée en temps réel par un enregistreur de fluorescence. L'évolution de cette amplification peut être représentée par une courbe d'allure sigmoïdale en 3 phases.

Une première phase où la fluorescence du puits contenant de l'ADN ne se démarque pas du bruit de fond, une phase exponentielle et une phase plateau. Les quantités d'ADN sont comparées dans la partie exponentielle, moment pendant lequel l'augmentation de la quantité d'ADN est proportionnelle à la quantité initiale de matrice (Higuchi et al., 1993; Heid et al., 1996).

Le dispositif expérimental est composé d'un thermocycleur classique associé à un système d'enregistrement de la fluorescence, interfacé sur un ordinateur PC qui contrôle le fonctionnement de l'ensemble.

Une lampe halogène produit, grâce à un filtre, une lumière monochromatique centrée à 485 nm qui est transmise optiquement jusqu'à la plaque de PCR. Le SYBR Green®, fluorophore présent dans le mélange réactionnel, est excité à cette longueur d'onde et émet une fluorescence verte à 520 nm. Le rayonnement émis est capté par un système de détection vidéo et les images de la plaque sont stockées dans la mémoire de l'ordinateur.

L'incorporation du colorant SYBR-Green® dans la réaction de PCR permet de détecter l'ADN double brin généré durant la PCR.

Le colorant SYBR-Green® s'intercale dans l'ADN double brin et produit un signal fluorescent. L'intensité de ce signal est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin présent dans la réaction. Ainsi, à chaque étape de la réaction de PCR, l'intensité du signal

augmente en même temps que la quantité de produit augmente. Ceci fournit une méthode très simple et fiable pour mesurer les réactions de PCR en temps réel. Un autre avantage de cette technique est l'utilisation des amorces non modifiées ce qui facilite le dessin et la synthèse des amorces et diminue leur coût. Cependant, une optimisation des conditions de réaction pour chaque amorce est nécessaire. Ces paramètres incluent la concentration des amorces, la température d'hybridation et la concentration en chlorure de magnésium.

Ainsi, grâce à cette molécule et au système d'enregistrement de la fluorescence, la progression de l'amplification est suivie à chaque cycle et en temps réel.

Le logiciel Bio-Rad iQ5 permet d'une part de programmer et de maîtriser le déroulement des expériences de PCR quantitative et d'autre part, d'en stocker et exploiter les données. L'interface graphique est divisée en trois parties: la première pour saisir les conditions de PCR, la seconde pour saisir les données concernant les puits (position, couple d'amorces, type d'échantillon) et la troisième pour afficher l'analyse des résultats.

5.3. Quantification de l'ADN par la détection de fluorescence

5.3.1. Cycle-seuil et nombre de copies initiales

A la fin de la PCR, le logiciel représente graphiquement l'augmentation de la fluorescence de chaque puits au cours des cycles successifs. Le nombre de cycles étant placé en abscisse et le logarithme de l'intensité de la fluorescence en ordonnée, les amplifications suivent une courbe sigmoïde. Première phase 15 à 25 cycles, une phase exponentielle visuelle 5 cycles environ puis un plateau.

Le cycle-seuil ou Ct ("threshold cycle") correspond au cycle au cours duquel la fluorescence d'un échantillon devient significativement différente du bruit de fond. Ce seuil permet de comparer toutes les amplifications pendant la phase exponentielle. Si toutes les conditions de PCR sont respectées, il existe une relation linéaire entre le nombre de copies d'un gène présent initialement dans le puit et le cycle-seuil.

Si N est le nombre de copies du gène au cycle C_n de la PCR et N_0 le nombre de copies présentes au départ dans le tube, le nombre de copies du gène au cycle C_n peut être exprimé par la formule :

$$N = N_0 \cdot (1 + E)^{Ct} \quad (1) \quad \text{où } E \text{ est l'efficacité de la PCR (avec } E \leq 1).$$

Le nombre de molécules accumulées au cycle-seuil Ct quelque soit N_0 est donc:

$$N = N_0 \cdot (1 + E)^{Ct} \quad (2)$$

Au cycle-seuil, l'intensité de la fluorescence est la même pour tous les puits. Donc, au cycle-seuil, le nombre de copies est identique quelle que soit la quantité initiale de matrice.

Ainsi, pour deux nombres de molécules initiaux différents, N_1 et N_2 , on peut écrire :

$$N_1 \cdot (1 + E)^{Ct_1} = N_2 \cdot (1 + E)^{Ct_2}$$

$$\text{soit :} \quad N_1/N_2 = (1 + E)^{Ct_2} / (1 + E)^{Ct_1}$$

$$\text{ou encore:} \quad N_1/N_2 = (1+E)^{Ct_2-Ct_1}$$

Les réactions de qPCR sont réalisées à partir d'ADNc déposé dans les puits auxquels est rajouté un "mix" contenant les amorces à tester et le SYBR-Green®.

5.3.2. Quantification relative

Elle consiste en la comparaison directe de deux conditions données. Cette approche nécessite la quantification en parallèle pour chaque condition de la quantité d'un gène de référence. Cette référence est parfois délicate à choisir. Il faut en effet que cela soit un gène dont l'expression ne varie pas entre les deux conditions comparées. Dans notre cas, on a choisi l'actine de *Vicia faba* comme référence (Actine).

Les quantités relatives obtenues peuvent ensuite être graphiquement interprétées en réalisant un histogramme en fonction du temps.

Les résultats sont accompagnés d'une courbe de fusion permettant de vérifier qu'un gène unique est amplifié ainsi que d'une courbe d'amplification représentant la fluorescence donc indirectement l'évolution de la quantité de transcrits en fonction du nombre de cycles.

5.2.3. Techniques des $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$

$$R = N'_1 / N'_2 = 2^{-[(Ct_{\text{gène1}} - Ct_{\text{ref1}}) - (Ct_{\text{gène2}} - Ct_{\text{ref2}})]}$$

Où

- * R est la quantité relative de transcrits
- * N'_1 est la quantité normalisée d'ADNc du gène d'intérêt dans la condition 1
- * N'_2 est la quantité normalisée d'ADNc du gène d'intérêt dans la condition 2
- * $Ct_{\text{gène1}}$ est le Ct obtenu lors de l'amplification du gène d'intérêt dans la condition 1
- * $Ct_{\text{gène2}}$ est le Ct obtenu lors de l'amplification du gène d'intérêt dans la condition 2
- * Ct_{ref1} est le Ct obtenu lors de l'amplification du gène de référence dans la condition 1
- * Ct_{ref2} est le Ct obtenu lors de l'amplification du gène de référence dans la condition 2

RESULTATS

CHAPITRE 3 :

**Exposition de *Vicia faba* à la
sulcotrione : un pesticide qui induit la
généotoxicité**

Exposition de *Vicia faba* à la sulcotrione : un pesticide qui induit la génotoxicité

[Chaima STA, Gérard LEDOIGT, Ezzeddine FERJANI, Pascale GOUPIL.

Pesticide Biochemistry and Physiology 103 (2012) 9–14]

Contexte

Aucun consensus de l'impact de la sulcotrione, herbicide tricétonique récent, sur le pouvoir de compromettre l'intégrité physique ou fonctionnelle du génome n'a été décrite en littérature. Dans cette étude, l'objectif était d'évaluer la génotoxicité de cet herbicide chez *Vicia faba* soumis à des conditions de culture hydroponique. Les plantules de fèves ont été traitées pendant 45 heures à différentes concentrations de sulcotrione 10^{-5} M, 10^{-4} M et $2 \cdot 10^{-4}$ M en les comparant avec un témoin positif traité par l'hydrazide maléique connu pour sa capacité d'induire des micronoyaux chez *Vicia faba*.

Résultats

La réponse génomique cellulaire de *Vicia faba* a été accompagnée de cytotoxicité. En effet, le traitement de racines de *V. faba* par la sulcotrione montre, très distinctement, un changement de la coloration de celle-ci au fur et à mesure de l'augmentation de la dose, elles deviennent de plus en plus noirâtres. En parallèle, d'autres modifications touchent la partie aérienne, un blanchiment des feuilles qui se traduit par une réduction en chlorophylle et une perte de caroténoïdes liées à la fonction herbicide de la molécule.

La génotoxicité de cet herbicide sur les cellules méristématiques de *V. faba* a été détecté à l'aide du test de micronoyaux. La sulcotrione induit une activité génotoxique (formation des micronoyaux) même à la plus faible concentration, 10^{-5} M. Une diminution de l'index mitotique est observée lorsque la concentration de sulcotrione est augmentée. L'apparition d'anomalies chromosomiques est observée au cours de la mitose. Les anomalies chromosomiques sont significativement et principalement observées pour la plus faible concentration de sulcotrione (10^{-5} M) et sont réduites pour des concentrations plus élevées.

Conclusions

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude montre que la sulcotrione apparaît comme un pesticide montrant une activité génotoxique. Ces travaux sont les premiers à mettre en évidence un effet génotoxique de cet herbicide, caractérisé par l'apparition de micronoyaux et d'anomalies chromosomiques au cours de la mitose. Nos résultats corroborent la formation des micronoyaux et des aberrations chromosomiques documentée dans des cellules animales induites par l'exposition à des agents génotoxiques.

Ces travaux montrent aussi un effet paradoxal entre la formation des micronoyaux et l'induction des anomalies chromosomiques. Précédemment, (Souguir *et al.*, 2008) il avait été montrée une filiation entre l'apparition de certaines anomalies chromosomiques et la formation de micronoyaux, dans cette étude, il est montré que ces apparitions peuvent ne pas être corrélées.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Pesticide Biochemistry and Physiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pestExposure of *Vicia faba* to sulcotrione pesticide induced genotoxicityChaïma Sta^{a,b}, Gérard Ledoigt^{a,*}, Ezzeddine Ferjani^b, Pascale Goupil^a^a Clermont Université, Université Blaise Pascal, LMR 547 IMAF, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, Campus Universitaire des Gèzeaux, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France^b Laboratoire de Physiologie et Génétique des Plantes à Intérêt Agronomique, Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage, 7021 Jarzouna, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 July 2011

Accepted 10 February 2012

Available online 22 February 2012

Keywords:

Chromosomal aberrations

Genotoxicity

Herbicide

Micronuclei

Root tips

Sulcotrione

ABSTRACT

Potential genotoxicity of sulcotrione 2-(2-chloro-4-(methylsulfonyl)benzoyl)-1,3-cyclohexanedione, a selective triketone herbicide was evaluated on *Vicia faba* seedlings in hydroponic culture conditions. Sulcotrione (10^{-5} , 10^{-4} and 2×10^{-4} M) treatments for 45 h, caused a dose dependent increase in micronuclei frequencies in root meristematic cells. Cytological analysis of root tips cells showed aneugenic effects of the sulcotrione on the plant root meristems. Sulcotrione induced chromosomal alterations at the lowest concentration used (10^{-5} M) when incubated for 42 h, indicating the potent mutagenic effect of this element. This is the first report for the genotoxicity of such a sulcotrione herbicide.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Sulcotrione, chemically defined as 2-(2-chloro-(4-methylsulfonyl)benzoyl)-1,3-cyclohexanedione (Fig. 1) is a recent triketone herbicide used to control a wide range of grasses and broad leaf weeds in corn crop yields and is proposed as an atrazine substitute. In target plant species, the action of this herbicide (Fig. 1) consists in the inhibition of the enzyme 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (p-HPPD) [1,2] leading to strong bleaching effects accompanied by a decrease in chlorophyll and carotenoid levels as well as by a massive accumulation of phytoene [3,4], necrosis and death of sensitive plants [5]. Sulcotrione is an herbicide applied at a rate of 450 g ha^{-1} at maize post-emergence. It is absorbed by the leaves and also by the roots [6,7]. Triketones herbicides inhibit the chain of photosynthetic electron transfer that is blocking a vital mechanism of energy production within the plant [8]. The application of these active ingredients should be at an early stage of development of dicotyledonous targeted to be fully effective and lead to their removal. The triketones act by foliar and root channels and have an action antigerminative to control weeds after treatment.

Cellular metabolism of sulcotrione produces CMBA (2-chloro-4-methylsulfonylbenzoic acid) in plants and hydroxysulcotrione in mammals. Sulcotrione is persistent for a short time but mobile [6,7,9]. The photodegradation of sulcotrione leads to a stable toxic

intermediate product that is prevented by using grape natural products [10–14].

Extensive use of herbicides in agriculture and potential carcinogenicity strongly emphasize the need to extend the genotoxic evaluation of these compounds by using different assays. Mitotic root meristems of *Vicia faba* have been pioneer cytogenetic materials for genotoxicity studies of physical and chemical agents since the early 1930s. It has a low chromosome number ($2n = 12$), making it suitable for cytogenetic studies. The formation of micronuclei (MCN) in root tips has been widely described and used as a bioassay for the evaluation of *in vivo* mutagenic effects of environmental pollutants on plants and animals [15–17]. The increased frequency of micronuclei was observed in many aquatic organisms exposed to various pollutants and indifferent cell types. Among biomarkers of exposure measured in animals, frequency of micronuclei was the one best correlated with the pollutant load in tissue. Several authors [18] concluded on the ability of this tool to reveal chronic contamination by persistent genotoxic agents in water and/or sediment at low concentrations.

Micronuclei can be composed of small chromosome fragments resulting from chromosome breaks caused by clastogenic activity. The failure of entire chromosomes to migrate during anaphase as a result of the aneugenic effects of genotoxic agents also can lead to micronucleus formation [16,18–21].

In this study, we first reported the potentially genotoxic effects of sulcotrione for meristematic root cells of a Fabaceae species, *V. faba*. Cytological analysis of *V. faba* meristematic root cells showed the potential aneugenic effects of the pesticide on plant chromosomes.

Abbreviations: MCN, micronucleus; MH, maleic hydrazide; MI, mitotic index.

* Corresponding author. Fax: +33 473407942.

E-mail address: gerard.ledoigt@univ-bpclermont.fr (G. Ledoigt).0048-3575/\$ - see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.pestbp.2012.02.002

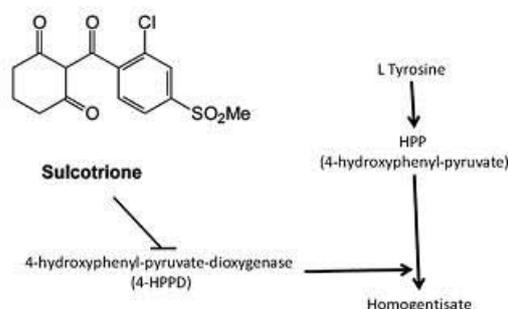


Fig. 1. Molecular structure of sulcotrione and its physiological herbicide effect on HPPD.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and chemicals

Sulcotrione [2-(2-Chloro-4-(methylsulfonyl) benzoyl)-1, 3-cyclohexanedione], 98.7%, Mm 328.77) was purchased from Riedel de Haën (Pestanal[®], Saint-Quentin Fallavier, France).

Seeds of *V. faba* var. Aguadulce were surface sterilized with 10% sodium hypochloride, rinsed several times with distilled water and placed on moistened paper at 25 °C for 4–5 days, allowing them to germinate and transferred to a hydroponic support in the following nutrient solution (pH 7, 3.9 mM Ca(NO₃)₂, 6.5 mM KNO₃, 2 mM MgSO₄, 0.9 mM KH₂PO₄ plus micro-nutrients: 90 μM Fe-ethylene diamine tetra-acetic acid, 2.7 μM MnSO₄, 0.8 μM ZnSO₄, 4.5 μM H₃BO₃, 4 μM CuSO₄ and 2.0 μM Mo₇O₂₄(NH₄)₆) as described by Souguir et al. [18]. Culture takes place in air-conditioned room under controlled conditions: 16 h light/8 h darkness (Mazdafluor Prestiflux) at a temperature 25/20 °C and a relative humidity of 65% (±5%).

2.2. Plant treatments

Once roots had reached a length of 2–3 cm, additional concentrations of sulcotrione (10⁻⁵–2 × 10⁻⁴ M) were added to the hydroponic solution for 45 h at 25 °C with a light/dark photoperiod of 16:8 h. All tests were repeated six times, using a negative control (SNS, containing no additional sulcotrione), and nutrient solution containing 4 × 10⁻³ M maleic hydrazide (MH) as a positive control. MH is a herbicide known to be a mutagenic and clastogenic agent [22]. Maleic hydrazide is chemically defined as 1,2-dihydro-3,6-pyridazinedione, a uracil isomer, and a herbicide used in agriculture. It is known for its ability to induce micronuclei and chromosomal aberrations in *V. faba* [22].

V. faba root tip micronucleus test is one of the most employed plant genotoxicity assays, and has been used on various types of contaminated materials. A study of the effect of inorganic pollutants, such as cadmium, on bean roots in hydroponic culture, showed a highly significant difference in the mitotic index ($P < 0.001$) at 48 h of treatment [23], therefore we have chosen a similar period of treatment with pesticide. Elsewhere, 48 h exposure is more rapid and practical and was recommended for the standardization of this test [24].

2.3. Microscope observations

Root tips (meristem zones) were cut and placed overnight in the dark in the Carnoy fixation solution containing ethanol and glacial acetic acid (3:1) at 4 °C, and then stored in 70% ethanol. Root tips

were rinsed with distilled water and hydrolyzed with 1 N HCl for 10 min as described by Souguir et al. [18]. The root cap was removed before squashing root tissues, and samples were stained with orcein. The slides were examined under Zeiss microscope. At least three slides were stained per replica and at least 1000 cells were scored from each slide. Therefore, the analysis was conducted on an average of 9000 cells per treatment. Micronucleus frequency was calculated from the number of micronuclei scored divided by the total cells scored, and expressed in terms of Micronuclei/1000 cells. The mitotic index (MI) was determined by counting the number of mitotic cells among the total amount of scored cells (~3000) per root. Mitotic index (MI) and micronuclei (MCN) as well as aberrant mitosis frequencies were measured on the same slide.

2.4. Pigment analyses

Leaves were immersed in 80% acetone and then placed in the dark and cold. After 24 h, the sample was crushed and then filtered through gauze. The residue was taken up in acetone 80%. The filtrate was centrifuged for 5 min at 3000 rpm speed. Pellets were taken up in 80% acetone solution till removing pigments. Pigment contents then were measured by absorbance at 450, 645 and 663 nm. Concentrations of chlorophylls a and b and carotenoids were determined using equations of Mac Kinney [25] and Arnon [26]. Results were expressed as mg/g fresh weight (FW).

2.5. Statistical analysis

All experiments were repeated six times. Before performing statistical analyses, data were checked for normality and homogeneity of variance, and were square root transformed [27], with the addition of 0.5 to all data in order to avoid zeros. Statistical analyses were performed using SYSTAT 11 software for Windows with a significance level of alpha = 0.05. The Mitotic index (MI) and micronuclei (MCN) were compared using one-way ANOVA and the Dunnett multiple comparison procedure, control against treatments (10⁻⁵, 10⁻⁴ and 2 × 10⁻⁴ M sulcotrione and HM).

3. Results

Sulcotrione treatment of *V. faba* roots for 45 h, showed root discoloration with increased doses that became darker with tannin increasing from 10⁻⁵ to 2 × 10⁻⁴ M sulcotrione. Different concentrations of sulcotrione (10⁻⁵–2 × 10⁻⁴ M), have reduced chlorophyll and carotenoid contents in plant leaves (Fig. 2).

Several usual pesticides (insecticides, fungicides and herbicides) were previously assayed for clastogenic and physiological activity using *V. faba* as an eukaryotic, whole-organism, test system [28]. In order to assess the genotoxic effects of sulcotrione, different concentrations were applied for a transient period of 45 h in hydroponic cultures. Mitotic index was decreasing along with sulcotrione concentration increase (Fig. 3A). Frequencies of cells with MCN in meristematic root tips plants are presented in Fig. 3B. The difference in the mean values among treatment groups are greater than would be expected by chance and there is a statistically significant difference for mitotic index ($F = 114.78$, $P < 0.001$) and for micronucleus frequency ($F = 45.150$, $P < 0.001$). Moreover multiple comparisons versus control group (Dunnett's method) shows significant differences ($P < 0.05$) between control and the four treatments.

Low micronucleus frequencies were detected in root tips of control plants. However, as expected, maleic hydrazide dramatically increased the frequency of micronuclei in root meristems as compared to control plants, showing that this herbicidal molecule can be used as a positive control for genotoxicity studies. Sulcotrione significantly enhanced the frequency of micronucleus formation in the root tips of *V. faba*.

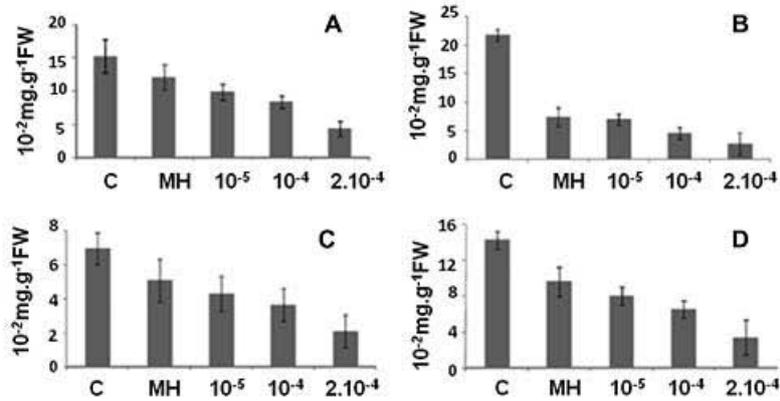


Fig. 2. Dose effect of sulcotrione (10^{-5} , 10^{-4} and 2×10^{-4} M) for 45 h at 25 °C, on pigment contents in *Vidia faba* leaves. A: Chlorophyll a contents. B: Chlorophyll b contents. C: Carotenoid contents. D: whole chlorophyll pigment contents. Values are the means of six replicates. Bars indicate SD. (c: control, MH: maleic hydrazide; 10^{-5} , 10^{-4} and 2×10^{-4} M: sulcotrione concentrations).

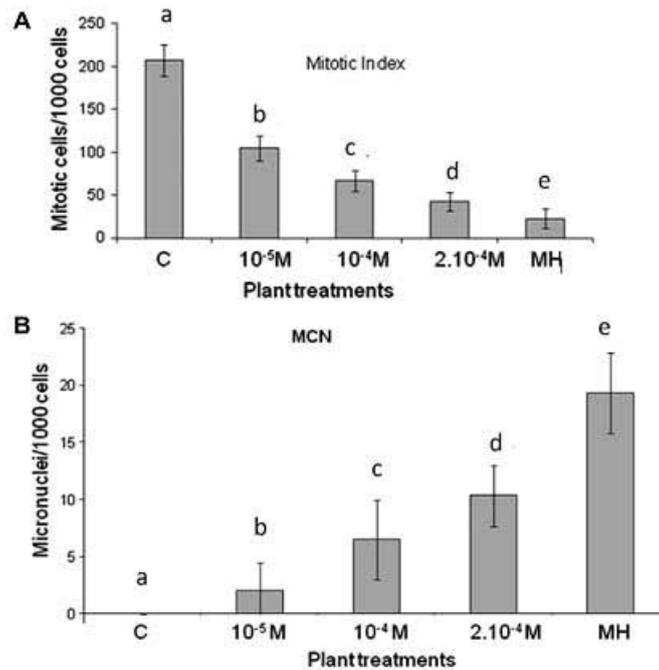


Fig. 3. Dose effect of sulcotrione on micronucleus (MCN) induction in *Vidia faba* root meristematic cells. A: Mitotic index. B: Micronuclei. (c: control untreated plants; MH: treatment by 4×10^{-3} M maleic hydrazide; treatment by different concentrations of sulcotrione, 10^{-5} , 10^{-4} and 2×10^{-4} M, for 45 h at 25 °C). Values are the means of six replicates. Bars indicate SD. Multiple comparisons versus control group (Dunnett's method) shows significant differences ($P < 0.05$) between control and the four treatments (a, b, c, d, e, for each study).

Frequency of micronucleus formation was proportional to sulcotrione concentration added to the hydroponic solution. Micronucleus formation begins at 10^{-5} M concentration of sulcotrione. The highest frequency of cells with micronuclei was detected with a 2×10^{-4} M sulcotrione treatment. Micrographies (Fig. 4A) show presence of micronuclei, usually one in a cell, following

2×10^{-4} M sulcotrione treatments. Micronucleus (MCN) test showed that the sulcotrione was significantly genotoxic as compared to the negative control.

During the process of root cell mitosis, sulcotrione treatment allowed to show chromosomal abnormalities, mainly aneuploidies that are especially seen during anaphases (Fig. 4B). When com-

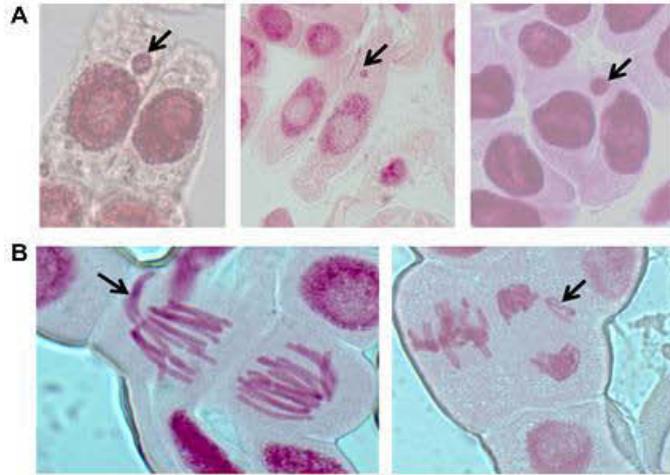


Fig. 4. Microphotographies of mitosis abnormalities induced by 2×10^{-4} M sulcotrione treatment of *Vicia faba* plant meristem roots, for 45 h at 25 °C. A: arrows indicate micronuclei in interphase meristematic cells. B: arrows indicate isolate chromosomes (aneuploidy) during mitotic anaphase of meristematic cells.

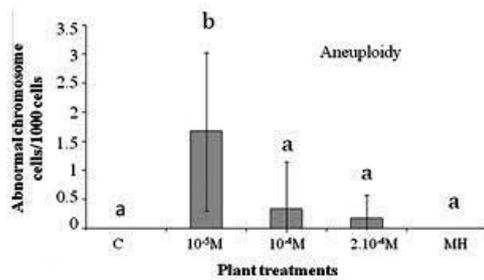


Fig. 5. Aneuploidy induction by sulcotrione treatments in *Vicia faba* root meristematic cells (c: control untreated plants; MH: treatment by 4.10^{-3} M maleic hydrazide; treatment by different concentrations of sulcotrione, 10^{-5} , 10^{-4} and 2×10^{-4} M, for 42 h at 25 °C). Values are the means of six replicas. Bars indicate SD. Multiple comparisons versus control group (Dunnnett's method) shows significant differences ($P < 0.05$) between control and 10^{-5} M sulcotrione treatment but not with the three other samples (a, b).

Table 1
Percent of abnormal cells among mitotic cells.

Treatments	% Abnormal/mitotic cells
Control	0
10^{-5} M sulcotrione	1.603%
10^{-4} M sulcotrione	0.498%
2×10^{-4} M sulcotrione	0.4%
MH	0

pared to control sample, chromosomal abnormalities are significantly and mainly observed for the lowest sulcotrione concentration (10^{-5} M) and are decreased with higher concentrations. ANOVA test displayed a statistically significant difference ($F = 7.173$, $P < 0.001$) and multiple comparisons versus control group (Dunnnett's method) shows significant differences ($P < 0.05$) between 10^{-5} M sulcotrione treatment and the three other treatments, a and b notations (Fig. 5). Maleic hydrazide (10^{-3} M) did

not cause any chromosomal abnormalities. The frequency of chromosomal aberrations is not correlated to mitotic index, at least for the low concentration (10^{-5} M) (Table 1).

4. Discussion

The soil is a key compartment for the fate of pesticides in the environment; a large proportion of pesticides applied in the treatment of cultures comes ground, for direct application and/or leaching of the leaves. Sulcotrione and some other triketones, as mesotrione, have a similar behavior in soils and their long half-life varies from 5 to 65 days [29] which involves hydrolysis and biotransformation processes. The persistence in soil is also related to the adsorption of active ingredients on constituents of soils. It is more important in soils rich in organic [30,31] and pH dependent [32]. Sulcotrione herbicide is applied at 250–450 g ha⁻¹ in maize post-emergence at the five to six leaf development stages. Sulcotrione is indeed moving in the soil until more than a month after application [7,9]. It is absorbed by leaves but also by roots. Water solubility of the product is 165 mg L⁻¹ at 25 °C. Wilson and Foy [31] showed that sulcotrione adsorption was correlated to the soil organic matter content, in which sulcotrione persisted only briefly, but was mobile. Cherrier et al. [7] concluded that sulcotrione had a greater potential to leach than atrazine. The presence of residues in the whole soil profile resulted from the interaction of three factors; retention, solubility and persistence [7].

The lowest amount of sulcotrione, which showed genotoxicity in bean roots, was 10^{-5} M in hydroponic conditions. For a similar culture surface, this herbicide amount represents only five times sulcotrione amounts usually spread per unit area in a field. However, it must take into account the mobility of the product in soil or in hydroponic condition, the presence of biotic and abiotic process in soil, transfer of the pesticide in aerial part of the plant to the ground, but also a possible local higher concentration of the product by sulcotrione solution runoff from different leaves of a plant. In addition, we must take into account the photo-destruction of sulcotrione which decreases the amount of herbicide available, but results in the production of inactive but toxic, stable derivative product [13,14].

Potential toxicity of sulcotrione, selective triketone herbicide, has been earlier [10] assessed using representative environmental microorganisms frequently used in ecotoxicology [12], since this species displays a great sensitivity to pollutants. Based on the dose–response slope values *Allium* and *Vicia*, were shown as efficient test systems for root micronuclei, yet, with a greater sensitivity of *Allium* roots [33]. Previously, nine common pesticides were assayed for clastogenic and physiological activity using *V. faba* as an eukaryotic, whole-organism, test system [28].

In addition to micronuclei (MCN) formation, cytological analysis of root meristems revealed drastic changes in the organization and morphology of chromosomes (Fig. 5). Highest micronucleus value was obtained with the highest sulcotrione concentration used (2×10^{-4} M) (Fig. 3B). In contrast, chromosomal abnormalities decreased with higher sulcotrione concentrations, along with the mitotic index (Figs. 3A and 5). It was previously demonstrated relationships between chromosome abnormalities and MCN [18], but chromosome abnormalities were only seen in mitotic cells and micronuclei in interphase cells. Using another pesticide molecular type, it was shown that treatments with the insecticide dichlorvos on root meristems of *V. faba*, significantly decreased the mitotic activity and increased the frequency of chromosomal aberrations at the metaphase thus demonstrating both clastogenic and mitodepressive effects of DDVP on *V. faba* cells [34]. Using sulcotrione treatments, we have shown that the frequency of chromosomal aberrations is not correlated to mitotic index, at least for the lower concentration (10^{-5} M) (Table 1). The clastogenicity effect of sulcotrione treatment thus is not linked to mitosis inhibition.

Quantitation of DNA breaks was often associated with the detection of micronuclei. Some authors note similar evolution of both types of damage [35–37]; others observed an increased frequency of MCN combined with a decrease or absence of a change in the number of breaks in DNA [38,39]. The differences may be explained by the nature of induced lesions. DNA breaks quickly appear and can be repaired unlike micronuclei that require cell division, correspond to persistent lesions as non-repairable.

Disjunction between aneuploidies and micronucleus formation were described with other types of pesticides. Genotoxicity studies on organosulfite acaricide and dicarboximide fungicide have shown a lack of activity for both compounds in inducing chromosomal aberrations and SCEs. In contrast, both pesticides significantly increased micronucleus frequency [40]. The aneuploidy-inducing activity of alachlor and dichlorvos, two pesticides representing an important source of human exposure to potential carcinogens, has been evaluated in a cytokinesis block micronucleus assay combined with anti-kinetochore staining to detect chromosome loss and *in situ* hybridization with chromosome-specific centromeric probes for the analysis of non-disjunction. The two pesticides differed in their mode of action; alachlor induced both chromosomal aberrations and aneuploidy, while the genotoxic activity of dichlorvos was only related to aneuploidy induction [41]. Another pesticide, rotenone, produced DNA damage and was cytotoxic during all phases of the cell cycle. Its clastogenicity was only limited to exposures made during the G1/S and S phases [42].

Several authors have described the alteration of chromosome numbers by environmental aneuploidy-inducing agents that induce microtubule and kinetochore disorganization in mitotic cells [43,44]. A distinction to be made between micronucleus induction due to chromosomal breakage and that obtained as a result of spindle disturbances. Our data show presence of high frequencies of lagging chromosomes after exposure to the lower concentrations of pesticide. The presence of lagging chromosomes is an indication of anti-microtubule activities of the pesticides tested, as describe for other pesticides [43], but the decrease of aneuploidies quicker than mitotic index decrease as increase of micronuclei is shown, allow to do a distinction of different sulcotrione targets during cell

division (Table 1). Smaller chromosomal breakages would lead to micronucleus increase along with sulcotrione concentrations, then showing a decrease of mitotic index. Our results also corroborate the documented micronucleus formation in animal cells containing chromosomal aberrations induced by exposure to genotoxic agents [16,45].

In conclusion, this is the first report of the genotoxic effect of sulcotrione, a triketone herbicide, on plants, resulting in the appearance of micronuclei and abnormalities of mitosis.

Acknowledgment

This work was supported by a grant from French agency ANR "ECOPHYTO". We thank Céline Sac for her skillful assistance and Dr. Boris Fumanal for his helpful comments on the manuscript.

References

- [1] A. Schulz, O. Ort, P. Beyer, H. Kleinig, SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1, 3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, FEBS Lett. 318 (1993) 162–166.
- [2] J. Secor, Inhibition of banyardgass 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by sulcotrione, Plant Physiol. 106 (1994) 1429–1433.
- [3] T. Soeda, T. Uchida, Inhibition of pigment synthesis by 1, 3-dimethyl-4-(2, 4-dichlorobenzoyl)-5-hydroxypyrazole, norflurazon, and new herbicidal compounds in radish and flatsedge plants, Pestic. Biochem. Physiol. 29 (1987) 35–42.
- [4] D.J. Mayonado, K.K. Hatzios, D.M. Orcutt, H.P. Wilson, Evaluation of the mechanism of action of the bleaching herbicide SC-0051 by HPLC analysis, Pestic. Biochem. Physiol. 35 (1989) 138–145.
- [5] R.A. Wichert, J.K. Townson, D.W. Bartlett, G.A. Foxon, Technical review of mesotrione, a new maize herbicide, In Proc. Brighton Crop Prot. Conference. Weeds, BCPC, Farnham, Surrey, UK, Vols 1–3, 1999, pp. 105–110.
- [6] R. Cherrier, C. Perrin-Ganier, M. Schiavon, Degradation of sulcotrione in a brown soil amended with various organic matters, Agronomie 24 (2004) 29–33.
- [7] R. Cherrier, A. Boivin, C. Perrin-Ganier, M. Schiavon, Sulcotrione versus atrazine transport and degradation in soil columns, Pest Manage. Sci. 61 (2005) 899–904.
- [8] J.S. Kim, T.J. Kim, O.K. Kwon, K.Y. Cho, Mechanism of action of sulcotrione, a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor, in developed plant tissue, Photosynthetica 40 (2002) 541–545.
- [9] H. Chaabane, J.F. Cooper, L. Azouzi, C.M. Coste, Influence of soil properties on the adsorption-desorption of sulcotrione and its hydrolysis metabolites on various soils, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 4091–4095.
- [10] A. Ter Halle, D. Drncova, C. Richard, Phototransformation of the herbicide sulcotrione on maize cuticular wax, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 2989–2995.
- [11] H. Chaabane, E. Vulliet, F. Joux, F. Lantoin, P. Conan, J.F. Cooper, C.M. Coste, Photodegradation of sulcotrione in various aquatic environments and toxicity of its photoproducts for some marine micro-organisms, Water Res. 41 (2007) 1781–1789.
- [12] J.L. Bonnet, F. Bonnemoy, M. Dusser, J. Bohatier, Toxicity assessment of the herbicides sulcotrione and mesotrione toward two reference environmental microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 55 (2008) 576–583.
- [13] B. Eyheraguibel, C. Richard, G. Ledoit, A. Ter Halle, Photoprotection by plant extracts: a new ecological means to reduce pesticide photodegradation, J. Agric. Food Chem. 58 (2010) 9692–9696.
- [14] B. Eyheraguibel, C. Richard, G. Ledoit, A. Ter Halle, Inhibition of Herbicide Photodegradation by Plant Products, J. Agric. Food Chem. 59 (2011) 4868–4873.
- [15] W.F. Grant, E.T. Owens, Chromosome aberration assays in *Gepis* for the study of environmental mutagens, Mutat. Res. 410 (1998) 291–307.
- [16] G. Krishna, M. Hayashi, *In vitro* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation, Mutat. Res. 455 (2000) 155–166.
- [17] S. Türkoglu, Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L., Mutat. Res. 626 (2007) 4–14.
- [18] D. Souguir, E. Ferjani, G. Ledoit, P. Goupil, Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper-induced genotoxicity, Protoplasma 233 (2008) 203–207.
- [19] T. Cava, S. Ergene-Gözükara, Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nuclear organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Dreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent, Mutat. Res. 538 (2003) 81–91.
- [20] M.T. Llorente, A. Martos, A. Castano, Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp, Ecotoxicology 11 (2002) 27–34.
- [21] T. Cava, S. Ergene-Gözükara, Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining, Environ. Toxicol. Pharmacol. 19 (2005) 107–111.
- [22] L. Marcano, M.H. Carruyo, A. Del Campa, A. Montiel, Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium Cepa* L., Environ. Res. 94 (2004) 221–226.

- [23] P. Goupil, D. Souguir, E. Ferjani, G. Lodoigt, Sequential effects of cadmium on genotoxicity and lipoperoxidation in *Vicia faba* roots, *Ecotoxicology* 20 (2011) 329–336.
- [24] A.S. Faltère, A. Dhyèvre, J.F. Féraud, S. Cotelle, Improvement of Vicia-micronucleus test for assessment of soil quality: A proposal for international standardization, *Chemosphere* 85 (2011) 1624–1629.
- [25] G. Mac Kinney, Absorption of light by chlorophyll solution, *J. Biol. Chem.* 140 (1941) 315–322.
- [26] D.J. Arnon, Copper enzymes in isolated chloroplasts, *Plant. Physiol.* 24 (1949) 1–15.
- [27] R.R. Sokal, F.J. Rohlf, *Biometry: the principles and practice of statistics*, in: *Biological Research*, 2nd ed., W. H. Freeman and Co, New York, 1981.
- [28] D.J. de Kergommeaux, W.F. Grant, S.S. Sandhu, Clastogenic and physiological response of chromosomes to nine pesticides in the *Vicia faba* in vivo root tip assay system, *Mutat. Res.* 124 (1983) 69–84.
- [29] H. Chabaane, E. Vulliet, R. Calvayrac, C.M. Coste, J.F. Cooper, Behaviour of sulcotriene and mesotriene in two soils, *Pest Manag. Sci.* 64 (2008) 86–93.
- [30] J. Rouchaux, O. Neus, H. Helen, R. Bulcke, Mobility and adsorption of the triketone herbicide mesotriene in the soil of corn crops, *Toxicol. Environ. Chem.* 79 (2001) 211–222.
- [31] J.S. Wilson, C.L. Foy, Influence of Various Soil Properties on the Adsorption and Desorption of ICA-0051 in Five Soils, *Weed Technol.* 6 (1992) 583–586.
- [32] J. Dyson, S. Beulke, C. Brown, M. Lane, Adsorption and degradation of the weak acid mesotriene in soil and environmental fate implications, *J. Environ. Quality* 31 (2002) 613–618.
- [33] T.H. Ma, Z. Xu, C. Xu, H. McConnell, E.V. Rabago, G.A. Arreola, H. Zhang, The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants, *Mutat. Res.* 334 (1995) 185–195[33].
- [34] R. Kontek, R. Osiecka, B. Kontek, Clastogenic and mitodepressive effects of the insecticide dichlorvos on root meristems of *Vicia faba*, *J. Appl. Genet.* 48 (2007) 359–361.
- [35] C. Russo, L. Rocca, A.M. Morescachi, V. Stingo, Assessment of environmental stress by micronucleus, test and the comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 57 (2004) 168–174.
- [36] G.J. Klobucar, M. Pavlica, R. Erben, D. Papes, Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments, *Aquatic Toxicol.* 64 (2003) 15–23.
- [37] W.J.H.M. Siu, J. Cao, R.W. Jack, R.S.S. Wu, B.J. Richardson, L. Xu, P.K.S. Lam, Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*), *Aquatic Toxicol.* 66 (2004) 381–392.
- [38] V. Bombail, D. Aw, E. Gordon, J. Batty, Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland, *Chemosphere* 44 (2001) 383–392.
- [39] A. Hartmann, A. Elhajouji, E. Kiskinis, F. Poetter, H.J. Martus, A. Ejjalman, W. Frieauff, W. Suter, Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test, *Food Chem. Toxicol.* 39 (2001) 843–858.
- [40] P. Gadeva, B. Dimitrov, Genotoxic effects of the pesticides Rubigan, Omite and Rovral in root-meristem cells of *Crepis capillaris* L., *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 652 (2008) 191–197.
- [41] M. Mattiuzzo, M. Fiore, R. Ricordy, F. Degrassi, Aneuploidy-inducing capacity of two widely used pesticides, *Carcinog.* 27 (2006) 2511–2518.
- [42] P.D. de Lima, E.S. Yamada, E.T. da Costa, C do O. Pessoa, S.J.H. Rabenhorst, M de O. Bahia, P.C. Cardoso, R.A. Santos, M.de A. Cardoso Smith, R.R. Burbano, Genotoxic effects of rotenone on cultured lymphocytes, *Genet. Mol. Res.* 4 (2005) 822–831.
- [43] G. Voutsinas, F.E. Zarani, A. Kappas, The effect of environmental aneuploidy-inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum vulgare*, *Cell Biol. Int.* 21 (1997) 411–418.
- [44] A.L. Seoane, F.N. Dulout, Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay, *Mutat. Res.* 490 (2001) 99–106.
- [45] G. Iarmarcovai, A. Botta, T. Orsière, Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy, *Toxicol. Lett.* 166 (2006) 1–10.

CHAPITRE 4 :

**Les réponses cellulaires de *Vicia faba* à
la sulcotrione et l'extrait de marc de
raisin**

Les réponses cellulaires de *Vicia faba* à la sulcotrione et à l'extrait de marc de raisin

(Chaima STA, Eric GOUJON, Gérard LEDOIGT, Ezzeddine FERJANI, Pascale GOUPIL. Cet article est soumis au journal *Plant physiology and Biochemistry*)

Contexte

Si la sulcotrione a été identifiée comme produit génotoxique, il est important de diminuer les quantités utilisées. Il a été montré que l'addition d'extrait de raisin diminue la photodégradation de la sulcotrione (Eyheraguibel *et al.*, 2010), augmentant donc sa longévité et permettant ainsi de diminuer la dose de matière active répandue. Dans cette étude nous avons procédé à une utilisation d'un extrait de marc de raisin qui joue le rôle d'écran. Nous avons quantifiés des transcrits liés aux résultats de l'expression des différents gènes habituellement associés au stress cellulaire ainsi que la mort cellulaire suite à l'utilisation des mélanges herbicide-extrait végétal.

Résultats

Vicia faba montre une mort cellulaire en réponse à l'infiltration foliaire de l'extrait végétal, du produit actif, du produit formulé et du mélange herbicide-extrait végétal. La mort cellulaire a été déclenchée par l'extrait de marc de raisin, elle est plus importante pour les herbicides, notamment pour le produit formulé. Le taux de mortalité est plus élevé et la cinétique est plus rapide pour les mélanges à base de sulcotrione, soit avec adjuvant (Mikado[®]) soit avec l'extrait de raisin..

L'étude de l'expression des gènes impliqués dans le stress oxydant marqueur de mort cellulaire a montré un accroissement de la quantité de transcrits de certains gènes., Dans les chloroplastes des feuilles traitées par la sulcotrione, une augmentation des transcrits superoxyde dismutase cuivre-zinc (Cu/Zn-SOD CH) dépendant de la concentration a été montrée. Cette augmentation est observée pour l'extrait végétal, la sulcotrione seule et le mélange. L'extrait de marc de raisin augmente l'effet de la sulcotrione mais diminue l'induction des transcrits pour le cas du Mikado[®]. Une augmentation de l'expression des

transcrits cytosoliques de SOD, pour toutes les concentrations ainsi que pour l'herbicide actif ou formulé a aussi été observée. Une augmentation des transcrits de l'ascorbate peroxydase très importante pour la première concentration suivi d'une augmentation plus légère pour les deux autres concentrations. La catalase montre aussi une augmentation des transcrits au moins pour les premières et deuxièmes concentrations de produits utilisés. L'ajout de marc de raisin à l'herbicide actif ou formulé renforce l'accumulation des transcrits d'ubiquitin et d'HSP70 pour toutes les concentrations.

Conclusions

Les résultats montrent que le pesticide ainsi que l'extrait végétal seul induisent la mort cellulaire. Le mélange de pesticide et de marc de raisin suggère un effet de potentialisation des effets. Le mélange déclenche le stress oxydant entraînant une perturbation du métabolisme cellulaire. Ceci peut être expliqué par le déclenchement de l'expression des gènes spécifiques de protéines associées au stress. L'ajout de l'extrait de marc de raisin aux produits herbicides sulcotrione ou Mikado[®] peut mettre en évidence des effets différents. L'extrait végétal peut augmenter les effets biologiques de la sulcotrione et ceux du Mikado[®] ce qui signifie une synergie des effets moléculaires améliorant l'efficacité de l'herbicide.

***Vicia faba* cell responses to sulcotrione pesticide and grape extract.**

C. Sta^{1,2}, E. Goujon¹, G. Ledoigt¹, E. Ferjani², P. Goupil¹

¹ Clermont Université, Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF, BP 10448, F-63000

CLERMONT-FERRAND, Campus Universitaire des Cézeaux, 24 Avenue des Landais,

63177 Aubière cedex, France

² Laboratoire de Physiologie et Génétique des Plantes à Intérêt Agronomique, Faculté des

Sciences de Bizerte, Université de Carthage, 7021 Jarzouna, Tunisie

ABSTRACT: Potential cell toxicity of sulcotrione 2-(2-Chloro-4-(methylsulfonyl)benzoyl)-1,3 cyclohexanedione), a selective triketonic herbicide was evaluated on *Vicia faba*. Sulcotrione, trade mark Mikado[®], grape marc and mixtures of sulcotrione or Mikado[®] and grape marc induce cell death. Addition of grape marc to either sulcotrione or Mikado[®] enhanced cell death, with a greater effect with Mikado[®] instead of active molecule alone. Addition of grape extracts to herbicides, either sulcotrione or Mikado[®], had different effects and results in different expression of genes usually associated to cell stress. Mixture of grape marc and herbicides enhanced transcript accumulation for ubiquitin, HSP 70 and cytosolic SOD. Grape marc mixtures markedly did not change effects of sulcotrione and Mikado[®] for ascorbate peroxidase gene expression. Therefore, we provide evidence that sulcotrione or Mikado[®] and grape marc, then also mixtures of them, trigger cell death and specific gene expressions. Therefore, cocktails of products with sulcotrione, such as adjuvant in commercial product, can modify biological features of pesticide. Moreover, grape marc differently

enhances biological effects of sulcotrione and Mikado[®]. It was therefore identified synergistic joint effects between pesticide and a grape waste product.

Keywords: cell death, gene expression, grape extract, sulcotrione, *Vicia faba*

INTRODUCTION

Conventional pest management has been significantly influenced by bioactive natural products that are used directly, or in a derived form, as pesticides (Dayan et al, 2009). Mikado[®] (Bayer Crop Science) is a systemic foliar-applied post-emergence herbicide mostly used for corn crops in order to control broadleaf weeds and annual grasses (Marques et al., 2012). Mikado[®] is a suspension of sulcotrione (300 g L⁻¹), used at a rate of 1.5–2 L ha⁻¹ in fields. Persistence of pesticides in environment is governed by retention process and biotic and abiotic transformations, hydrolysis and photolysis (Chaabane et al., 2007; Wiszniowski et al., 2009).

Sulcotrione, 2-[2-chloro-(4-methylsulfonyl)benzoyl]-1,3-cyclohexanedione, a triketone herbicide that inhibits 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase enzyme (p-HPPD) leads to a decrease of carotenoid rates in weeds (Fig.1). Plant sulcotrione treatment may cause inhibition of plastoquinone pool essential for carotenoid biosynthesis. Loss of carotenoid and α -tocopherol can result in destroying photosynthetic apparatus leading to accumulation of reactive oxygen species (ROS) (Marques et al., 2012; Wiszniowski et al., 2009). Sulcotrione induced chromosomal alterations, indicating potent mutagen effects of the molecule (Sta et al., 2012).

Recent studies have proved that exposure to sunlight can be one of the most destructive factors for pesticides following the crop treatment that can generate by-products (Wiszniowski et al., 2009; ter Halle et al., 2006 and 2009) in the environment; it can play a significant role in defining the impact of pesticides on both human health and the natural ecosystems (Vulliet et al., 2004; Bonnet et al., 2007 and 2008; Jovic et al., 2013).

It has been patented as a new class of photoprotecting agent (ter Halle et al., 2008) with a previously demonstrated ability to reduce pesticide photodegradation (Eyheraguibel et al., 2010 and 2011). Grape extract was shown to trigger an array of plant defense responses

making this natural compound a potential phytosanitary product with an issue for sustainable agriculture and environmentally friendly practices (Goupil et al., 2012).

Grapes (*Vitis* sp.) are rich in polyphenols, which represent the third most abundant constituent in grape berries, after carbohydrates and fruit acids, and offer many potential health benefits. Anthocyanins belong to a large family of flavonoids extensively widespread in plants and displayed antioxidative capacity (Khanal and Howard, 2009). Association between anthocyanins and oxidative stress can result in anthocyanin ability to increase photoprotection and, hence, to reduce a putative oxidative damage (Steyn et al., 2002; Ross and Kasum, 2002).

The aim of the work was to evaluate effects of sulcotrione and trade mark on plant cell and ability of grape marc to control plant response, in order to know if such treatments trigger process of oxidative stress.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Chemicals

Sulcotrione [2-(2-Chloro-4-(methylsulfonyl) benzoyl)-1, 3-cyclohexanedione), (Riedel de Haën, Pestanal®, Saint-Quentin Fallavier, France) and commercial sulcotrione 300 g L⁻¹ SC (Mikado®; Bayer CropScience) were used. Water was purified through Millipore Milli-Q system (Millipore αQ, resistivity 18 M-cm, DOC < 0.1mg L⁻¹).

Seeds of *Vicia faba* var. Aguadulce were surface sterilized with 10% sodium hypochloride, rinsed several times with distilled water and placed on moistened paper at 25°C for 4 to 5 days, allowing them to germinate and planted in pots filled with commercial substrate (40% black, 30% brown, and 30% blond peat moss, pH 6.1) then put in greenhouse (22 ± 5°C, photoperiod 16 h light/8h dark).

Treatments

Herbicides or/and grape extract were applied as aqueous solutions to foliar tissue either by infiltration or as aerosol spray. Leaf infiltration was carried out on leaf blades using plastic syringe. Routinely, 50 μ l was infiltrated until the solution was spread across a leaf area of 1–1.5 cm². Foliar spray treatments were administered by spraying onto the upper face of three leaves with a fine atomizer (2 ml per leaf). For negative control, leaves were infiltrated or sprayed with ultrapure water. Product concentrations for plant treatments (C1) were 10⁻⁵M for sulcotrione, 2.410⁻³M for Mikado[®], 0.9mg (0.08% anthocyanins) for grape marc. Mixture of grape marc and sulcotrione was 3/1 (w/w). In order to use similar ratios of sulcotrione and grape marc for treatments, mixture made of grape marc and Mikado[®] was 0.9/1 (w/v), since Mikado[®] herbicide is a liquid made of 300 g.L⁻¹ sulcotrione. The C2 and C3 concentrations are 2 and 3 times, respectively, the C1 concentration. Control samples did not receive any products.

Cell Death Assays

Each assay was performed with 10 leaf disks (1 cm in diameter) punched out from each infiltrated area of the same leaf (triplicate on the same leaf). Leaf disks were incubated for 30 min in 0.25 % Evans Blue (Sigma, France) at room temperature on a rotary shaker, rinsed extensively to remove the excess dye and ground in a tissue grind tube with 1 ml 1 % SDS. Leaf extracts were centrifuged for 20 min at 20,000 x g and supernatants were diluted 8-fold with distilled water. The dye was quantified using spectrophotometer by monitoring absorbance at 600 nm.

RNA Isolation and Quantification

Leaf tissues (200 mg) were grounded in liquid nitrogen and RNA extraction was performed using 1 ml Tri-reagent (Euromedex, France) according to manufacturer's instructions. Total

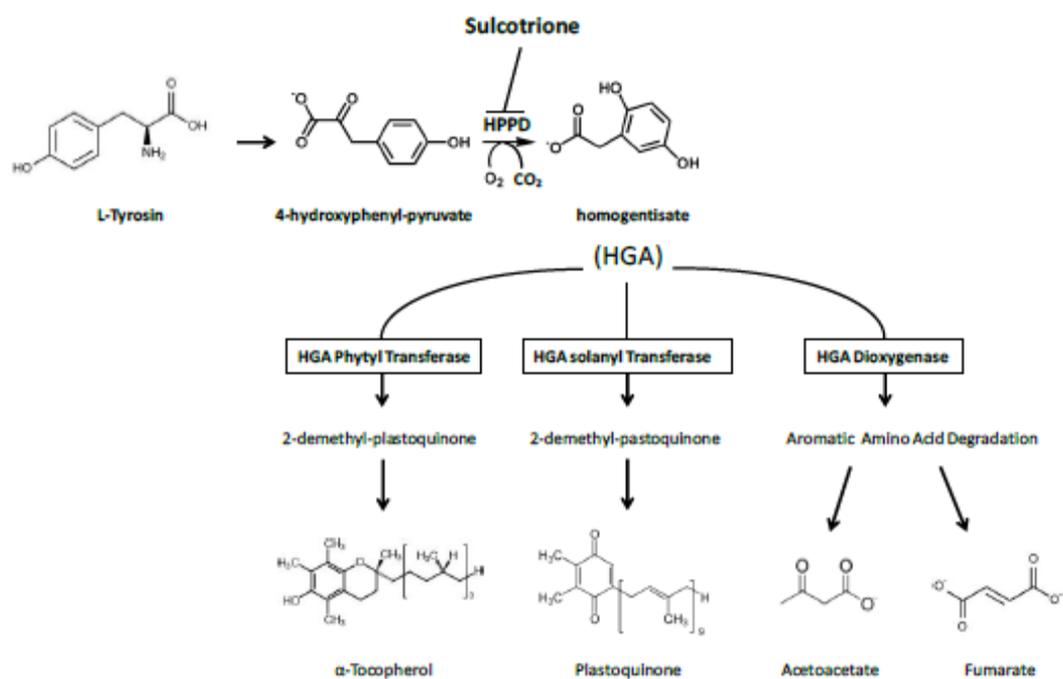


Fig. 1. p-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD, EC1.13.11.27, EC 1.14.2.2) functions in plant metabolism and sulcotrione inhibition.

RNA were cleaned up with 0.5 U DNase I solution (Euromedex, France) containing 20 U RNase inhibitor (Euromedex, France). RNA integrity was analyzed on 1 % agarose gel by observation of ribosomal RNAs. RNA concentrations were measured at 260 nm. Reverse transcription was performed using total RNA and Euroscript Reverse Transcriptase (Eurogentec, France) according to manufacturer's instructions. Quantitative assessment of mRNA levels was performed using an iCycler iQv3 (BIO-RAD). PCR reactions were prepared with qPCR kit Mastermix for SYBR green (Eurogentec, France) according to manufacturer's protocol. cDNA concentration used threshold cycle value (CT) between 15 and 30 cycles. PCR efficiencies were calculated for each gene according to Pfaffl (2001). Accumulation of gene transcripts was calculated using reference transcripts, actin gene, and set relative to control plants (water infiltration). Primer sequences of studied gene are shown in table 1. Two treated plants were pooled for each experiment and results are shown as means of duplicate experiments. Bars represent mean of 3 values \pm standard error (SE).

Data Analysis

All experiments were done in triplicate. Experiments for genotoxicity were repeated at least once in order to establish the reproducibility of results. Pooled data were compared by analysis of variances (ANOVA) of treatments and control. Treatment values were analyzed according to Student t test.

RESULTS

Cell Death Analyses

Sulcotrione pesticide, pure molecule and trade mark (Mikado[®]) induced higher cell death rate than death rate in control leaves. It was also shown to be higher with trade mark product (Fig. 2). Cell death was enhanced when anthocyanin-enriched grape marc was added either to sulcotrione alone (Fig. 2A) or to commercial product (Fig. 2B). Cell death was dependent of

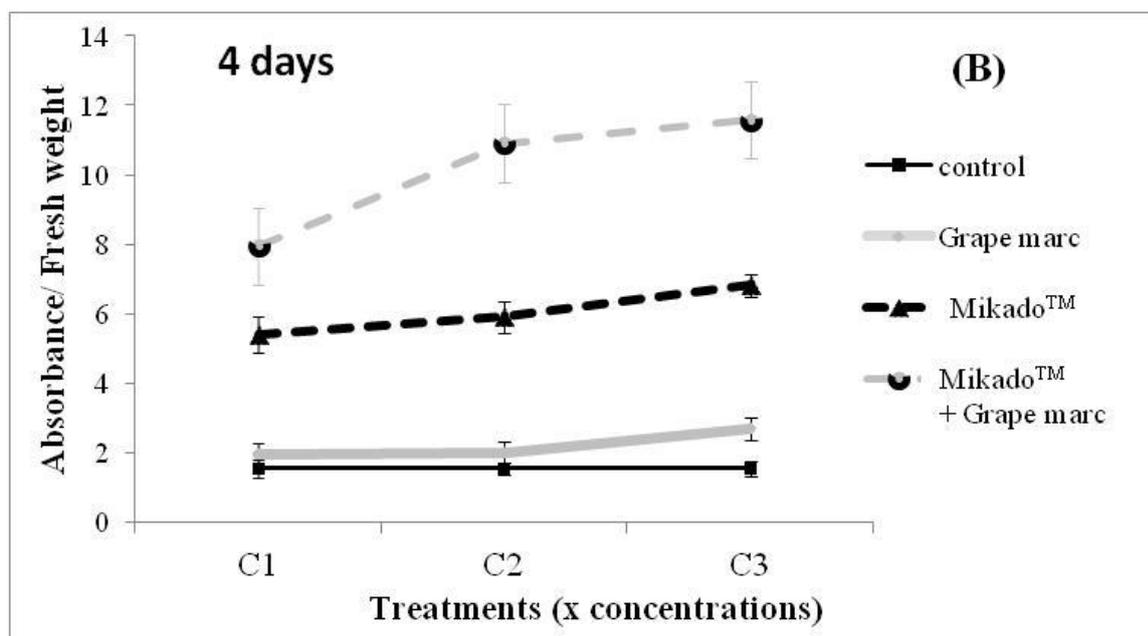
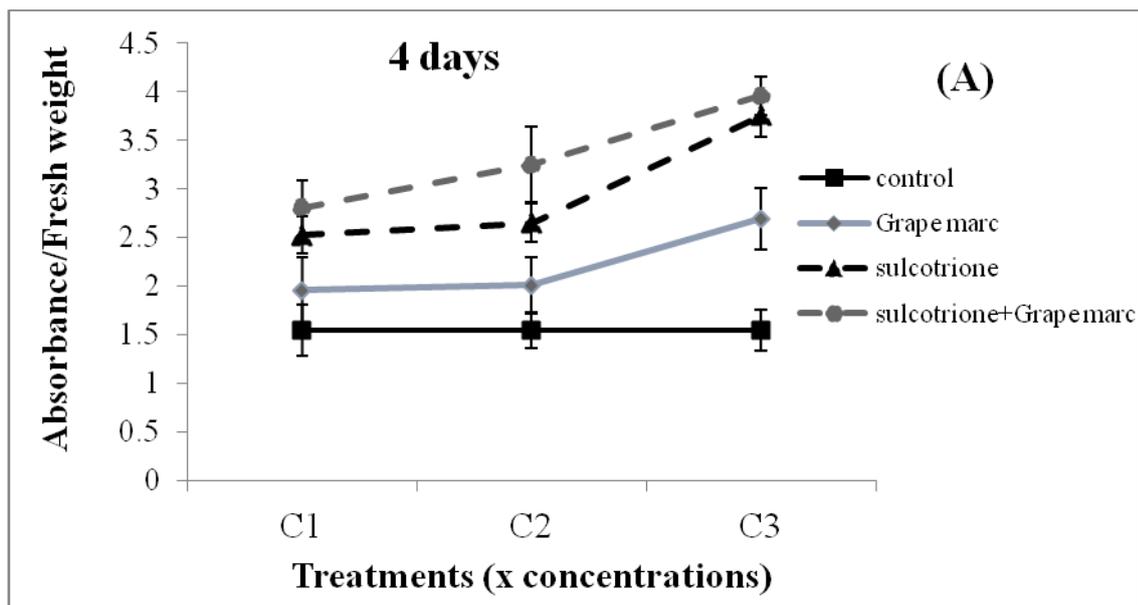


Fig. 2. Cell Death induced after 4 days treatments of *Vicia faba* leaves. **(A)** Treatments with Sulcotrione, grape marc and mixture of both components, compared to *V. faba* control leaves. **(B)** Treatments with Mikado[®], Grape marc and mixture of both components, compared to *V. faba* control leaves. Product concentrations for plant treatment (C1) were 10⁻⁵M for sulcotrione, 2.410⁻³M for Mikado[®], 0.9mg for grape marc. Mixture of grape marc and sulcotrione was 3/1 (w/w). Mixture made of grape marc and Mikado[®] was 0.9/1 (w/v), since Mikado[®] pesticide is a liquid which contained 300 g.L⁻¹ sulcotrione, in order to get a similar ratio for sulcotrione. C2 and C3 are 2 and 3 times C1 concentration, respectively. Control samples did not receive any products. The dye was quantified by monitoring absorbance at 600 nm.

molecule concentration (Fig. 2). Cell death was triggered by application of anthocyanin-enriched grape extract or pesticides (sulcotrione or Mikado[®]), with a cell death higher for pesticides. Mixture of both components then induced a greater cell death, which can be an addition of product toxicities with sulcotrione (Fig. 2A) but enhanced with Mikado[®].

Cell death kinetics was similar for plants treated either with grape extracts or sulcotrione. Add of grape marc to sulcotrione enhanced cell death (Fig. 3A). Mikado[®] treatment displayed quicker cell death kinetics than grape marc treatment alone, but mixture of both still showed quicker and higher kinetics, which mean a synergy of molecular effects (Fig. 3B).

Gene Expressions

Intracellular reactive oxygen species (ROS) accumulations are markers of cell death. Study of gene expression involved within oxidative burst metabolism allowed understanding effects of plant treatments. Product concentrations for plant treatments (C1) were 10^{-5} M for sulcotrione, 2.4×10^{-3} M for Mikado[®], 0.9mg for grape marc. Mixture of grape marc and sulcotrione had a ratio 3/1 (w/w). Mixture made of grape marc and Mikado[®] had a ratio 0.9/1 (w/v). C2 and C3 are 2 and 3 times C1 concentrations, respectively. Sulcotrione treatments showed an increase of chloroplast copper-zinc superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD CH) transcripts in leaves of *Vicia faba* which was concentration-dependent (Fig.4 A). Other treatments, grape marc or Mikado[®] (Fig 4 A and 5A) displayed higher increases of transcripts from the lowest concentrations. Addition of grape extracts to herbicide enhanced sulcotrione effect (Fig.4 A), but decreased induction by Mikado[®] (Fig.5A).

Sulcotrione or Mikado[®] treatments showed increases of cytosol copper-zinc superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD CY) transcripts in leaves of *Vicia faba* which were concentration-dependent (Fig.4B and 5B). These treatments showed increase of ascorbate peroxidase transcripts in *V. faba* leaves since the first concentration, but with a slighter increase for other concentrations (Fig.4C and 5C). They also showed increases of catalase, ubiquitin and HSP70 transcript accumulations in leaves of *V. faba* which were concentration-dependent (Fig.4 and 5, D, E and F respectively).

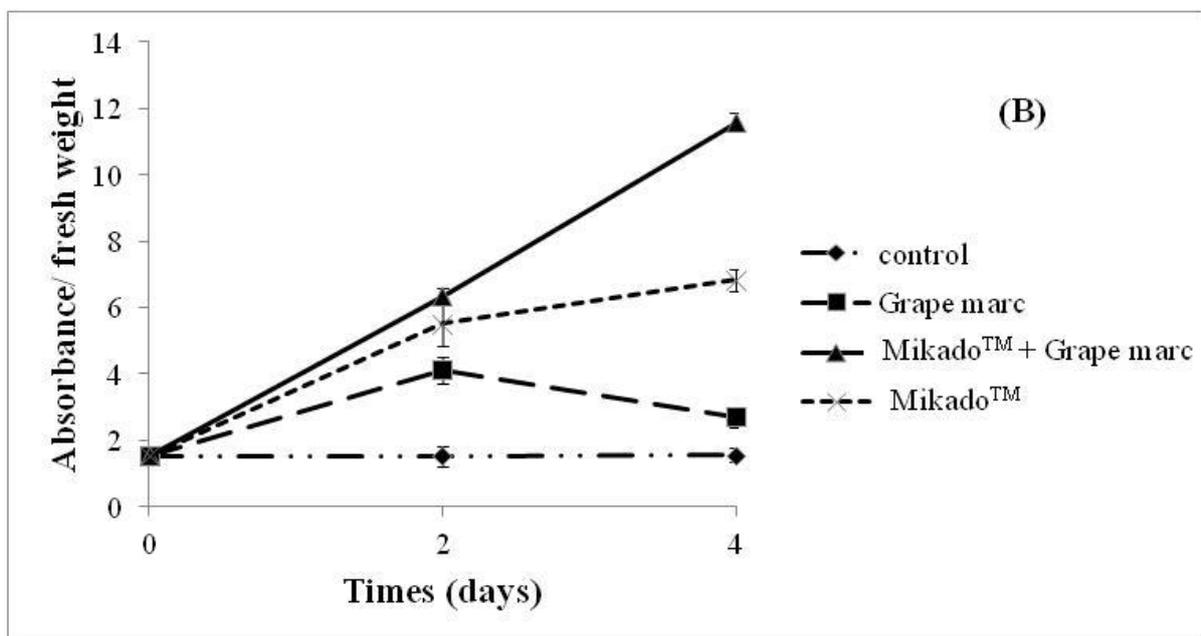
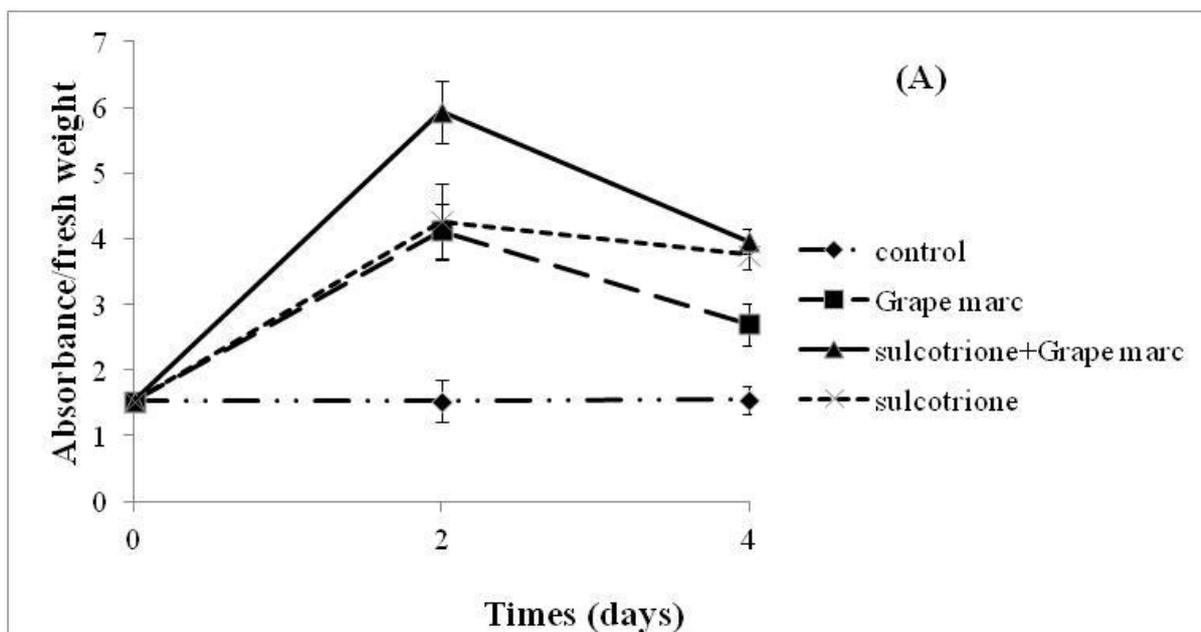


Fig. 3. Cell death kinetics induced by different treatment in leaves. Beans were treated by the highest product concentrations (C3). Absorbances were measured after 2 days and 4 days treatments. **(A)** Treatments with Sulcotrione, grape marc and mixture of both components, compared to *Vicia faba* control leaves. **(B)** Treatments with Mikado[®], Grape marc and mixture of both components, compared to *V. faba* control leaves. The dye was quantified by monitoring absorbance at 600 nm.

Grape marc treatments displayed an increase of transcripts of cytosol copper-zinc superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD CY). Add of grape marc to herbicide enhanced effects of sulcotrione and Mikado[®] for every concentration (Fig. 4 and 5, B). In contrast, grape marc treatment displayed ascorbate peroxidase transcript increases which are concentration dependent (Fig. 4 and 5, C); addition of grape marc to herbicide did not markedly change effects of sulcotrione and Mikado[®] (Fig. 4 and 5, C). Grape marc treatments displayed an increase of catalase transcript accumulation from the lowest concentration (Fig. 4 and 5, D). Addition of grape marc to herbicide enhanced effects of sulcotrione and Mikado[®], at least for the first and second concentrations, but, the third concentration lowered induction by Mikado[®], whereas the effect of sulcotrione still was enhanced (Fig. 4 and 5, D). Addition of grape marc to herbicide also enhanced ubiquitin and HSP70 transcript accumulations with sulcotrione and Mikado[®] for all concentrations (Fig. 4 and 5, E and F respectively).

DISCUSSION

Treatments of *V. faba* leaves with herbicides sulcotrione or Mikado[®] displayed cell death which depended of molecule concentrations and which was greater for the formulated product. Anthocyan-rich grape extract also displayed bean cell death in a concentration dependent manner. Add of grape marc to either sulcotrione or Mikado[®] enhanced cell death, with a greater effect using Mikado[®] instead of active molecule alone. It was then suggested a potentiation effect of grape marc by adjuvant elements of Mikado[®].

Our result indicates that herbicide can trigger oxidative stress resulting in disruption of cell metabolism; it was previously shown that herbicide and formulated products induced accumulation of MDA in roots. It was suggested that sulcotrione may induce cell membrane destruction (Abendroth et al., 2006).

Commercial product Mikado[®] showed greater toxicity than technical grade herbicide sulcotrione. This was previously shown for mesotrione and Callisto[®] or glyphosate and Roundup[®] with growth inhibition criteria in several toxicity test organisms (Tsui and Chu, 2003; Cedergreen and Streibig, 2005). However, it is not the case for some other herbicides (Bonnet et al., 2008). Mikado[®] was shown toxic to *Pseudokirchneriella subcapitata* growth, while its toxicity was quite reduced for *Chlorella vulgaris* (Marques et al., 2012). As such,

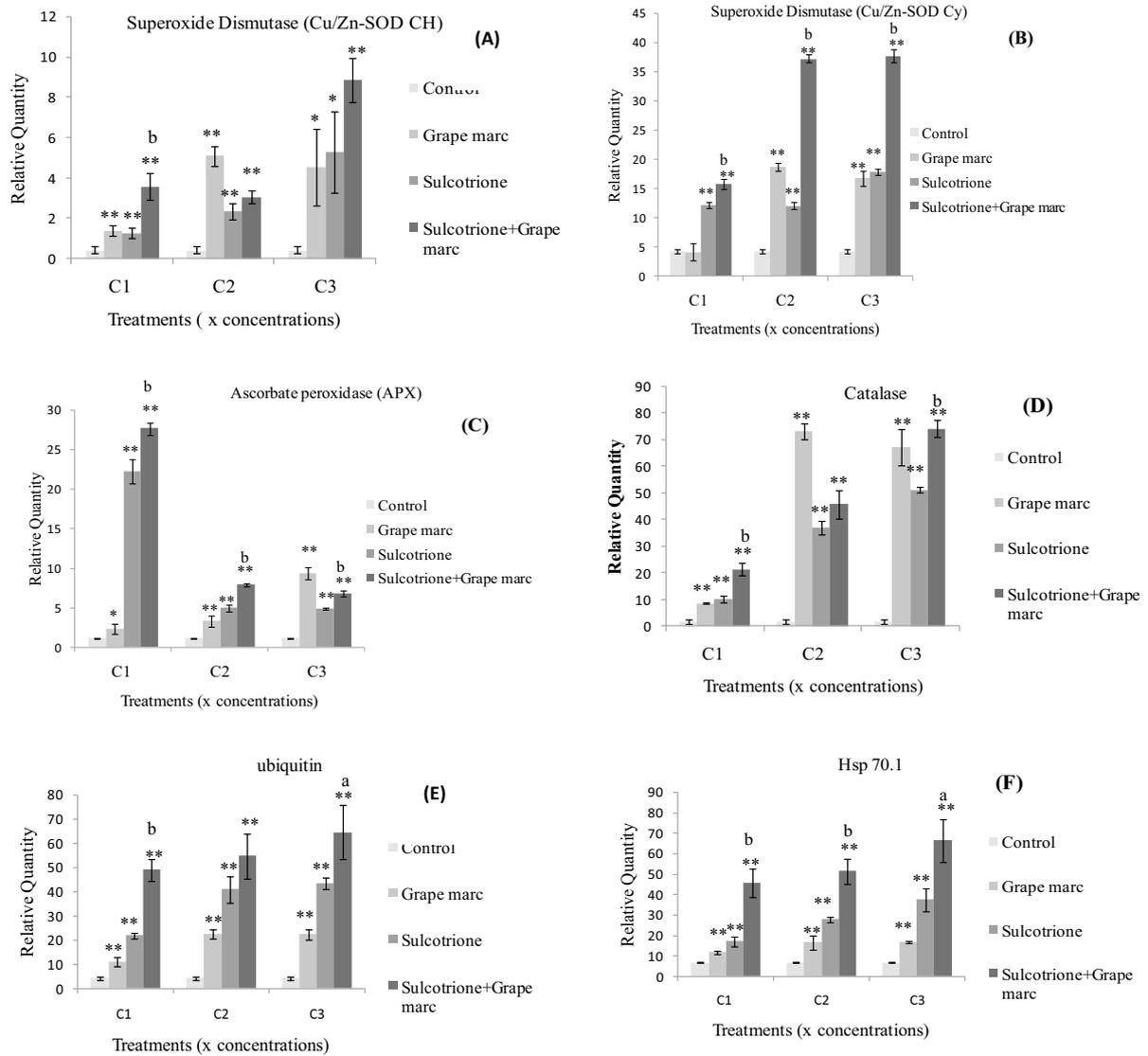


Fig. 4. Transcript accumulation in *Vicia faba* leaves after treatments with sulcotrione, grape marc and mixture of both components.

(A) Chloroplast copper-zinc superoxide (Cu/Zn-SOD CH) dismutase. (B) Cytosolic copper-zinc superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD CY). (C) Ascorbate peroxidase (APX). (D) Catalase. (E) ubiquitin. (F) Heat shock protein Hsp 70.1.

Treatment values with letter a or b are statistically different from pesticide counterpart at 5% or 1% significance level, respectively, according to Student t test. Values with one or two stars are statistically different from control counterpart at 5% and 1% significance level, respectively, according to Student t test. See legend of Figure 2 for product concentrations (C1, C2 and C3).

under higher mixture concentrations, action of pesticide may strongly enhance ecotoxicological effect of other chemicals, thereby showing potential synergistic effects. It should not be dismissed possibility that adjuvants added to herbicide formulations enhanced toxicity, as was potentially the case for methanol in Viper[®], thereby enhancing joint synergistic effects of formulated herbicides (Cabanne and Gaudry, 1996).

Previously, it was demonstrated that formulation surprisingly increased rate of sulcotrione photo-transformation (ter Halle et al., 2006). It was also identified synergistic joint effects on survival of daphnids for fungicide/ insecticide and fungicide/herbicide mixtures (Cedergreen et al., 2006) and for mixtures only composed with herbicides (Banks et al., 2005; Marques et al., 2012). It is often explained that effect of one chemical could be synergized by presence of the other, usually regulated by changes of detoxifying/biotransformation processes (Cedergreen et al., 2006).

Polyphenols can directly influence different points of the apoptotic process, and/or the expression of regulatory proteins (D'Archivio et al., 2008). Mosse *et al* (2010) have shown that winery wastewater delayed germination and inhibited vegetative growth of several plants. The present work investigated the oxidative stress in bean leaves exposed to pesticides and grapes marc, with measures of gene transcript accumulations of superoxide dismutases, catalase, ascorbate peroxidase, ubiquitin and Hsp70, markers of oxidative stress as previously described (Song et al., 2009; Ahmad et al., 2010; Romero et al., 2011; Cao et al., 2012; Soydam et al., 2013). Addition of grape marc to herbicide products, sulcotrione or Mikado[®], had different effects according to herbicide (active product or commercial product). Marker genes are differently expressed. Mixture of grape marc and herbicide enhanced transcript accumulation for ubiquitin, HSP 70 and cytosolic SOD. Mixtures made with sulcotrione or Mikado[®] gave different results at the highest concentration for chloroplast SOD and catalase transcript accumulations. Grape marc mixture markedly did not change effects of sulcotrione and Mikado[®] for ascorbate peroxidase transcript accumulation. Depression of catalase activity was previously reported in fishes exposed to endosulfan (ES) and it was attributed to the flux of superoxide radicals (Pandey et al., 2001; Ballesteros et al., 2009). Chromosome breakage, misrepaired DNA lesions, or chromosome unsegregation may be induced by oxidative stress (Pérez et al., 2011; Crupkin et al., 2013), and can explain genotoxic effect of sulcotrione previously described (Sta et al., 2012). Other herbicide and pesticide chemicals such as insecticides may induce oxidative stress leading to generation of free radicals and alterations in antioxidative or free radical scavenging enzyme systems

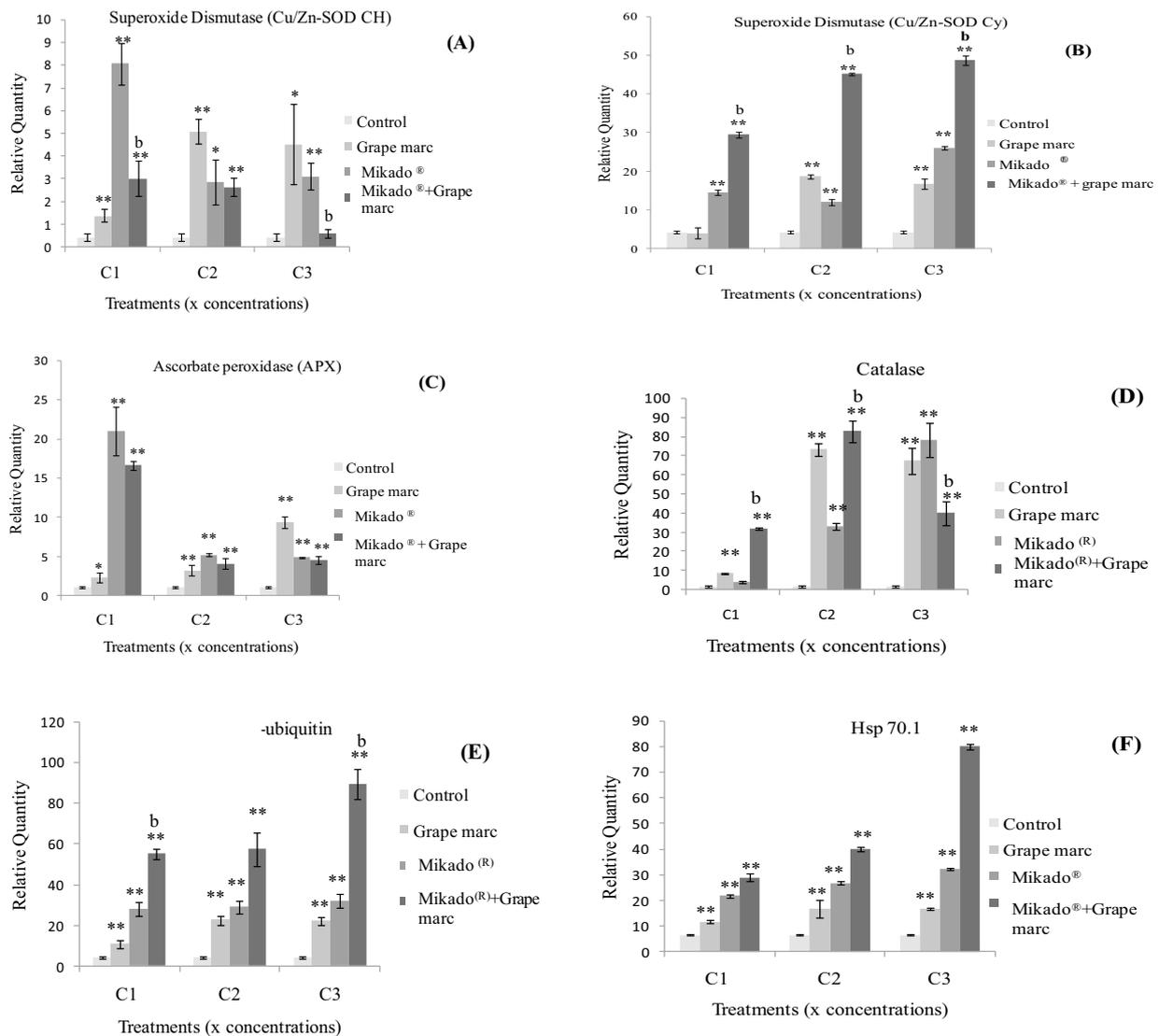


Fig. 5. Transcript accumulation in *Vicia faba* leaves after treatments with Mikado[®], grape marc and mixture of both components.

(A) Chloroplast copper-zinc superoxide (Cu/Zn-SOD CH) dismutase. **(B)** Cytosolic copper-zinc superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD CY). **(C)** Ascorbate peroxidase (APX). **(D)** Catalase. **(E)** ubiquitin. **(F)** Heat shock protein Hsp 70.1.

Treatment values with letter a or b are statistically different from pesticide counterpart at 5% or 1% significance level, respectively, according to Student t test. Values with one or two stars are statistically different from control counterpart at 5% and 1% significance level, respectively, according to Student t test. See legend of Figure 2 for product concentrations (C1, C2 and C3).

Target gene	Primer sequences	Product length (bp)	accession number
Actin	F: 5'-CAGCAGAGCGGGAAATTGTGAGGG-3' R: 5'-AGGGCATCTGAATCTTTCAGCACCG-3'	147	EU884301
ApxI	F: 5'-GGAAAGGCTATGGGGCTTAG-3' R: 5'-TCAACAAGAGGGCGGAATAC-3'	230	X62077.1
-ubiquitin	F: 5'-TCATCTTGTCCTCCGTCCTCC-3' R: 5'-AGCCAAAGTCCTTCCATCCT-3'	199	AJ012552.1
Hsp 70.1	F: 5'-TGTGCTTTGACATTGATGCCAACGG-3' R: 5'-ATCCTCAGACTTGTA CTCTCAGCC-3'	136	EU884304
Cu-ZnSOD Cy	F: 5'-TGGACCACATTTCAATCCTAATGG-3' R: 5'-CTTCCCAAGATCATCAGGATCGG-3'	177	EU884303
Cu-ZnSOD CH	F: 5'-CTGGACCACATTTCAATCCTAATGG-3' R: 5'-CTTCCCAAGATCATCAGGATCGG-3'	207	AB087845
Cat	F: 5'-TGAACAGCTTGCA TTTTGCCTGCC-3' R: 5'-ATTGTTGTGGTGAGACCACTTGGG-3'	132	EU884302

TABLE 1: Primer sequences for gene probes.

(Doulis et al., 1998; Štajner et al., 2004; Chagas et al., 2008; Duzguner et al., 2010). It was indicated that enzymes associated with antioxidative defense mechanisms are altered under influence of pesticides (Duzguner et al., 2010). Moreover, oxidative stress and DNA damage have been proposed as mechanisms linking pesticide exposure to health effects such as cancer and neurological diseases (Duzguner and Erdogan, 2012).

Proteins that are involved in cell stress metabolism, such as HSP 70 and ubiquitin, showed transcript increase following treatments by either sulcotrione or Mikado[®] on *V. Faba* leaves. Grape marc treatments alone displayed an increased accumulation of same transcripts. Mixtures of grape marc and herbicide enhanced effect as well as with sulcotrione or Mikado[®] for all concentrations. Earlier, it has been shown that intracellular reactive oxygen species (ROS) accumulation was attenuated by pretreatment with procyanidin B2 (Mazumdar et al., 2011). In addition to antioxidative capacity, polyphenols may exert protective effect by selective inhibition or stimulation of key protein into cell signaling cascades. Flavanols are also potent antioxidants in lipid systems where they reduce oxidative modifications of membranes by restricting access of oxidants to the bilayer and propagation of lipid oxidation in hydrophobic membrane matrix (Verstraeten et al., 2003).

CONCLUSIONS

Pesticide, sulcotrione or Mikado[®] and grape extract, alone, can induce target plant cell death. Mixture of pesticide and grape marc suggest a potentiating effect of grape extract by adjuvant elements of Mikado[®].

Herbicides and grape marc can trigger oxidative stress resulting in disruption of cellular metabolism. We provide evidence that mixture (herbicide and grape marc) triggers specific gene expression for stress-associated proteins. Add of grape marc to herbicide products, sulcotrione or Mikado[®], had different effects according to herbicide (active product or commercial form) and genes are shown differently expressed. Therefore, adjuvant product can modify biological features of sulcotrione. Moreover, grape marc can enhance biological effects of sulcotrione and Mikado[®] with different gene expression features.

Acknowledgements

We thank Céline Sac and Dominique Marcon for their skillful assistance

REFERENCES

- Abendroth JA, Martin AR, Roeth FW. 2006. Plant response to combinations of mesotrione and photosystem II inhibitors. *Weed Technol* 20:267–274.
- Ahmad R, Kim YH, Kim MD, Kwon SY, Cho K, Lee HS, Kwak SS. 2010. Simultaneous expression of choline oxidase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in potato plant chloroplasts provides synergistically enhanced protection against various abiotic stresses. *Physiol Plant* 138:520–533.
- Ballesteros ML, Wunderlin DA, Bistoni MA. 2009. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:199–205.
- Banks KE, Turner PK, Wood SH, Matthews C. 2005. Increased toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in mixtures of atrazine and diazinon at environmentally realistic concentrations. *Ecotox Environ Safe* 60:28–36.
- Bonnet JL, Bonnemoy F, Dusser M, Bohatier J. 2007. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environ Toxicol* 22:78-91.
- Bonnet JL, Bonnemoy F, Dusser M, Bohatier J. 2008. Toxicity Assessment of the Herbicides Sulcotrione and Mesotrione Toward Two Reference Environmental Microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*. *Arch Environ Contam Toxicol* 55:576-583.
- Cabanne F, Gaudry JC. 1996. Effect of formulation agents on the joint action of aclonifen and bentazone. *Second Int Weed Control Congr Proc* 1–4:881–886.

- Cao J, Zhang X, Wang Q, Jia L, Zhang Y, Zhao X. 2012. Influence of flavonoid extracts from celery on oxidative stress induced by dichlorvos in rats. *Hum Exp Toxicol* 31:617-625.
- Chaabane H, Vulliet E, Joux F, Lantoine F, Conan P, Cooper JF, Coste CM. 2007. Photodegradation of sulcotrione in various aquatic environments and toxicity of its photoproducts for some marine micro-organisms. *Water Res* 41:1781–1789.
- Chagas RM, Silveira JAG, Ribeiro RV, Vitorello VA, Carrer H. 2008. Photochemical damage and comparative performance of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in sugarcane leaves exposed to paraquat-induced oxidative stress. *Pestic Biochem Physiol* 90:181–188.
- Cedergreen N, Streibig JC. 2005. The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. *Pest Manag Sci* 61:1152-1160.
- Cedergreen N, Kamper A, Streibig JC. 2006. Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants. *Aquat Toxicol* 78:243–252.
- Crupkin AC, Carriquiriborde P, Mendieta J, Panzeri AM, Ballesteros ML, Miglioranza KSB, Menone ML. 2013. Oxidative stress and genotoxicity in the South American cichlid, *Australoheros facetus*, after short-term sublethal exposure to endosulfan. *Pestic Biochem Physiol* 105:102–110.
- D'Archivio M, Santangelo C, Scazzocchio B, Vari R, Filesi C, Masella R, Giovannini C. 2008. Modulatory Effects of Polyphenols on Apoptosis Induction: Relevance for Cancer Prevention. *Int J Mol Sci* 9:213-228.
- Dayan FE, Cantrell CL, Duke SO. 2009. Natural products in crop protection. *Bioorg Med Chem* 17:4022–4034.
- Doulis AG, Donahue JL, Alscher RG. 1998. Differential responses to paraquat induced oxidative injury in a pea (*Pisum sativum*) protoplast system. *Physiol Plant* 102:461–471.
- Duzguner V, Erdogan S. 2010. Acute oxidant and inflammatory effects of imidacloprid on the mammalian central nervous system and liver in rats, *Pestic Biochem Physiol* 97:13–18.

- Duzguner V, Erdogan S. 2012. Chronic exposure to imidacloprid induces inflammation and oxidative stress in the liver & central nervous system of rats. *Pestic Biochem Physiol* 104:58–64.
- Eyheraguibel B, Richard C, Ledoigt G, ter Halle A. 2010. Photoprotection by plant extracts: a new ecological means to reduce pesticide photodegradation. *J Agric Food Chem* 58:9692-9696.
- Eyheraguibel B, Richard C, Ledoigt G, ter Halle A. 2011. Inhibition of Herbicide Photodegradation by Plant Products. *J Agric Food Chem* 59:4868-4873.
- Goupil P, Benouaret R, Charrier O, ter Halle A, Richard C, Eyheraguibel B, Thiery D, Ledoigt G. 2012. Grape marc extract acts as elicitor of plant defence responses. *Ecotoxicol* 21:1541-1549.
- ter Halle A, Drncova D, Richard C. 2006. Phototransformation of the Herbicide Sulcotrione on Maize Cuticular Wax. *Environ Sci Technol* 40:2989-2995.
- ter Halle A, Richard C, Ledoigt G. 2008. Phytosanitary formulations containing plant extracts as photoprotectants for pesticides. Patent WO/2008/090476-PCT/IB2008/001007.
- ter Halle A, Wiszniowski J, Hitmi A, Ledoigt G, Bonnemoy ., Bonnet JL, Bohatier J, Richard C. 2009. Photolysis of the herbicide sulcotrione: formation of a major photoproduct and its toxicity evaluation. *Pest Manag Sci* 65:14-18.
- Jovic M, Manojlovic D, Stankovic D, Dojcinovic B, Obradovic B, Gasic U, Roglic G. 2013. Degradation of triketone herbicides, mesotrione and sulcotrione, using advanced oxidation processes. *J Hazard Mater* 260:1092– 1099.
- Khanal RC, Howard LR. 2009. Procyanidin content of grape seed and pomace, and total anthocyanin content of grape pomace as affected by extrusion processing. *J Food Sci* 74:H174-H182.
- Marques CR, Goncalves AMM, Pereira R, Goncalves F. 2012. Ecotoxicological Effects of Mikado[®] and Viper[®] on Algae and Daphnids. *Environ Toxicol* 27:685–699.
- Mazumdar M, Giri S, Giri A. 2011. Role of quercetin on mitomycin C induced genotoxicity: Analysis of micronucleus and chromosome aberrations *in vivo*. *Mutation Res* 721:147–152.

- Mosse KPM, Patti AF, Christen EW, Cavagnaro TR. 2010. Winery wastewater inhibits seed germination and vegetative growth of common crop species. *J Hazard Mater* 180:63–70.
- Pandey S, Ahmad I, Parvez S, Bin-Hafeez B, Haque R, Raisuddin S. 2001. Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* Bloch, 1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper preexposure. *Arch Environ Contam Toxicol* 41:345–352.
- Pérez DJ, Lukaszewicz G, Menone ML, Camadro EL. 2011. Sensitivity of *Bidens laevis* L. to mutagenic compounds. Use of chromosomal aberrations as biomarkers of genotoxicity. *Environ Poll* 159:281–286.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification 1 in real-time RT-PCR. *Nucl Acid Res* 29 :e45.
- Romero DM, Rios de Molina MC, Juarez AB. 2011. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Toxicol Environ Saf* 74:741–747.
- Ross JA, Kasum CM. 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. *Annu Rev Nutr* 22 :19–34.
- Soydam AS, Büyük I, Aras S. 2013. Relationships among lipid peroxidation, SOD enzyme activity, and SOD gene expression profile in *Lycopersicon esculentum* L. exposed to cold stress. *Genet Mol Res* 12:3220-3229.
- Sta C, Ledoigt G, Ferjani E, Goupil P. 2012. Exposure of *Vicia faba* to sulcotrione pesticide induced genotoxicity. *Pestic Biochem Physiol* 103:9–14.
- Song Y, Zhu LS, Xie H, Wang J, Wang JH, Liu W, Dong XL. 2009. Effects of atrazine on DNA damage and antioxidative enzymes in *Vicia faba*. *Environ Toxicol Chem* 28:1059-1062.
- Štajner D, Popovic M, Štajner M. 2004. Herbicide induced oxidative stress in lettuce, beans, pea seeds and leaves, *Biol Plant* 47:575–579.
- Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM, Jacobs G. 2002. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytol* 155:349–361.

- Tsui MT, Chu LM. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52:1189-1197.
- Verstraeten SV, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG, Oteiza PI. 2003. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radic Biol Med* 34:84–92.
- Vulliet E, Emmelin C, Chovelon JM, Chouteau C, Clement B. 2004. Assessment of the toxicity of triasulfuron and its photoproducts using aquatic organisms. *Environ Toxicol Chem* 23:2837–2843.
- Wiszniewski J, ter Halle A, Richard C, Hitmi A, Ledoigt, G. 2009. Photodegradation product of sulcotrione and the physiological response of maize (*Zea mays*) and white mustard (*Sinapis alba*). *Chemosphere* 74:1224–1230.

CHAPITRE 5 :

**La toxicité de l'herbicide et de son
produit formulé sur le métabolisme
oxydant de *Vicia faba***

CHAPITRE 6 :
Effet de la sulcotrione et ses
photoproduits sur *Allium cepa*

Génotoxicité de la sulcotrione et ses photoproduits sur les méristèmes racinaires d'*Allium cepa*.

Eric GOUJON, Chaima STA, Aurélien Trivella, Pascale Goupil, Claire Richard, Gérard Ledoigt

Cet article fait l'objet d'une soumission au journal *Pesticide Biochemistry and Physiology*)

Contexte

L'utilisation raisonnée des produits phytosanitaires dans le domaine agricole est devenue un enjeu majeur pour atteindre les objectifs fixés par les Directives européenne et nationale. La dégradation est la transformation du pesticide provoquant des modifications de la structure moléculaire avec apparition de métabolites. Dans ce but, nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'impact génotoxique, non seulement, de la sulcotrione pure, mais aussi de ses dérivés (photoproduits après irradiation) sur *Allium cepa*.

L'objectif de ce travail était aussi, en partie, l'extrapolation à une autre plante, monocotylédone, des résultats observés sur *V. faba*.

Résultats

L'analyse d'une solution irradiée de sulcotrione à 2.10^{-4} M a montré la présence de la sulcotrione mais aussi d'un cocktail de photoproduits composé de CMBA et Xanthène. La cytotoxicité potentielle de l'herbicide a été étudiée avant et après irradiation. L'indice mitotique diminue de façon significative par rapport aux plantes témoins, que ce soit pour les plantes traitées 48 heures à la sulcotrione pure ou à la sulcotrione irradiée. On note la présence d'anomalies chromosomiques, pendant la division cellulaire, dans les méristèmes racinaires d'*Allium cepa*. Les changements morphologiques des chromosomiques se présentent par des cellules représentant des chromosomes retardataires qui n'ont pas rejoint la plaque équatorial, des vagabonds, des ponts anaphasiques, des fragments de chromosomes... on a pu montrer que l'irradiation de la sulcotrione a renforcée la toxicité de l'herbicide et a conduit à un taux d'aberration chromosomique plus élevé chez *Allium cepa*.

Conclusions

Les résultats de cette étude confortent les précédentes données obtenues chez *Vicia faba* montrant une toxicité de la sulcotrione. Les données ont montré une toxicité du mélange de sulcotrione après photodégradation. La sulcotrione pure et irradiée provoque une diminution dose-dépendante de l'index mitotique. Les photoproduits augmentent les fréquences d'anomalies chromosomiques. Le cocktail sulcotrione photodégradée a montré une plus grande toxicité du mélange de molécule mère. Nous démontrons ici que les photoproduits de la sulcotrione sont aussi génotoxiques et que le taux de toxicité de ces derniers est plus élevé.

DISCUSSION GENERALE

Le concept de biosurveillance, basé sur la réponse biologique des organismes aux polluants, est en plein essor. Les marqueurs biologiques ou biomarqueurs chez les animaux et les plantes, jouant le rôle « sentinelles » constituent une approche efficace pour évaluer les effets d'une contamination de l'environnement sur des écosystèmes et sur la santé humaine (Lafaurie, 1995). C'est une véritable « toxicologie qui se développe ». La connaissance des symptômes permet de diagnostiquer l'impact du polluant.

On a commencé par l'étude de la génotoxicité, Une exposition courte à une concentration réaliste de l'herbicide induit déjà des modifications à l'échelle macroscopique. En effet, la sulcotrione inhibe l'élongation des racines de *Vicia faba* par rapport aux témoins. Les racines des plantes traitées sont moins longues, ceci est peut être dû à une corrélation avec l'indice mitotique (IM). L'allongement des cellules est inhibé par le blocage des mitoses au niveau du méristème. Certains auteurs font le rapprochement entre ces deux paramètres. Par exemple, Rank et Nielsen (1997) constatent chez *Allium cepa* que s'ils choisissent pour concentration maximale d'étude celle permettant d'inhiber la pousse des racines de 50 %, l'indice mitotique ne descendra jamais en dessous de 50% du témoin, théorie qu'ils ont vérifiée avec tous les toxiques étudiés, dont l'HM.

De Marco *et al.* (2005) trouvent une très forte corrélation positive entre la longueur de la racine primaire de *Vicia faba* et le nombre de micronoyaux retrouvés dans les méristèmes de ces mêmes racines. L'explication logique peut en être que plus l'organisme croît et plus ses cellules se multiplient, augmentant mathématiquement la probabilité de survenue d'une lésion de l'ADN. Nous n'avons pour notre part constaté aucune corrélation entre ces deux grandeurs, ceci étant en partie dû au fait que les racines employées pour les mesures ne sont pas les mêmes.

On sait que lorsque l'IM diminue en-dessous d'un certain seuil, la fréquence de micronoyaux a tendance à diminuer également. De plus, comme expliqué au paragraphe précédent, un plus grand nombre de mitoses signifie également un plus grand risque de formation de micronoyaux. Pourtant, aucune corrélation claire n'a été établie entre ces deux paramètres.

On a voulu voir s'il existe une corrélation entre la l'IM et la aberrations chromosomiques. On a constaté que la fréquence des aberrations chromosomiques diminue en augmentant la concentration de l'herbicide. Donc aucune corrélation entre l'IM et les aberrations chromosomiques n'est montrée. Certaines aberrations chromosomiques peuvent se

transformer en micronoyaux et peut expliquer le fait de l'augmentation de la fréquence de MCN pour les concentrations les plus élevées en herbicide. Nous avons en revanche trouvé une corrélation entre l'élongation racinaire et l'IM. Pour les autres paramètres (MCN, IM et aberrations chromosomique), nous n'avons trouvé aucune corrélation. Ils sont donc indépendants les uns des autres, non redondants, et peuvent apparaître en parallèle.

D'autres modifications aux niveaux des racines de *V. faba* sont observées, le traitement entraîne la rigidité et le brunissement des racines, caractéristiques d'un stress. A titre d'exemple, des études ont montré que le changement de la coloration des racines est associé à une mort cellulaire dans les zones contenant une forte concentration en métal (Wierzbicka, 1987; Tung and Temple, 1996b; Seregin *et al.*, 2004). Donc l'hypothèse émise dans cette étude est que le stress oxydant est impliqué dans les mécanismes de résistance des cellules de *V. faba* suite au traitement d'herbicide. Les contaminants organiques tels que les pesticides sont capables d'altérer le système de défense de l'organisme suite à la production de composés radicalaires tel que le radical hydroxyde (OH[•]) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Rodriguez-Ariza, 1993, Sole *et al.*, 1995, Khessiba *et al.*, 2001). Les xénobiotiques sont capables de produire des radicaux libres dits primaires ou de ROS qui dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde O₂^{•-} et le radical hydroxyle OH (Lopez *et al.*, 2007). Ceci peut expliquer l'augmentation de la production de H₂O₂ suite au traitement des plantes par la sulcotrione, le Mikado^R ou les cocktails. H₂O₂ semble être l'espèce réactive principale de l'oxygène impliquée dans la toxicité des contaminants organiques, et qui peut être précurseur de radicaux (Sellami *et al.*, 2012). Au niveau cellulaire, les enzymes antioxydantes sont capables de neutraliser ces espèces réactives de l'oxygène. Parmi ces enzymes la catalase réduit le peroxyde d'hydrogène en eau (H₂O) et oxygène moléculaire (O₂). L'élimination de H₂O₂ est assurée notamment par la catalase et la gaïacol peroxydase. Nous avons montré la présence d'une activité considérable de ces enzymes, une augmentation de l'activité CAT ainsi que celle de la gaïacol peroxydase (GPX) dans les cellules méristématiques de *V. faba* a été noté.

Le traitement des plantes semble provoquer une altération de la membrane plasmique à travers une dégradation par oxydation des lipides et l'attaque des acides gras polyinsaturés. En effet, nous avons montré une accumulation importante de malondialdéhyde, l'un des produits de lipoperoxydation membranaire dans les cellules méristématiques. Cette lipoperoxydation semble être due à un effet indirect de l'herbicide ou des cocktails par les

radicaux libres qu'ils engendrent (Schützendübel *et al.*, 2001, De Vos *et al.*, 1993). L'accumulation des ROS (H₂O₂) confirme cette interprétation.

Lors de notre étude, nous avons montré un blanchiment de la partie aérienne de *V. faba* après un traitement par l'herbicide (Sta *et al.*, 2011). Ceci confirme les données scientifiques de Schulz *et al.*, 1993 qui a montré que le site premier d'action de la sulcotrione est celui de la 4-hydroxy-phényl-pyruvate-dioxygénase (4-HPPD) et que la sulcotrione affecte la photosynthèse en inhibant cette enzyme. La sulcotrione cause des forts blanchiments qui sont accompagnés par une diminution des niveaux de concentrations en chlorophylles et en caroténoïdes. Ces symptômes ont conduit à l'hypothèse que la sulcotrione est un herbicide pourrait inhiber l'enzyme, phytoène désaturase (Susan *et al.*, 1995) qui est la cible de l'enzyme de la plupart des herbicides de blanchiment connus et par suite blocage de la voie de biosynthèse de carotènes (Sandmann *et al.*, 1989). La plastoquinone agit comme intermédiaire entre transporteur d'électron des caroténoïdes désaturase et la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques (Susan *et al.*, 1995). La sulcotrione cause donc chez les plantes sensibles de forts blanchiments qui sont accompagnés par une diminution des niveaux de concentrations en chlorophylles et en caroténoïdes ainsi que par une accumulation massive de phytoène (Soeda *et al.*, 1987, Mayonado *et al.*, 1989). Il y a ainsi diminution du taux de caroténoïdes et accumulation de phytoène, par suite de l'inhibition de la synthèse de caroténoïdes comme cela a été montré chez *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2001). Beyer et ses collaborateurs (1994) ont montré que plusieurs classes de quinones jouent un rôle important dans la désaturation des caroténoïdes. D'autres études témoignent de façon concluante que plastoquinone et tocophérol sont des composantes essentielles dans la réaction de désaturation de phytoène chez les plantes supérieures (Susan *et al.*, 1998). Nous avons aussi remarqué une diminution du taux du tocophérol dans les feuilles de *V. faba*, ceci peut être expliqué par le fait que les tricétones entreraient en compétition avec le fonctionnement de l'enzyme 4-hydroxy-phényl-pyruvate-dioxygénase (4-HPPD) pour les sites enzymatiques de synthèses de tocophérols et plastoquinone (Schulz *et al.*, 1993 et Secor, 1994). Norris *et al.*, (1995) ont suggéré que la 4-hydroxy-phényl-pyruvate-dioxygénase est une composante du parcours qui permet de convertir la tyrosine en plastoquinone et α -tocophérol. D'autre part, l'élévation du taux de la MDA associé au stress oxydant induit par la sulcotrione, pourrait aussi avoir des conséquences sur la fonction photosynthétique. En effet une peroxydation des lipides chloroplastiques riches en acides gras polyinsaturés peut affecter la structure des membranes thylacoïdiennes et inhiber par conséquent la photosynthèse (Ben Youssef *et al.*, 2005).

Une diminution de la croissance foliaire observée chez *V. faba* est la conséquence de l'altération de la photosynthèse. Elle peut aussi avoir comme origine les troubles physiologiques touchant l'alimentation hydrique et minérale. Des études ont montré que la présence d'herbicide en milieu aquatique est dommageable pour la croissance de certaines algues (Fairchild *et al.*, 1997). Des perturbations de l'absorption de l'eau par les racines sont montrées dans les plantules de fèves traitées par l'herbicide ainsi que par les cocktails. Ces symptômes observés en situation de stress sont la conséquence d'une altération de l'homéostasie cellulaire suite à forte accumulation de radicaux libres oxygénés. Les ROS sont produites pendant un métabolisme normal de la plante, mais l'augmentation de leur concentration intracellulaire est souvent synonyme de stress. L'augmentation de la production des ROS chez *V. faba* semble être responsable d'une manière directe ou indirecte, de nombreux dommages par oxydation. Ces dommages touchent des lipides, des protéines et le noyau cellulaire. Cependant ces ROS semblent jouer le rôle de messagers secondaires entraînant une accumulation des transcrits de gènes codant pour des protéines de stress et des enzymes antioxydantes. Nous avons montré une accumulation des transcrits *APX*, *HSP70.1*, *ubiquitin*, *Cat*, *Cu-ZnSODcy* et *Cu-ZnSODch*.

En dépit de leur nature extrêmement réactive, les ROS ne sont pas uniquement impliquées dans des réponses délétères chez les végétaux. De nombreuses études ont montré que les ROS peuvent aussi intervenir dans les signalisations responsables de l'induction et de la régulation de nombreux gènes de défenses (protéines chaperonnes, « Heat Shock Proteins »; enzymes antioxydantes, comme ascorbate peroxydase APX, glutathione-S-transférase GST; protéines associées à la pathogénèse « PR proteins » (Larkindale *et al.*, 2005; Zago *et al.*, 2006).

D'après nos résultats, le déclenchement de la mort cellulaire semble dépendre de la concentration en molécule active, du type moléculaire et de la durée du traitement. En effet les herbicides provoquent une perte d'intégrité cellulaire. La mort cellulaire pourrait être induite par une augmentation de ROS, mais aussi générer leur production. Ces derniers sont aussi considérés comme agents régulateurs de la mort cellulaire programmée (PCD) chez les plantes (Dat *et al.*, 2003; Van Breusegem *et al.*, 2006). Ces espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent, par ailleurs, endommager les molécules biologiques avec des effets secondaires d'altération de l'état de l'organisme (Bebiano et Barreira 2009). Ce processus de mort cellulaire, actif et programmé génétiquement, se retrouve tout au long de la vie des plantes. En effet différents types cellulaires ou organes sont éliminés, au moment approprié,

au profit de l'organisme et de la population. Ils constituent des modèles de la PCD végétale. Au cours du développement, la PCD est impliquée dans de nombreux phénomènes comme la germination (couche aleurone), la différenciation des vaisseaux conducteurs de la sève brute et élaborée, la croissance (coiffe racinaire), la reproduction (tube pollinique), ou bien encore la sénescence (feuille). La PCD pourrait être une stratégie de défense adoptée par les plantules de fève traitées par l'herbicide ou les cocktails à travers l'élimination des cellules contaminées. La PCD joue un rôle crucial dans la régulation du renouvellement cellulaire et donc indirectement dans la régulation du renouvellement des protéines. La génotoxicité a comme origine une production accrue des ROS (Wang et Huang, 1994; Rosa *et al.*, 2003) mais elle pourrait aussi résulter de l'inhibition des enzymes intervenant dans les processus de réparation de l'ADN (Hartwig, 1998; Lützen *et al.*, 2004) ce qui entraînerait la mort cellulaire.

Nos résultats ont montré que les cocktails ont des réponses physiologiques, métaboliques et moléculaires toujours plus importantes que l'extrait végétal ou même les herbicides seuls. Ceci témoigne de l'importance de l'extrait végétal ajouté pour un rôle de photoprotecteur, empêchant la dégradation de la molécule active, qui renforce ainsi l'effet de l'herbicide. L'intérêt de ce mélange sur *V. faba*, s'est révélé bien plus avantageux que l'utilisation des molécules seules. Une synergie d'action existe donc entre les deux composés, sulcotrione et extrait de raisin, leur association se montrant en effet beaucoup plus efficace.

**CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES**

« Sûrs », « propres » et même « respectueux de la santé et de l'environnement », l'industrie phytosanitaire use de tous les arguments pour convaincre du bien-fondé de l'usage de ses désherbants, insecticides et autres pesticides. Face à ces discours, les faits sont pourtant bien là: accidents industriels, pesticides interdits ou périmés expédiés dans les pays en voie de développement, contamination des eaux, de l'air et des fruits et légumes, atteinte à la biodiversité, cancers... des faits qui, mis bout à bout, pèsent définitivement en faveur d'une réduction de l'utilisation des pesticides. D'autant plus que les alternatives existent. Afin de minimiser les effets nocifs des pesticides et protéger l'environnement, on avait mis pour objectifs dans notre étude, l'évaluation de l'impact d'un herbicide sur deux modèles de plantes en fonction des doses utilisées en agriculture et l'impact d'un composé naturel issu de la vigne sur la toxicité des pesticides sur les végétaux.

Les résultats ont montré une phytotoxicité causée par la présence de la sulcotrione, son produit formulé ou les cocktails engendrent des désordres relatifs à la croissance des plantules de fèves. Ces altérations se manifestent à l'échelle de la plante entière par une réduction de l'élongation racinaire et de la croissance foliaire. Associée à cet effet herbicide, une action génotoxique de la sulcotrione a été mise en évidence, ainsi que l'induction d'une mort cellulaire. La génotoxicité est caractérisée par l'apparition de micronoyaux et d'aberrations chromosomiques, dont l'apparition n'est pas toujours corrélée, indiquant des mécanismes différents pour leur formation.

A l'échelle cellulaire, nous proposons un schéma hypothétique qui semble résumer les diverses perturbations survenues dans les cellules de plantules. Une fois absorbée, la sulcotrione se fixe sur le récepteur de la 4-HPPD, inhibant de manière compétitive cette enzyme, intervenant lors de la seconde étape du catabolisme de la tyrosine et qui est spécifique requise pour la biosynthèse des caroténoïdes. La conversion de la 4-HPP en homogentisate (HGA) ne se fait pas. Ce dernier est normalement le précurseur aromatique des vitamines E (tocophérol) et des plastoquinones, molécules indispensables au fonctionnement photosynthétique et à la lutte contre le stress oxydant. La déficience en plastoquinone, qui devrait être placée dans la membrane des thylacoïde pour recevoir les e^- provenant du photosystème II et les transférer sur le complexe cytochrome b6/f, provoque une altération de la photosynthèse. Ceci pourrait être à l'origine de la stimulation de la production des ROS. Ces derniers sont nocifs pour la cellule et leur présence au niveau de la membrane plasmique

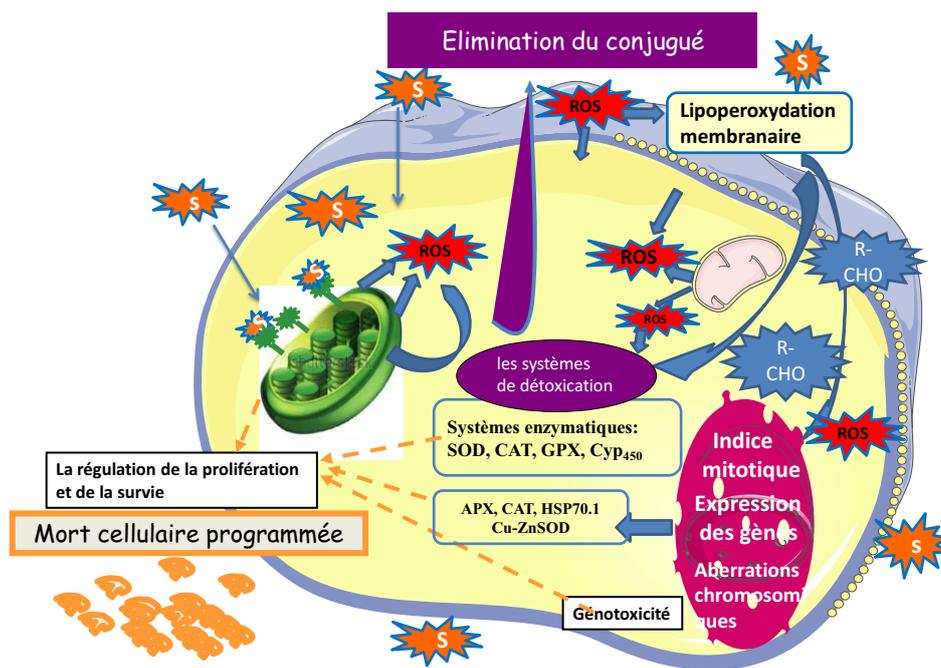


Figure 24 : Schéma hypothétique décrivant les manifestations cellulaires probables survenues chez les plantules de fèves suite au traitement par l'herbicide ou les cocktails.

des cellules et des membranes thylacoïdiennes semble provoquer une oxydation des acides gras polyinsaturés d'où la lipoperoxydation membranaire. Les conséquences de la peroxydation des lipides membranaires sont nombreuses. Les membranes deviennent rigides, perdent leur perméabilité sélective, et sous conditions extrêmes, peuvent perdre leur intégrité.

Les plantules sont capables de métaboliser activement la sulcotrione et répondre à la production intracellulaire des ROS qui peut perturber l'homéostasie redox. Les cellules de *V.faba* semblent développer des systèmes de défense, les enzymes du métabolisme, dont les cytochromes P450 (CYP), jouent un rôle central dans la biotransformation, le métabolisme et/ou la détoxification de composés étrangers à l'organisme (Gueguen *et al.*, 2006b). Ces systèmes de détoxification font intervenir des mécanismes enzymatiques et d'autres non enzymatiques. Les systèmes enzymatiques font appel à la gaïacol peroxydase, la catalase et peut être d'autres enzymes comme la superoxyde dismutase. Les produits issus de la peroxydation lipidique sont en général des aldéhydes peuvent diffuser à travers les membranes et atteindre d'autres compartiments cellulaires. Ces aldéhydes peuvent agir comme agent de pontage et peuvent jouer un rôle dans l'agrégation des protéines. Les produits de la peroxydation lipidiques pourraient inhiber les fonctions enzymatiques. Au niveau du noyau cellulaire, les aldéhydes réagissent avec les bases des acides nucléiques, pourraient modifier la structure de l'ADN en formant des adduits, nous avons montré que les herbicides ou les cocktails pourraient engendrer une diminution de l'indice mitotique, et une apparition d'anomalies chromosomiques touchant la structure et le nombre de chromosome dans les méristèmes racinaires de *Vicia faba* (mais aussi d'*Allium cepa*). Ces effets génotoxiques pourraient être directs ou indirects à travers l'action des ROS. Ces derniers semblent jouer un rôle de messager secondaire qui entraîne la surexpression de certains gènes liés au stress causé par les herbicides ainsi que les mélanges. Une accumulation de transcrits codant pour plusieurs types de protéines. Une réponse cellulaire, suite à la détection des modifications délétères produites dans la molécule d'ADN et les membranes cellulaires, émet un signal d'alarme. Dans notre cas, la cellule active la machinerie qui mène à la mort cellulaire. L'extrait végétal a renforcé les modifications des paramètres normaux de l'environnement cellulaire.

L'ensemble de ce travail est une contribution à l'étude des effets de la sulcotrione sur la plante à intérêt économique et alimentaire important, s'inscrivant dans le cadre de l'étude de l'effet de cet herbicide sur les chromosomes. En perspectives à ce travail, il serait

intéressent d'étudier l'effet de l'extrait végétale sur le potentiel toxicologique des photoproduits de la sulcotrione mais aussi sur d'autres pesticides de famille chimique différente mais étant facilement photodégradable. Cette étude pourra être approfondie par la détermination des gènes spécifiques propre au stress causé par l'herbicide et l'étude détaillée des voies de signalisations.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abdel Migid HM, Azab YA, Ibrahim WM. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2007 Jan;66(1):57–64.

Abeles FB, Dunn LJ, Morgens P, Callahan A, Dinterman RE, Schmidt J. Induction of 33-kD and 60-kD Peroxidases during Ethylene-Induced Senescence of Cucumber Cotyledons. *Plant Physiol.* 1988 Jul;87(3):609–15.

Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol.* 1984;105:121–6.

Afnor. 2004. NF T90-327. Soil Quality – Assessment of Genotoxic Effects to Higher plants – Micronucleus Test on *Vicia faba*. In: AFNOR, editor. Saint-Denis. p 13.

Albert F, Anderson AJ. The Effect of *Pseudomonas putida* Colonization on Root Surface Peroxidase. *Plant Physiol.* 1987 Oct;85(2):537–41.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001 Aug 1;357(Pt 3):593–615.

Allen RG, Keogh BP, Gerhard GS, Pignolo R, Horton J, Cristofalo VJ. Expression and regulation of superoxide dismutase activity in human skin fibroblasts from donors of different ages. *J Cell Physiol.* 1995 Dec;165(3):576–87.

Antoniuk SA, Bruck I, Spessatto A, Halick SM, de Bruyn LR, Meister E, et al. [West syndrome: clinical and electroencephalographic follow up of 70 patients and response to its treatment with adrenocorticotrophic hormone, prednisone, vigabatrin, nitrazepam and valproate]. *Arq Neuropsiquiatr.* 2000 Sep;58(3A):683–90.

Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 2004;55:373–99.

Arnon DI. copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in *beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 1949 Jan;24(1):1–15.

Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 2006 Jun;141(2):391–6.

Auberto, J.-N., Barbier, J.-M., Carpentier, A., Gril, J.-J., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., Savini, I., Voltz, M. (2005). Pesticides, agriculture et environnement-réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Rapport de l'expertise réalisée par l'INRA et le Cemagref à la demande du Ministère de l'agriculture et de la pêche (MAP) et du Ministère de l'écologie et du développement durable (MEDD).

Badyal SK, Metcalfe CL, Basran J, Efimov I, Moody PCE, Raven EL. Iron oxidation state modulates active site structure in a heme peroxidase. *Biochemistry.* 2008 Apr 15;47(15):4403–9.

Bailly C, El Maarouf Bouteau H, Corbineau F. [Seed dormancy alleviation and oxidative signaling]. *J Soc Biol.* 2008;202(3):241–8.

Baker CJ, Mock NM. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 1994 Oct 1;39(1):7–12.

Baker NR, Rosenqvist E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J Exp Bot.* 2004 Aug 1;55(403):1607–21.

Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST, Chakraborty AK. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol Lett.* 1999 Jun 30;107(1-3):33–47.

Barroso G, Barrionuevo M, Rao P, Graham L, Danforth D, Huey S, et al. Vascular endothelial growth factor, nitric oxide, and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients. *Fertil Steril.* 1999 Dec;72(6):1024–6.

Barta, I. C. et Böger, P.(1996). Purification and characterization of 4 hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from maize. *Pesticide Science*, 1996 (48) 109-116.

Bartosz G . “Oxidative stress in plants.”*Acta Physiologiae Plantarum* 1997(19)1: 47-64.

Beaudegnies R, Edmunds, A J F, Fraser T. E. M., Hall R G, Hawkes T R., Mitchell

G, Schaetzer J, Wendeborn S, et Wibley, J. Herbicidal 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors. A review of the triketone chemistry story from a Syngenta perspective. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2009) 17, 4134-4152.

Beckman JS, Crow JP. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans.* 1993 May;21(2):330–4.

Bedhomme M, Zaffagnini M, Marchand CH, Gao X-H, Moslonka-Lefebvre M, Michelet L, et al. Regulation by glutathionylation of isocitrate lyase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem.* 2009 Dec 25;284(52):36282–91.

Bedos C., M. F. Rousseau-Djabri, D. Flura, S. Masson, E. Barriuso, and P. Cellier, Rate of pesticide volatilization from soil: an experimental approach with a wind tunnel system applied to trifluralin, *Atmospheric Environment*, 2002.v. 36, pp. 5917-5925.

Ben Youssef N, Nouairi I, Ben Temime S, Taamalli W, Zarrouk M, Ghorbal MH, et al. [Cadmium effects on lipid metabolism of rape (*Brassica napus* L.)]. *C R Biol.* 2005 Aug;328(8):745–57.

Benouaret, R., Goujon, E., Goupil, P., 2013. Plant defence inducer properties of grape marc extract. *IOBC-WPRS Bul.* 89, 95-97

Bennett MD. 1976. “DNA amount, latitude, and crop plant distribution.” *Environ. Exp. Bot.* 16(2-3):93-98, IN1-IN2, 99-108.

Besson-Bard A, Gravot A, Richaud P, Auroy P, Duc C, Gaymard F, et al. Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiol.* 2009 Mar;149(3):1302–15.

Beyer, P., Nivelestein, V., Albabili, S., Bonk, M., and Klelnig, H. (1994). Biochemical aspects of carotene desaturations and cyclization in chromoplast membranes from *Narcissus pseudonarcissus*. *Pure Appl. Chem*, 66, 1047-1056.

- Bickham JW, Smolen MJ. Somatic and heritable effects of environmental genotoxins and the emergence of evolutionary toxicology. *Environ Health Perspect.* 1994 Dec;102 Suppl 12:25–8.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot.* 2003 Jan;91 Spec No:179–94.
- Bolwell GP, Wojtaszek P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 1997 Dec;51(6):347–66.
- Bösl B, Grimminger V, Walter S. The molecular chaperone Hsp104--a molecular machine for protein disaggregation. *J Struct Biol.* 2006 Oct;156(1):139–48.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248–54.
- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ. ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J.* 2006 Jan;45(1):113–22.
- Brownlee JM, Johnson-Winters K, Harrison DHT, Moran GR. Structure of the ferrous form of (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase from *Streptomyces avermitilis* in complex with the therapeutic herbicide, NTBC. *Biochemistry.* 2004 Jun 1;43(21):6370–7.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol.* 1978;52:302–10.
- C EB-B. Bedos C. 2013 Dec 3 [cited 2014 Mar 7]; Available from: <http://www6.versailles-grignon.inra.fr/egc/Personnes/Annuaire-des-permanents2/Liste-A-B/Bedos-C>
- C.H.R. De Vos, V.M.T. Bookum, R. Vooijs, H. Schat, L.J. De Kok, Effect of copper on fatty acid composition and peroxidation of lipids in roots of copper tolerant and sensitive *Silene cucubalus*, *Plant Physiol. Biochem.* 31 (1993) 151–158.
- Calvet, R., E. Barriuso, C. Bedos, P. Benoit, M.-P.Charnay and Y. Coquet, 2005 - Les pesticides dans le sol, conséquences agronomiques et environnementales, Paris.
- Canard S., 2004, Devenir de l'atrazine dans l'environnement, Université de Toulouse, étude bibliographique, 75.
- Chaabane H, Cooper J-F, Azouzi L, Coste C-M. Influence of soil properties on the adsorption-desorption of sulcotrione and its hydrolysis metabolites on various soils. *J Agric Food Chem.* 2005 May 18;53(10):4091–5.
- Chaabane H, Vulliet E, Calvayrac C, Coste C-M, Cooper J-F. Behaviour of sulcotrione and mesotrione in two soils. *Pest Manag Sci.* 2008 Jan;64(1):86–93.

- Chakraborty R, Mukherjee AK, Mukherjee A. Evaluation of genotoxicity of coal fly ash in *Allium cepa* root cells by combining comet assay with the *Allium* test. *Environ Monit Assess.* 2009 Jun;153(1-4):351–7.
- Chebab S, Belli N, Leghouchi E, Lahouel M. Stress oxydatif induit par deux pesticides: l'endosulfan et le chlorpyrifos. *Environnement risques & santé.* 8(5):425–32.
- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 2000;22:442-51.
- Clive D, Spector JFS (1978) Comparative chemical mutagenesis: an overview. In □: Proceeding of comparative chemical mutagenesis workshop, De Serres F.J. (Eds.), National Institute for Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- Cnubben NH, Rietjens IM, Wortelboer H, van Zanden J, van Bladeren PJ. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2001 Sep;10(4):141–52.
- Compagnon, J. M., et Beraud, J. M. . Journées Internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes, Versailles, France.1992.351-356
- Constantin, M.J., and E.T. Owens, Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assays, A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*1982, 99, 1-12.
- Cools, K., Bulcke, R., et Callens, D. Response of replacement crop to soil-applied sulcotrione. *Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent.*, 1997 (64)721-726.
- Cunnif P. Official methods of analysis of AOAC International. 16th Edition. Editeur: Arlington, VA: AOAC international. 1995 , ISBN/ISSN 0935584544.
- DAS NK. Synthetic capacity of chromosome fragments correlated with their ability to maintain nucleolar material. *J Cell Biol.* 1962 Oct;15:121–30.
- Dat J, Vandenaabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci.* 2000 May;57(5):779–95.
- Dat JF, Pellinen R, Beeckman T, Van De Cotte B, Langebartels C, Kangasjärvi J, et al. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J.* 2003 Feb;33(4):621–32.
- Dayan, F. E., Singh N, McCurdy C. R, Godfrey C. A, Larsen L., Weavers R. T., Van Klink, J. W., et Perry, N. B. β -Triketone inhibitors of plant p-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase: modeling and comparative molecular field analysis of their interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2009 (57) 5194-5200.

- De Marco A, De Simone C, D'Ambrosio C, Owczarek M. Buthionine sulfoximine prevents the reduction of the genotoxic activity of maleic hydrazide by soil humic substances in *Vicia faba* seedlings. *Mutat Res.* 1999 Jan 13;438(2):89–95.
- De Marco A, De Simone C, Raglione M, Lorenzoni P. Influence of soil characteristics on the clastogenic activity of maleic hydrazide in root tips of *Vicia faba*. *Mutat Res.* 1995 Aug;344(1-2):5–12.
- Degrassi F, Rizzoni M. Micronucleus test in *Vicia faba* root tips to detect mutagen damage in fresh-water pollution. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects.* 1982 Feb;97(1):19–33.
- Del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M, Barroso JB. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot.* 2002 May;53(372):1255–72.
- del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., and Barroso, J.B. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol*, 2006, 141(2), 330-335
- Delgado EHB, Streck EL, Quevedo JL, Dal-Pizzol F. Mitochondrial respiratory dysfunction and oxidative stress after chronic malathion exposure. *Neurochem Res.* 2006 Aug;31(8):1021–5.
- Delledonne M. NO news is good news for plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2005 Aug;8(4):390–6.
- Desikan R, A.-H.-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ. Regulation of the Arabidopsis Transcriptome by Oxidative Stress. *Plant Physiol.* 2001 Sep 1;127(1):159–72.
- Di Corcia A, Marchetti M. Method Development for Monitoring Pesticides in Environmental Waters: Liquid- Solid Extraction Followed by Liquid chromatography. *Environ. Sci. Technol.*, 1992 (26) 1, 66-74
- Dixit V, Pandey V, Shyam R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J Exp Bot.* 2001 May;52(358):1101–9.
- Doublet J, Mamy L, Barriuso E. Delayed degradation in soil of foliar herbicides glyphosate and sulcotrione previously absorbed by plants: consequences on herbicide fate and risk assessment. *Chemosphere.* 2009 Oct;77(4):582–9.
- Duan CQ, Hu B, Jiang XH, Wen CH, Wang Z, Wang YX. Genotoxicity of water samples from Dianchi lake detected by the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat Res.* 1999 May 19;426(2):121–5.
- Duc G.. Faba bean (*Vicia faba*L.). *Field Crops Res.* 1997(53):99-109.
- Durzan DJ, Pedroso MC. Nitric oxide and reactive nitrogen oxide species in plants. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2002;19:293–337.

Egito LCM, Medeiros M das G, Medeiros SRB de, Agnez-Lima LF. Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 2007 Mar;30(2):435–41.

Elhajouji A, Tibaldi F, Kirsch-Volders M. Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes. *Mutagenesis*. 1997 May;12(3):133–40.

Ellis, M. K., Whitfield, A. C., Gowans, L. A., Auton, T., Provan, W. M., Lock, E.A., et Smith, L. L. Inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione and 2-(2-chloro-4-methanesulfonylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1995 (133), 12-19.

Evans HJ, Scott D. Influence of dna synthesis on the production of chromatid aberrations by x rays and maleic hydrazide in vicia faba. *Genetics*. 1964 Jan;49:17–38.

Eyheraguibel B, Richard C, Ledoigt G, Ter Halle A. Photoprotection by plant extracts: a new ecological means to reduce pesticide photodegradation. *J Agric Food Chem*. 2010 Sep 8;58(17):9692–6.

Fairchild JF, Ruessler DS, Haverland PS, Carlson AR. Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1997 May;32(4):353–7.

Fenech M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res*. 1997 Aug 1;392(1-2):11–8.

Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA. 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pestic. Biochem. Physiol.* 88(3):252-259.

Ferrara G, Loffredo E, Senesi N. Anticlastogenic, antitoxic and sorption effects of humic substances on the mutagen maleic hydrazide tested in leguminous plants. *European Journal of Soil Science*. 2004;55(3):449–58.

Fielding JL, Hall JL. A Biochemical and Cytochemical Study of Peroxidase Activity in Roots of *Pisum sativum* II. DISTRIBUTION of enzymes in relation to root development. *J Exp Bot*. 1978 Aug 1;29(4):983–91.

Fiskesjö G (1995) *Allium Test*. In: *In vitro toxicity testing protocols*, edited by O'Hare S, Atterwill CK. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 119-127.

Fourche R. Contribution à l'histoire de la protection phytosanitaire dans l'agriculture française, 2004, 1880-1970

Fourche, R. (2004). Contribution à l'histoire de la protection phytosanitaire dans l'agriculture française, 1880-1970. *Ruralia*, 2004-15, [En ligne], mis en ligne le 30 septembre 2005. URL: <http://ruralia.revue.org/document1049.html>. (consulté le 17 septembre 2007).

Foyer CH, Noctor G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*. 2005;28(8):1056–71.

- Foyer CH, Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Apr;11(4):861–905.
- Fryer MJ, Oxborough K, Mullineaux PM, Baker NR. Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *J Exp Bot*. 2002 May;53(372):1249–54.
- Gama F., 2010 Les glutarédoxines de la réduction des peroxyrédoxines de type II aux systèmes d'assemblage des centres fer-soufre, Université Henri Poincaré, Nancy I, étude bibliographique, 10-12.
- Gao X-H, Bedhomme M, Veyel D, Zaffagnini M, Lemaire SD. Methods for analysis of protein glutathionylation and their application to photosynthetic organisms. *Mol Plant*. 2009 Mar;2(2):218–35.
- Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*. 2010 Dec;48(12):909–30.
- Glover, JR., and Lindquist, S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins., *Cell* 94: 73-82, 1998.
- Godet E, Vasseur B, Sabut M. Essais de génotoxicité in vitro et in vivo applicables à l'environnement hydrique. *Revue des sciences de l'eau*. 1993;6(3):285.
- Gomes-Junior RA, Moldes CA, Delite FS, Pompeu GB, Gratão PL, Mazzafera P, et al. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere*. 2006 Nov;65(8):1330–7.
- Gottesman S. Protecting the neighborhood: extreme measures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Mar 17;95(6):2731–2.
- Goupil P, Benouaret R, Charrier O, Ter Halle A, Richard C, Eyheraguibel B, et al. Grape marc extract acts as elicitor of plant defence responses. *Ecotoxicology*. 2012 Jul;21(5):1541–9.
- Grant WF (1982b) Cytogenetic studies of agricultural chemicals in plants. In: *Genetic toxicology: An agricultural perspective*, edited by Fleck RA, Holsaender A. Plenum Press, New York, PP 353-378.
- Grant WF. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res*. 1982 Nov;99(3):273–91.
- Grant WF. 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag*. 310(2):175-185.
- Guo F-Q, Crawford NM. Arabidopsis nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell*. 2005 Dec;17(12):3436–50.
- Gupta RK, Miller KP, Babus JK, Flaws JA. Methoxychlor inhibits growth and induces atresia of antral follicles through an oxidative stress pathway. *Toxicol Sci*. 2006 Oct;93(2):382–9.
- Hartwig A. Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. *Toxicol Lett*. 1998 Dec 28;102-103:235–9.

- Haubruge, E., amichot, M., 1998. Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *Bitechnol. Agro. Soc. Environ.* 2(3), 161-174.
- Havaux M, Dall'osto L, Bassi R. Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in Arabidopsis leaves and functions independent of binding to PSII antennae. *Plant Physiol.* 2007 Dec;145(4):1506–20.
- Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 1968 Apr;125(1):189–98.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):986–94.
- Hellyer, R. O. The occurrence of β -triketones in the steam-volatile oils of some myrtaceous Australian plants. *Australian Journal of Chemistry*, 1968 (21) 2826-2828.
- Herman C, D'Ari R. Proteolysis and chaperones: the destruction/reconstruction dilemma. *Curr Opin Microbiol.* 1998 Apr;1(2):204-9.
- Hideg E, Barta C, Kálai T, Vass I, Hideg K, Asada K. Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photoinhibition or UV radiation. *Plant Cell Physiol.* 2002 Oct;43(10):1154–64.
- Hiner ANP, Raven EL, Thorneley RNF, García-Cánovas F, Rodríguez-López JN. Mechanisms of compound I formation in heme peroxidases. *J Inorg Biochem.* 2002 Jul 25;91(1):27–34.
- Hossain Z, Komatsu S. Contribution of proteomic studies towards understanding plant heavy metal stress response. *Front Plant Sci* [Internet]. 2013 Jan 25 [cited 2014 Mar 8];3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3555118/>
- Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:395–418.
- Inze D. et Montagu M.V., 2001. *Oxidative Stress in Plants*, CRC.
- Jacobson L. maintenance of iron supply in nutrient solutions by a single addition of ferric potassium ethylenediamine tetra-acetate. *Plant Physiol.* 1951 Apr;26(2):411–3.
- Kay, L.E. and D.V. Basile. 1987. Specific peroxidase isozymes are correlated with organogenesis. *Plant Physiol.* 84: 99-105.
- Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol.* 1993;23(1):21–48.
- Khessiba A, Hoarau P, Gnassia-Barelli M, Aissa P, Roméo M. Biochemical response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from Bizerta (Tunisia) to chemical pollutant exposure. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2001 Feb;40(2):222–9.
- Kim J-S, Kim T-J, Kwon OK, Cho KY. Mechanism of Action of Sulcotrione, a 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase Inhibitor, in Developed Plant Tissues. *Photosynthetica.* 2002 Dec 1;40(4):541–5.

- Kim Y-J, Park S-I, Park S-J, Kim H-H, Jung Y-W, Kwon J-T, et al. Molecular analysis of endogenous avian leukosis/sarcoma virus genomes in Korean chicken embryos. *J Vet Med Sci.* 2008 Jan;70(1):17–23.
- Kim, J. S., Kim, T.-J., Kwon, O. K., et Cho, K. Y.. Mechanism of action of sulcotrione, a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor, in developed plant tissues. *Photosynthetica* (2002), 40, 541-545.
- Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF. The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem.* 1987 Jan 15;262(2):660–6.
- Kirkwood TBL. Understanding the odd science of aging. *Cell.* 2005 Feb 25;120(4):437–47.
- Kirsch-Volders M. Towards a validation of the micronucleus test. *Mutat Res.* 1997 Aug 1;392(1-2):1–4.
- Knasmüller S, Gottmann E, Steinkellner H, Fomin A, Pickl C, Paschke A, et al. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutat Res.* 1998 Dec 3;420(1-3):37–48.
- Krause GH, Weis E. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 1991;42(1):313–49.
- Kreuger J. and Kylin H - Atmospheric transport and deposition of pesticides in Sweden. In: w. a. a. Pesticide behaviour in soils (Ed.), 2006.University of Warwick,. UK.
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol.* 2003;54:109–36.
- Langebartels C, Wohlgemuth H, Kschieschan S, Grün S, Sandermann H. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2002 Jun;40(6–8):567–75.
- Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E. Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol.* 2005 Jun;138(2):882–97.
- Lee D. L, Knudsen C. G, Michaely, W. J., Chin H.,Nguyen N. H., Carter C G, Cromartie, T. H., Lake, B. H., Shribbs, J. M., et Fraser, T. The structure–activity relationships of the triketone class of HPPD herbicides. 1998:*Pesticide Science*, 54, 377-384
- Lichtenthaler HK, Miehe JA. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Science.* 1997 Aug;2(8):316–20.
- Lindstedt, S., Holme, E., Lock, E. A., Hjalmarson, O., et Strandvik, B. Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *The Lancet*, 1992 (340) 813-817.
- López O, Hernández AF, Rodrigo L, Gil F, Pena G, Serrano JL, et al. Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. *Toxicol Lett.* 2007 Jul 10;171(3):146–53.

Ma TH, Xu Z, Xu C, McConnell H, Rabago EV, Arreola GA, et al. The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat Res.* 1995 Apr;334(2):185–95.

Mackinney G. Absorption of Light by Chlorophyll Solutions. *J Biol Chem.* 1941 Aug 1;140(2):315–22.

Mamy L, Barriuso E, Gabrielle B. 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.* 2005 Sep;61(9):905–16.

Marcano L, Carruyo I, Del Campo A, Montiel X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of Allium cepa L. *Environ Res.* 2004 Feb;94(2):221–6.

Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* 1999 Mar 8;424(1-2):83–95.

Martin J and Hartl F U, The effect of macromolecular crowding on chaperonin-mediated protein folding *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(4) 1107-12.

Matringe M., Sailland, A., Pelissier, B., Rolland, A., et Zink, O. p-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor-resistant plants. *Pest Management Science.* 2005 (61) 269-276.

Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 Jul 6;96(14):8271–6.

Mayonado DJ, Hatzios KK, Orcutt DM, Wilson HP. Evaluation of the mechanism of action of the bleaching herbicide SC-0051 by HPLC analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 1989 Oct;35(2):138–45.

Meyer, J. L., L. A. Kaplan, J. D. Newbold, D. L. Strayer, C. J. Woltemade, J. B. Zedler, R. Beilfuss, Q. Carpenter, R. Semlitsch, M.C. Watzin, and P. H. Zedler. Where rivers are born: The scientific imperative for defending small streams and wetlands. 2003 ,Sierra Club and American Rivers.

Michaely W J., et Kratz G W. Certains 2-(2-substituted benzoyl)-1,3-cyclohexanediones. In European patent application 0135191, 1986 Stauffer Chemical Compagny, assignée.

Minissi S, Caccese D, Passafiume F, Grella A, Eleonora C, Rizzoni M. Mutagenicity (micronucleus test in Vicia faba root tips), polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metal content of sediments collected in Tiber river and its tributaries within the urban area of Rome. *Mutat Res.* 1998 Dec 3;420(1-3):77–84.

Minissi S, Lombi E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by Vicia faba micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutat Res.* 1997 Sep 18;393(1-2):17–21.

Minouflet M, Ayrault S, Badot P-M, Cotelle S, Ferard J-F. Assessment of the genotoxicity of ¹³⁷Cs radiation using Vicia-micronucleus, Tradescantia-micronucleus and Tradescantia-stamen-hair mutation bioassays. *J Environ Radioact.* 2005;81(2-3):143–53.

Mirsal, I. A., 2004 - Soil pollution. Origin, monitoring and remediation, Springer-Verlag, Berlin, Germany. .

- Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Govindarajan R, Kuriakose SV, Prasad MNV. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiol Biochem*. 2006 Jan;44(1):25–37.
- Mitchell, G., Bartlett, D. W., Fraser, T. E. M., Hawkes, T. R., Holt, D. C., Townson, J. K., et Wichert, R. A. Mesotrione : a new selective herbicide for use in maize. *Pest Management Science*, 2001(57),120-128.
- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. *Trends Plant Sci*. 2002 (7) , 405-410.
- Monje-Casas F, Jurado J, Prieto-Alamo MJ, Holmgren A, Pueyo C. Expression analysis of the *nrdHIEF* operon from *Escherichia coli*. Conditions that trigger the transcript level in vivo. *J Biol Chem*. 2001 May 25;276(21):18031–7.
- Morimoto, R. I. BAG-1, a negative regulator of Hsp70 chaperone activity, uncouples nucleotide hydrolysis from substrate release. (1998). *EMBO J*.17, 6871-6878.
- Mouchet F, Baudrimont M, Gonzalez P, Cuenot Y, Bourdineaud JP, Boudou A, et al. Genotoxic and stress inductive potential of cadmium in *Xenopus laevis* larvae. *Aquat Toxicol*. 2006 Jun 15;78(2):157–66.
- Newton S, Bidleman T, Bergknut M, Racine J, Laudon H, Giesler R, et al. Atmospheric deposition of persistent organic pollutants and chemicals of emerging concern at two sites in northern Sweden. *Environ Sci Process Impacts*. 2013 Feb;15(2):298–305.
- Noctor G, De Paepe R, Foyer CH. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends Plant Sci*. 2007 Mar;12(3):125–34.
- Noctor G, Foyer CH. Homeostasis of adenylate status during photosynthesis in a fluctuating environment. *J Exp Bot*. 2000 Feb;51 Spec No:347–56.
- Norris SR, Barrette TR, DellaPenna D. Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell*. 1995 Dec;7(12):2139–49.
- Oracz K, El-Maarouf Bouteau H, Farrant JM, Cooper K, Belghazi M, Job C, et al. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant J*. 2007 May;50(3):452–65.
- Pallett, K. E., Cramp, S. M., Little, J. P., Veerasekaran, P., Crudace, A. J., et Slater, A. E. Isoxaflutole: the background to its discovery and the basis of its herbicidal properties. *Pest Management Science*, 2001(57) 133-142.
- Parsell DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet*. 1993;27:437–96.
- Patra J, Sahoo MK, Panda BB. Salicylic acid triggers genotoxic adaptation to methyl mercuric chloride and ethyl methane sulfonate, but not to maleic hydrazide in root meristem cells of *Allium cepa* L. *Mutat Res*. 2005 Mar 7;581(1-2):173–80.
- Petersen Shay K, Moreau RF, Smith EJ, Hagen TM. Is alpha-lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. *IUBMB Life*. 2008 Jun;60(6):362–7.

Pitzschke A, Forzani C, Hirt H. Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Oct;8(9-10):1757–64.

Potters, G., De Gara, L., Asard, H., & Horemans, N. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002, Vol.40, No.6-8, 537-548.

Pourrut B. Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. 2008

Pronicka, E., Rowinska, E., Bentkowski, Z., Zawadzki, J., Holme, E., et Lindstedt, S. Treatment of two children with hereditary tyrosinaemia type I and long-standing renal disease with a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor (NTBC). *J Inherit Metab Dis*.1997(19), 234-238.

Qian Z, Zhao J, Bai X, Tong W, Chen Z, Wei H, et al. Thermal Stability of Glucokinases in *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Biomed Res Int [Internet]*. 2013 [cited 2014 Mar 7];2013. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3766608/>

Rachmilovich-Calis S, Masarwa A, Meyerstein N, Meyerstein D, van Eldik R. New mechanistic aspects of the Fenton reaction. *Chemistry*. 2009 Aug 17;15(33):8303–9.

Radetski CM, Ferrari B, Cotelle S, Masfaraud J-F, Ferard JF. Evaluation of the genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste incinerator bottom ash leachates. *Sci Total Environ*. 2004 Oct 15;333(1-3):209–16.

Rahoui S, Chaoui A, Ferjani E. 2008. Differential sensitivity to cadmium in germinating seeds of three cultivars of faba bean (*Vicia faba*L.). *Acta Physiol. Plant*. 30(4):451-456.

Rank J, Nielsen MH. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutat Res*. 1997 Apr 24;390(1-2):121–7.

Reddy, K. N. et Bhowmik, P. C. ICIA -0051 for Postemergence Weed Control in Conventional Corn (*Zea mays*). *Weed Technology*, 1991(5) 509-512.

Rentel MC, Knight MR. Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2004 Jul;135(3):1471–9.

Requena JR, Chao CC, Levine RL, Stadtman ER. Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Jan 2;98(1):69–74.

Rieger R, Michaelis A, Green M. 1968. *A glossary of genetics and cytogenetics*, 3rd Eds. London: Allen and Unwin. 507 p.

Rinalducci S, Pedersen JZ, Zolla L. Generation of reactive oxygen species upon strong visible light irradiation of isolated phycobilisomes from *Synechocystis* PCC 6803. *Biochim Biophys Acta*. 2008 May;1777(5):417–24.

Rizzoni M, Tanzarella C, Gustavino B, Degrassi F, Guarino A, Vitagliano E. Indirect mitotic nondisjunction in *Vicia faba* and Chinese hamster cells. *Chromosoma*. 1989 Jan;97(4):339–46.

- Rodriguez-Ariza A. 1993. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Can. J. Fish. Aquat.Sci.*, 50, 2568-2573.
- Romero-Puertas, M.C., Palma, J. M., Gomez, M., del Rio, I.A., Sandalio, L. M. (2002) Cadmium causes the oxidative modification of protein in pea plants; In Drazkiewicz, M. ed. The redox state and activity of superoxide dismutase classes in *Arabidopsis thaliana* under cadmium or copper stress. *Chemosphere* 67 (2007); 188–193.
- Rosa EVC, Valgas C, Souza-Sierra MM, Corrêa AXR, Radetski CM. Biomass growth, micronucleus induction, and antioxidant stress enzyme responses in *Vicia faba* exposed to cadmium in solution. *Environ Toxicol Chem.* 2003 Mar;22(3):645–9.
- Rosenfeldt EJ, Linden KG, Canonica S, von Gunten U. Comparison of the efficiency of *OH radical formation during ozonation and the advanced oxidation processes O₃/H₂O₂ and UV/H₂O₂. *Water Res.* 2006 Dec;40(20):3695–704.
- Rosenqvist E, van Kooten O, 2003. Chlorophyll fluorescence: a general description and nomenclature. In DeEll JR, Toivonen PMA. (Eds), *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. Kluwer, Dordrecht, pp. 32–77.
- Rouchaud J, Neus O, Callens D, Bulcke R. Isoxaflutol herbicide soil persistence and mobility in summer corn and winter wheat crops. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1998 Apr;60(4):577–84.
- Sang N, Li G. Genotoxicity of municipal landfill leachate on root tips of *Vicia faba*. *Mutat Res.* 2004 Jun 13;560(2):159–65.
- Sanmartin M, Pateraki I, Chatzopoulou F, Kanellis AK. Differential expression of the ascorbate oxidase multigene family during fruit development and in response to stress. *Planta.* 2007 Mar;225(4):873–85.
- Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Jul;38(7):995–1014.
- Scandalios JG. The rise of ROS. *Trends Biochem Sci.* 2002 Sep;27(9):483–6.
- Schneider, E.A. and F. Wightman. 1974. Metabolism of auxin in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 487-513.
- Schulz A, Ort O, Beyer P, Kleinig H. SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Lett.* 1993 Mar 1;318(2):162–6.
- Schützendübel A, Polle A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot.* 2002 May;53(372):1351–65.
- Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, et al. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiol.* 2001 Nov;127(3):887–98.
- Sellami.B.,Dellali. M.,Beyrem. H., Khazri. A., Aïssa. P., Mahmoudi E. Variation temporelle de l'activité catalase chez la palourde *Ruditapes decussatus* Linnaeus, 1758 contaminée par la

perméthrine (étude en mésocosme). Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie, 2012, n° 34 (2), p. 137-144.

Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997 Mar;82(2):291–5.

Sies H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr.* 1991 Dec 15;69(21-23):965–8.

smirnoff N., Foyer C., Dietz K., Mittler R., Feierabend J., Grace S., Desikan R., Jones M., reeburg R., Logan B. et Jaspers P., 2005. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, Blackwell publishing

Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med.* 2002 Sep 1;33(5):575–86.

Solé M, Porte C, Albaigés J. The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels. *Sci Total Environ.* 1995 Jan 10;159(2-3):147–53.

Souguir D, Ferjani E, Ledoigt G, Goupil P. Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper-induced genotoxicity. *Protoplasma.* 2008 Nov;233(3-4):203–7.

Sparrow AH, Underbrink AG, Rossi HH. Mutations induced in *Tradescantia* by small doses of x-rays and neutrons: analysis of dose-Response curves. *Science.* 1972 May 26;176(4037):916–8.

Sta C, Ledoigt G, Ferjani E, Goupil P, Exposure of *Vicia faba* to sulcotrione pesticide induced genotoxicity, *Pestic. Biochem. Physiol.* 2012(103) 9–14.

Taylor NL, Heazlewood JL, Day DA, Millar AH. Lipoic acid-dependent oxidative catabolism of alpha-keto acids in mitochondria provides evidence for branched-chain amino acid catabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2004 Feb;134(2):838–48.

Ter Halle A, Drncova D, Richard C. Phototransformation of the herbicide sulcotrione on maize cuticular wax. *Environ Sci Technol.* 2006 May 1;40(9):2989–95.

Townson, J., Kemp, J., Cory, P., Bartlett, D., Sutton, P., Collins, D., et Wichert, R. Mode of action of HPPD-inhibiting herbicides. The XIVth International Plant Protection Congress (IPPC)(1999). Jerusalem, Israel, *Phytoparasitica*, 28, 2.

Tsegaye, Y., Shintani, D. K., et DellaPenna, D.(2002). Overexpression of the enzyme p hydroxyphenolpyruvate dioxygenase in *Arabidopsis* and its relation to tocopherol biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 913-920.

Tung G, Temple PJ. Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays* L.) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy. *Sci Total Environ.* 1996 Oct 11;188(2-3):71–85.

Tyburski J, aw, Dunajska-Ordak K, Skorupa M, Tretyn A. Role of Ascorbate in the Regulation of the *Arabidopsis thaliana* Root Growth by Phosphate Availability. *Journal of*

Botany [Internet]. 2012 Jan 12 [cited 2014 Mar 7];2012. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jb/2012/580342/abs/>

- Van Breusegem F, Dat JF. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol.* 2006 Jun;141(2):384–90.
- Van Breusegem F, E Vranova, JF Dat and D Inze (2001). “The role of active oxygen species in plant signal transduction.” *Plant Science* 161(3): 405-414.
- Verma, R.S., A. Mehta and N. Srivastava, 2007. In vivo chlorpyrifos induced oxidative stress: Attenuation by antioxidant vitamins. *Pesticide Biochem. Physiol.*, 88: 191-196. DOI: 10.1016/j.pestbp.2006.11.002.
- Viel J.F, Challier B, Pitard A, Pobel D, Brain cancer mortality among French farmers: the vineyard pesticide hypothesis. *Arch. Environ. Health.* 1998 (53) 65–70
- Wagner AM. A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *FEBS Lett.* 1995 Jul 17;368(2):339–42.
- Wang TS, Huang H. Active oxygen species are involved in the induction of micronuclei by arsenite in XRS-5 cells. *Mutagenesis.* 1994 May;9(3):253–7.
- White PA, Robitaille S, Rasmussen JB. Heritable reproductive effects of benzo[a]pyrene on the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry.* 1999;18(8):1843–7.
- Wierzbicka M. Lead translocation and localization in *Allium cepa* roots. *Canadian journal of botany.* 65(9):1851–60.
- Wiszniewski J, ter Halle A, Richard C, Hitmi A, Ledoigt, G. 2009. Photodegradation product of sulcotrione and the physiological response of maize (*Zea mays*) and white mustard (*Sinapis alba*). *Chemosphere* 74:1224–1230
- Wormuth D, Heiber I, Shaikali J, Kandlbinder A, Baier M, Dietz K-J. Redox regulation and antioxidative defence in *Arabidopsis* leaves viewed from a systems biology perspective. *J Biotechnol.* 2007 Apr 30;129(2):229–48.
- Yaron, B., R. Calvet and R. Prost, *Soil pollution, Processes and dynamics*, 1996. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Yoshikawa T., Yamamoto Y., Naito Y., *Free radicals in chemistry, Biology and Medicine*, Ed. Oica International, Londres, 2000.
- Zago E, Morsa S, Dat JF, Alard P, Ferrarini A, Inzé D, et al. Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiol.* 2006 Jun;141(2):404–11.
- Zámocký M, Koller F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog Biophys Mol Biol.* 1999;72(1):19–66.

ANNEXES :

Annexe I

1 - IDENTITÉ

Substance active : sulcotrione

Source de l'information : Règlement n° 1107/2009

Activité biologique principale : herbicide

Famille chimique : tricétone

Dénominations

ISO : sulcotrione

NOU : sulcotrione

PRO : sulcotrione

ANC : chlormesulone

CAS : 99105-77-8

Noms chimiques

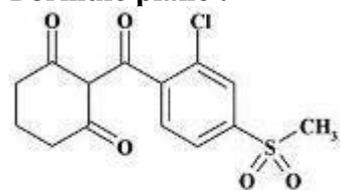
Formule brute : C₁₄ H₁₃ Cl O₅ S

CA : 2-[2-chloro-4-(methylsulfonyl)benzoyl]-1,3-cyclohexanedione

IUPAC : 2-(2-chloro-4-mesylbenzoyl)cyclohexane-1,3-dione

Poids moléculaire : 328.77

Formule plane :



2 - PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES

2.1 ETAT PHYSIQUE

- solide amorphe

2.2 PRESSION DE VAPEUR (TENSION DE VAPEUR)

- 5.39 μPa à 25 °C

2.3 CONSTANTE DE HENRY

2.4 SOLUBILITÉS DANS L'EAU

- **0.165 g/L** à 25 °C

2.5 SOLUBILITÉS DANS LES SOLVANTS ORGANIQUES

- **acetone : 40 g/L** à 25 °C
- **chlorobenzene : 10 g/L** à 25 °C
- **ethanol : <6 g/L** à 25 °C
- **xylene : <6 g/L** à 25 °C

2.6 COEFFICIENT DE PARTAGE OCTANOL/EAU

2.7 VITESSE D'HYDROLYSE (STABILITE)

- **temps de demi-vie : 100 jour(s)** à 25 °C et au pH de 7 - EPA

2.8 VITESSE DE PHOTOLYSE DANS L'EAU

2.9 DISSOCIATION DANS L'EAU

3 - TOXICITÉ

3.1 ABSORPTION, DISTRIBUTION, ÉLIMINATION ET MÉTABOLISME

3.2 ABSORPTION CUTANÉE

3.3 TOXICITÉ AIGUË PAR VOIE ORALE

- **DL50 rat : >5000 mg/kg** - Sexe : MF - Souche : Sprague Dawley - Véhicule : en solution dans l'huile de maïs - Méthode : EPA / OCDE

3.4 TOXICITÉ AIGUË PAR VOIE DERMAL

- **DL50 lapin : >4000 mg/kg** - Sexe : MF - Souche : Stauffland - Méthode : EPA / OCDE

3.5 TOXICITÉ AIGUË PAR INHALATION

- **Toxicité aigue par inhalation, 4 heures, rat** - Sexe : MF - Souche : Wistar derive
CL50 : \geq 1.63 mg/l d'air

3.6 IRRITATION CUTANÉE

- **Test d'irritation cutanée, lapin : non irritant** - Méthode : Draize

3.7 IRRITATION OCULAIRE

- **Test d'irritation oculaire, lapin : modérément irritant** - Méthode : Draize

3.8 SENSIBILISATION CUTANÉE

- **Sensibilisation retardée par voie cutanée, cobaye : sensibilisant**
Magnusson et Kligmann

3.9 GÉNOTOXICITÉ

3.10 TOXICITÉ À TERME ET CANCÉROGÉNÈSE

- **Toxicité par voie orale, 2 ans , rat** - Sexe : M - Souche : CD
NOAEL = 1 ppm
- **Toxicité par voie orale, 2 ans , rat** - Sexe : F - Souche : CD
NOAEL = 20 ppm
- **Toxicité par voie orale et étude de la cancérogenèse, 18 mois , souris** - Sexe : M -
Souche : CD-1
NOAEL = 3000 ppm
- **Toxicité par voie orale et étude de la cancérogenèse, 18 mois , souris** - Sexe : F -
Souche : CD-1
NOAEL = 350 ppm

3.11 TOXICITÉ SUR LA REPRODUCTION ET LE DÉVELOPPEMENT

- **Reproduction sur deux générations par voie orale, rat**
DSE parents = 0.05 mg/kg/j
DSE descendance = 0.05 mg/kg/j
DSE reproduction = 0.5 mg/kg/j
toxicite generale
- **Tératogenèse par voie orale, rat**
DSE foetus = 100 mg/kg/j
- **Tératogenèse par voie orale, lapin**
DSE foetus = 300 mg/kg/j

3.12 NEUROTOXICITÉ

3.13 AUTRES ÉTUDES

3.14 DOSE JOURNALIÈRE ACCEPTABLE (DJA)

- **DJA = 0.0004 mg/kg/j** NOAEL = 0.04 mg/kg p.c./j (2 ans, voie orale, rat)
(Décision de l'Union Européenne)

- la DJA est basée sur une LOAEL mais le facteur de sécurité 100 est suffisant compte tenu de la pente de la courbe dose-réponse

3.15 DOSE DE RÉFÉRENCE AIGUË (DRfA ou ARfD)

- **ARFD : non pertinent**
(Décision de l'Union Européenne)

3.16 NIVEAU D'EXPOSITION ACCEPTABLE POUR L'OPÉRATEUR (NEAO ou AOEL)

- **AOEL = 0.0006 mg/kg/j** NOAEL = 0.06 mg/kg p.c./j (Reproduction sur deux générations, rat)
(Décision de l'Union Européenne)

4 - COMPORTEMENT DANS L'ENVIRONNEMENT

4.1 COMPORTEMENT DANS LE SOL

4.1.1 VOIES DE DEGRADATION

4.1.2 VITESSE DE DEGRADATION

4.1.2.1 VITESSE DE DEGRADATION : EN LABORATOIRE, CONDITIONS AÉROBIES

- **Substance active**
DT50 (exprimé en **jours**) : **24**
DT90
Temp : 25 °C
Sol : limon fin - USA - Atterberry / Iowa - MO : 4.2 % - pH : 5.6
- **Substance active**
DT50 (exprimé en **jours**) : **15**
DT90
Temp : 25 °C
Sol : sable - FRA - Toulouse - MO : 1.4 % - pH : 5.2
- **Substance active**
DT50 (exprimé en **jours**) : **74**
DT90
Temp : 25 °C
Sol : limon sableux - USA - San Jose - MO : 0.3 % - pH : 7.3

4.1.2.2 VITESSE DE DEGRADATION : EN LABORATOIRE, CONDITIONS ANAEROBIES

4.1.2.3 VITESSE DE DEGRADATION : AU CHAMP

- **Substance active**
DT50 (exprimé en **jours**) - Min : **2** - Max : **6**
DT90
Sol :

4.1.2.3 VITESSE DE DEGRADATION

4.1.2.4 PHOTODEGRADATION : EN LABORATOIRE, CONDITIONS AEROBIES

4.1.2.5 PHOTODEGRADATION : EN LABORATOIRE, CONDITIONS ANAEROBIES

4.1.2.5 PHOTODEGRADATION

4.1.3 MOBILITE DANS LE SOL : ADSORPTION

- **Substance active**
Koc (exprimé en **mL/g**) : **6.6** -
Sol : sable - FRA - Toulouse - %MO : 1.4 % - pH : 5.2
- **Substance active**
Koc (exprimé en **mL/g**) : **5.3** -
Sol : limon sableux - FRA - Velisy - %MO : 6.6 % - pH : 4.9
- **Substance active**
Koc (exprimé en **mL/g**) : **8.98** -
Sol : limon sableux - USA - San Jose - %MO : 0.3 % - pH : 7.3
- **Substance active**
Koc (exprimé en **mL/g**) : **1.82** -
Sol : limon fin - USA - Atterberry / Iowa - %MO : 4.2 % - pH : 5.6
- **Substance active**
Koc (exprimé en **mL/g**) : **1.08** -
Sol : limon argileux - USA - Luling - %MO : 1.8 % - pH : 7.5
- **Substance active**
Koc (exprimé en **mL/g**) : **123** -
Sol : limon sableux - USA - %MO : 2 %
- **Substance active**
Koc (exprimé en **mL/g**) : **160** -
Sol : argile - X - %MO : 1.7 %

- **Substance active**
Koc (exprimé en mL/g) : 17 -
Sol : limon - X - %MO : 2.1 %
- **Substance active**
Koc (exprimé en mL/g) Min : 1.08 - Max : 8.98
Sol :

4.1.4 MOBILITE DANS LE SOL

4.1.4.1 MOBILITE DANS LE SOL : AUTRES ETUDES AU LABORATOIRE

4.1.4.2 MOBILITE DANS LE SOL : AUTRES ETUDES AU CHAMP

4.2 COMPORTEMENT DANS L'EAU

4.2.1 PRODUITS D'HYDROLYSE

4.2.2 VITESSE D'HYDROLYSE

- temps de demi-vie : **100 jour(s)** à 25 °C et au pH de 7 - EPA

4.2.3 PRODUITS DE PHOTOLYSE DANS L'EAU

4.2.4 VITESSE DE PHOTOLYSE DANS L'EAU

4.2.5 BIODEGRADATION FACILE

4.2.6 VOIES DE DEGRADATION DANS LE SYSTEME EAU-SEDIMENT

4.2.7 VITESSE DE DISSIPATION DANS LE SYSTEME EAU-SEDIMENT

4.2.7.1 VITESSE DE DISSIPATION - CONDITIONS AEROBIES, OBSCURITE

4.2.7.2 VITESSE DE DISSIPATION - CONDITIONS AEROBIES, LUMIERE

4.2.7.3 VITESSE DE DISSIPATION - CONDITIONS ANAEROBIES, OBSCURITE

4.2.7.4 VITESSE DE DISSIPATION - CONDITIONS ANAEROBIES, LUMIERE

4.2.7.5 VITESSE DE DISSIPATION

4.3 COMPORTEMENT DANS L'AIR

4.3.1 PRESSION DE VAPEUR

- **5.39 µPa** à 25 °C

4.3.2 CONSTANTE DE HENRY

4.3.3 VITESSE DE DEGRADATION DANS L'AIR

5 - ÉCOTOXICITÉ

5.1 EFFETS SUR LES OISEAUX ET SUR LES AUTRES VERTÉBRÉS TERRESTRES

5.1.1 TOXICITÉ ORALE AIGUË CHEZ LES OISEAUX

- **Anas platyrhynchos - DL50 : >1350 mg/kg p.c.** - Véhicule : en solution dans l'huile de maïs - Méthode : EPA
- **Colinus virginianus - DL50 : >2250 mg/kg p.c.** - Véhicule : en solution dans l'huile de maïs - Méthode : EPA

5.1.2 TOXICITÉ ALIMENTAIRE CHEZ LES OISEAUX

- **Anas platyrhynchos - CL50 : >5620 mg/kg aliment** - Durée d'exposition : 5 jours - Véhicule : en solution dans l'huile de maïs - Méthode : EPA
- **Colinus virginianus - CL50 : >5620 mg/kg aliment** - Durée d'exposition : 5 jours - Véhicule : en solution dans l'huile de maïs - Méthode : EPA

5.1.3 TOXICITÉ SUR LA REPRODUCTION CHEZ LES OISEAUX

5.1.4 TOXICITÉ ORALE AIGUË CHEZ LES AUTRES VERTÉBRÉS TERRESTRES

5.1.5 TOXICITÉ CHRONIQUE CHEZ LES AUTRES VERTÉBRÉS TERRESTRES

5.2 EFFETS SUR LES ORGANISMES AQUATIQUES

5.2.1 TOXICITÉ AIGUË CHEZ LES POISSONS

- **Cyprinus carpio - CL50 : 240 mg/L** - Durée d'exposition : 96 heures - Exposition statique
- **Oncorhynchus mykiss (ex Salmo gairdneri) - CL50 : 227 mg/L** - Durée d'exposition : 96 heures - Exposition statique

5.2.2 TOXICITÉ CHRONIQUE CHEZ LES POISSONS

5.2.3 BIOCONCENTRATION CHEZ LES POISSONS

5.2.4 TOXICITÉ AIGUË CHEZ LES INVERTÉBRÉS AQUATIQUES VIVANT DANS L'EAU OU LE SÉDIMENT

- **Daphnia magna - CE50 : >100 mg/L** - Durée d'exposition : 24 heures

Daphnia magna - CE50 : >100 mg/L - Durée d'exposition : 48 heures

5.2.5 TOXICITÉ CHRONIQUE CHEZ LES INVERTÉBRÉS AQUATIQUES VIVANT DANS L'EAU OU LE SÉDIMENT

5.2.6 EFFETS SUR LA CROISSANCE DES ALGUES ET SUR LES PLANTES AQUATIQUES

- algue - CEB50 : 3.5 mg/L

5.2.7 AUTRES ÉTUDES AQUATIQUES - EFFETS SUR MICRO ET MÉSOCOSMES

5.2.8 CONCENTRATION SANS EFFET PREVISIBLE POUR LES ORGANISMES AQUATIQUES (PNEC)

- PNEC = 5.1 µg/L basée sur :

matériel de test : sulcotrione

étude : toxicité chez la plante aquatique (Lemna gibba)

CE50 = 0.051 mg/L FS = 10

décision de AF le 30/03/10

5.3 EFFETS SUR LES ABEILLES

5.3.1 TOXICITÉ AIGUË

- Abeille - DL50 Contact : >200 µg/abeille - DL50 Orale : >50 µg/abeille

5.4 EFFETS SUR LES ARTHROPODES TERRESTRES AUTRES QUE LES ABEILLES

5.5 EFFETS SUR LES VERS DE TERRE ET AUTRES MACRO-ORGANISMES NON CIBLES DU SOL supposés être exposés à un risque

5.5.1 TOXICITÉ AIGUË

5.5.2 EFFETS SUR LA REPRODUCTION

5.6 EFFETS SUR MICRO-ORGANISMES NON CIBLES DU SOL

5.7 EFFETS SUR D'AUTRES ORGANISMES NON CIBLES (FLORE ET FAUNE) supposés être exposés à un risque

5.8 EFFETS SUR LES MÉTHODES BIOLOGIQUES DE TRAITEMENT DES EAUX USÉES

6 - VALEURS REGLEMENTAIRES

CLASSEMENT TOXICOLOGIQUE - Directive substances dangereuses (67/548/CEE)

Xn N R43 R48/22 R50/53 R63

Classe(s) CMR :

Substance toxique pour la reproduction, troisième catégorie

Nocif (Xn)

Dangereux pour l'environnement

R43 peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau

R48/22 nocif : risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée par ingestion

R50/53 très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique

R63 risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant

CLASSEMENT TOXICOLOGIQUE - CLP (CE 1272/2008)

ATP 5

Pictogramme(s) de danger :



SGH07



SGH08

Mention d'avertissement : Attention

Sensibilisation cutanée, catégorie 1A

H317 Peut provoquer une allergie cutanée

Toxicité pour la reproduction, catégorie 2(d)

H361d Susceptible de nuire au fœtus

Toxicité spécifique pour certains organes cibles - Exposition répétée, catégorie 2

H373 Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée

Dangers pour le milieu aquatique - Danger aigu, catégorie 1, Facteur M aigu : 1 (ANSES en

accord avec le règlement 1272/2008)

H400 Très toxique pour les organismes aquatiques

Dangers pour le milieu aquatique - Danger chronique, catégorie 1, Facteur M chronique : 1
(ANSES en accord avec le règlement 1272/2008)

H410 Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme

Annexe II :

A-Extraction des ARN- Système KIT TRI-REAGENT (Sigma ou Euromedex)

-Broyage des tissus dans N2 Liquide.

-Transfert du broyat dans des tubes eppendorf 2mL stérile.

Attention : le broyat ne doit pas dépasser le 1/3 du tube pour obtenir une purification différentielle des ARN vis-à-vis de l'ADN génomique.

-Ajouter 1mL de TRI-REAGENT- Agiter dans un vortex.

-Lyser 5 min dans la glace

-Ajouter 300 μ L de chloroforme (déprotéination) - Agiter dans un vortex.

- Séparation des phases 15 min dans la glace

-Centrifuger 15 min, 12000xg, 4°C

-Récupérer la phase aqueuse dans un tube stérile

-Ajouter 850 μ L d'isopropanol (Agiter doucement par renversement)

-Laisser 10 à 15 min à température ambiante (précipitation des ARN)

-Centrifuger 15 min, 12000xg, 4°C

-Eliminer complètement et minutieusement l'éthanol et sécher le culot à l'air

-Resuspendre le culot dans 30 μ L d'eau stérile

La resuspension peut être assez longue si les ARN ne sont pas purs. Laisser resuspendre dans la glace et tapoter le tube

-Centrifuger 15 min, 12 000xg, 4°C

Cette étape est indispensable pour se débarrasser de toutes les insolubilités pouvant fausser le dosage des ARN

- Récupérer délicatement le surnageant contenant les ARN solubilisés

-Stocker les ARN à - 80°C (ou à -20°C pour un stockage non prolongé)

B-Gel de Contrôle pour tester l'intégrité des ARN

L'électrophorèse des ARN en gel d'agarose nécessite l'utilisation de tampon stérile (autoclavé) et fraîchement préparé.

TAE 50X :

Pour 1 litre de tampon TAE 50X : 242g Tris base, 100mL EDTA 0,5 M (pH 8), ramener pH 8 avec acide acétique glacial (57.1 mL)

Préparation du tampon de migration :

Préparation de 600ml de tampon TAE 1x

Préparation de gel de migration : gel d'agarose 1% :

-Peser 1,5g d'agarose, ajouter 150ml de solution tampon TAE1x, faire fondre au micro-onde, laisser refroidir, ajouter le Bromure d'Ethidium (BET) à 0,5µg/mL

-Couler le gel d'agarose le jour même de la migration des ARN.

*Pour la cuve Midigel (10x13 cm) : 150mL de gel, 600 mL de tampon de migration

*Pour la cuve Minigel (8x10.5 cm) : 100mL de gel, 250 mL de tampon de migration

-Faire migrer 1 à 2 µg d'ARN par puits en présence de tampon de charge (mélange d'Orange G dans 30% de glycérol)

-Migration sous 80 volts, pendant 2 à 3 heures environ.

-La visualisation des ARN s'effectue sur la table UV.

Bonne intégrité des ARN : Visualisation des ARN ribosomiques 28S, 18S et 5S.

Mauvaise intégrité des ARN : Observation de trainés sous les bandes d'ARN ribosomiques indiquant leur dégradation.

C-Synthèse des ADNc (Reverse Transcriptase Core Kit, RT-RTCK-03, Eurogentec)

-Préparer une série de tubes de thermocycleur contenant 1µL d'ARN totaux (800ng) + 3µL de RNase Free Water

-Placer les tubes dans le thermocycleur pendant 2 min à 70°C : Etape de dénaturation des ARN puis retour rapide à 4°C pour éviter la renaturation

-Ajouter 6µL de solution de mix

Préparation de la solution de mix :

Pour x + 1 échantillons (ou + 2 au dessus de 10 échantillons):

Milieu réactionnel pour 1 échantillon d'ARN

- 1µL Tampon 10x

- 2µL de la solution de MgCl₂ 25mM (5mM final)

- 2 μ L de la solution dNTP 2.5mM (500 μ M final)
- 0.5 μ L d'Oligod(t)15 ou. "Random nonamer" (2.5 μ M final)
- 0.2 μ L "RNase Inhibitor" 0.4 U/ μ L)
- 0.25 μ L "EuroScript RT" (1.25 U/ μ L)

=6 μ L : Volume total de la solution mix

-Bien homogénéiser la solution de mix puis la centrifuger avant de la répartir dans les réactions individuelles des échantillons d'ARN.

-Placer les tubes dans le thermocycleur

- 10 min 25°C : Etape initiale (hybridation des amorces oligod(T))
- 30 min 48°C : Etape "Reverse Transcription"
- 5 min 95°C : Inactivation de la "Reverse Transcriptase"
- Retour à 4°C
- Stocker les ADNc à -20°C

D-Vérification de la synthèse des ADNc

RT-PCR de vérification de la synthèse des ADNc :

-1 à 5 μ L d'ADNc (représentant alors 0,2 à 1ng)

-47 μ L de "mix" par échantillon contenant

- 5 μ L "PCR Buffer 10x"
- 1 μ L de la solution dNTP (10mM chacun)
- 3 μ L de la solution de MgCl₂
- 1 μ L d'amorce "sens"
- 1 μ L d'amorce "anti-sens"
- 0.5 μ L Taq DNA polymerase
- Eau stérile qsp 50 μ L

-Mettre les échantillons dans le thermocycleur pendant 25 à 36 cycles, chaque cycle comporte 3 phases :

- 30 sec à 95°C: Dénaturation

- 30 sec à 56°C: Hybridation des amorces spécifiques (*T_m* variant selon les amorces)
- 30 sec à 72°C: Elongation
- Laisser 10 min à 72°C pour obtenir des produits de PCR

E-Purification de l'ADN (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit) (Amersham Pharmacia Biotech)

- Faire une électrophorèse en gel d'agarose 0,9%
- Couper les bandes obtenues et les récupérer les bandes dans des tubes Eppendorf
- Peser le gel : Il ne faut pas dépasser 300mg de gel/tube
- Ajouter un volume de "Capture buffer" qui est égal à la masse de gel
- Faire fondre le gel dans un bain-marie à 60°C pendant 15 min.
- Pendant l'incubation, placer le "GFX Column" sur le "Collection Tube"
- Après la fonte complète du gel, centrifuger brièvement
- Transférer l'échantillon dans la "GFX Column " et laisser 1min à température ambiante
- Centrifuger en microcentrifugeuse (10.000 à 16.000xg) pendant 30 sec
- Jeter le contenu de "Collection Tube " et ajouter 500µL de "Wash Buffer " à la colonne, laisser 1 min à Température ambiante
- Centrifuger 30 sec
- Placer la colonne sur des tubes de 1.5 mL.
- Ajouter 10µL de la solution d'élution (qui consiste soit à une solution de :Tris-HCl 1mM pH 8.0, TE pH 8.0 soit du l'eau bidistillée et autoclavée) pour avoir l'ADN purifiée
- Laisser 1 min à la température ambiante
- Centrifuger 1 min
- Ajouter 10µL de la solution d'élution

Laisser 1 min à température ambiante et centrifuger pendant 1 min

F-qPCR = PCR quantitative en temps réel (MasterMix, Plus pour SYBER Green, Eurogentec)

Milieu réactionnel :

2.5µL d'ADNc à déposer dans les puits de la microplaque.

Protocole du mix pour x + 2 échantillons :

- 12.5µL reaction buffer 2x ;
- 1µL d'amorce "sens" à 5ng/µL ;
- 1µL d'amorce "anti-sens" à 5ng/µL ;
- Eau stérile qsp 25µL.

Amplification :

2 min à 50°C : Etape initiale : Dégradation des simples brins ARN par Uracil-N glycosylase.

10 min à 95°C : Activation de la polymérase et inactivation de l'Uracil-N glycosylase

30s à 95°C : Dénaturation

30s à 56°C : Hybridation, température selon le Tm des amorces

30s à 72°C : Elongation.

} 42 cycles

Retour à 4°C

Pour établir la courbe de fusion :

80 cycles de 46°C à 86°C avec une montée en température de 0.5°C par cycle.

Résumé

La toxicité cellulaire potentielle de la sulcotrione 2-(2-chloro-4-(méthylsulfonyl)benzoyl)-1,3-cyclohexanedione, un herbicide sélectif tricétonique a été évaluée sur *Vicia faba* et *Allium cepa*. La génotoxicité a été étudiée sur une culture hydroponique pour des traitements à différentes concentrations de sulcotrione 10^{-5} , 10^{-4} et $2 \cdot 10^{-4}$ M pendant 45 h. Nos résultats ont montré que la sulcotrione provoque une augmentation dose-dépendante de la fréquence des micronoyaux dans les cellules méristématiques des racines. Elle induit des altérations chromosomiques à la concentration la plus faible (10^{-5} M) mais aussi une baisse de l'indice mitotique, ce qui indique l'effet mutagène puissant de cette molécule. C'est le premier travail montrant une génotoxicité de la sulcotrione. Les signes d'intoxication se manifestent par les perturbations de la croissance foliaire et racinaires accompagnées d'un brunissement des racines traitées de *Vicia faba*. Sulcotrione, Mikado[®], marc de raisin et des mélanges de sulcotrione ou Mikado[®] et de marc de raisin induisent la mort cellulaire. La présence des herbicides ainsi que celle des cocktails ont entraîné l'installation d'un état de stress oxydant caractérisé par une production accrue d'H₂O₂. La production de radicaux d'oxygène actif s'accompagne d'une augmentation de la production de MDA et un accroissement de la mort cellulaire. L'ajout de l'extrait de raisin aux herbicides, soit à la sulcotrione ou au Mikado[®], modifie l'expression des gènes habituellement associés au stress cellulaire. Les cocktails et les herbicides modifient l'expression des gènes *hsp70.1*, *cat*, *ubiquitin*, *APX*, *CuZnSOD cy* et *CuZnSOD ch*. Des mécanismes de défense, d'induction de gènes associés au stress et de génotoxicité sont discutés.

Abstract

Potential cell toxicity of sulcotrione 2-(2-Chloro-4-(methylsulfonyl)benzoyl)-1,3-cyclohexanedione), a selective triketonic herbicide was evaluated on *Vicia faba* and *Allium cepa*. Genotoxicity was studied in hydroponic culture conditions for treatment at different pesticide concentrations 10^{-5} , 10^{-4} and $2 \cdot 10^{-4}$ M for 45 h. Our results showed that sulcotrione treatments caused a dose dependent increase of micronucleus frequencies in root meristematic cells. Sulcotrione induced chromosomal alterations at the lowest concentration used (10^{-5} M) when incubated for 42 h. We have shown a decrease in mitotic index, indicating a potent mutagenic effect of this element. This is the first report for the genotoxicity of such a sulcotrione herbicide. It induced a growth inhibition in both leaves and roots and a brownish color in treated roots. Sulcotrione, trade mark Mikado[®], grape marc and mixtures of sulcotrione or Mikado[®] and grape marc induce cell death. The herbicides, cocktails of products with sulcotrione, such as adjuvant in commercial product, induced several changes for antioxidant cell state characterized by an overproduction of H₂O₂. Production of harmful radicals was accompanied by increased production of MDA and increase of the cell death rate. Addition of grape extracts to herbicides, either sulcotrione or Mikado[®], had different effects and results in different expression of genes usually associated to cell stress. Mixture of grape marc and herbicides enhanced transcript accumulation for different effects and results in different expression of some stress-related genes like *hsp70.1*, *cat*, *ubiquitin*, *APX*, *CuZnSOD cy* et *CuZnSOD ch*. Mechanisms which could be associated to gene expression, cell defense and genotoxicity are discussed.