



**HAL**  
open science

# Devenir de mélanges de pesticides : étude des voies de biodégradation et développement d'une méthode préventive de bioremédiation

Louis Carles

► **To cite this version:**

Louis Carles. Devenir de mélanges de pesticides : étude des voies de biodégradation et développement d'une méthode préventive de bioremédiation. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2016. Français. NNT : 2016CLF22759 . tel-01544582

**HAL Id: tel-01544582**

**<https://theses.hal.science/tel-01544582>**

Submitted on 21 Jun 2017

**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.

**UNIVERSITE BLAISE PASCAL**

N° D. U. 2759

**UNIVERSITE D'AUVERGNE**

Année : 2016

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***

N° d'ordre : 704

**THESE**

Présentée à l'Université Blaise Pascal

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

(Spécialité : Microbiologie)

Soutenue le : 2 décembre 2016

Par

**Louis Carles**

---

**Devenir de mélanges de pesticides : étude des voies de biodégradation et  
développement d'une méthode préventive de bioremédiation**

---

Devant le Jury composé de :

Stéphane Vuilleumier	Professeur (UMR 7156 GMGM) Université de Strasbourg, France	Président
Enrique Barriuso	Directeur de Recherche INRA (UMR 1402 ECOSYS) INRA AgroParisTech, Grignon, France	Rapporteur
Edward Topp	Principal Research Scientist Agriculture and AgriFood, London, Canada	Rapporteur
Thierry Lebeau	Professeur (UMR 6112 LPG) Université de Nantes, France	Examineur
Isabelle Batisson	Maître de Conférences (UMR 6023 LMGE) Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France	Directrice de thèse
Pascale Besse-Hoggan	Directrice de Recherche CNRS (UMR 6296 ICCF) Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France	Co-Directrice de thèse





## Remerciements

*Même si cela fait toujours un peu cérémonie des Césars, je souhaite me prêter ici à l'exercice des remerciements afin d'exprimer ma plus profonde gratitude à toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont permis d'avancer sur le plan professionnel et personnel.*

*Je tiens tout d'abord à remercier Enrique Barriuso, Edward Topp, Thierry Lebeau et Stéphane Vuilleumier pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.*

*Merci également à Téléphore Sime-Ngando et Anne-Marie Delort de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (LMGE) et de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), respectivement.*

*Je remercie très chaleureusement mes deux Directrices de thèse, Pascale et Isabelle. Pascale, pour ta gentillesse, ton écoute, ta disponibilité, tes conseils, et pour plein d'autres choses encore, merci, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Isabelle, toi que j'ai côtoyé au quotidien puisque j'avais mon bureau au LMGE, je dois dire que je n'ai jamais rencontré une personne aussi dévouée. Les mots me manquent pour dire à quel point j'ai eu de la chance d'être sous ton encadrement. Je te serai éternellement reconnaissant pour tout ce que tu as fait.*

*Merci aux membres de l'ICCF et du LMGE qui m'ont aidé durant ces trois années de thèse, et en particulier Martine, Marie, Catherine, Hicham, Frédéric, Michaël, Nicolas, François et Damien. Merci aux membres de l'équipe CMES pour leur soutien, notamment à Clarisse, Frédérique, Florence et Corinne. Merci Joan pour tout ce que tu m'as apporté d'un point de vue professionnel et pour ta joie de vivre et ta bonne humeur. Merci Nathalie pour ta bonne humeur et pour m'avoir aidé, entre autre à « compter des boîtes » et trouver des Hôtels « respectables » pour mes déplacements. Merci également à Brigitte et Yvette pour leur bienveillance.*

*Deux personnes m'ont tout particulièrement donné envie de faire de la recherche avant ma thèse, en m'encadrant de la meilleure des manières au cours de mes stages de Master 1 et 2, à savoir Claude Collet (INRA, Avignon), et Anthony Ranchou-Peyruse (IPREM, Pau). Un grand merci à eux.*

*J'ai noué des amitiés fortes durant mes études à Pau, et je tiens à ces personnes pour ce qu'elles m'ont apporté. Merci Christelle, Julie, Manu, Fanny, Jean et Laetitia. Merci Yannick, c'est toi qui m'as parlé de ce sujet de thèse ! Merci Cora pour ta concurrence bon enfant, merci Mathilde pour ta patience, merci Marie pour tes fromages et merci Jérôme pour m'avoir fait découvrir l'Auvergne 3 ans avant le début de ma thèse, je ne pensais pas à ce moment-là y revenir un jour et encore moins y rester 3 ans ! Merci à Maud pour ton amitié sincère. Et enfin, merci à ... attention... roulement de tambour... Dorian !!! Mon copain ! DL Team® forever !*

*Merci aux (ex)doctorants du LMGE, pour tous les bons moments passés ensemble. Merci Mathieu, Mélanie, Stéphanie, Marina, Maxime, Gabriel, Céline, Iris et tous les autres. Merci à Claire, Jérôme, Rosyne et Cyril, les « top chefs » clermontois, et merci à Benoit pour ta gentillesse. Merci à Pierre pour m'avoir accueilli comme il se doit à mon arrivée au laboratoire, et dans ton bureau, et merci à Muriel pour ta gentillesse et ton aide précieuse. Merci à Laurianne pour ton rire communicatif. Merci à Benjamin, le roi de la canne à pêche, et merci à Florent, le Karl Lagarfeld du sac de litière de feuille !*

*Je tiens également à remercier mes proches et ma famille. Merci à mon parrain Pierre, qui a toujours été là pour moi, même à distance. Merci à mes frères et sœurs, Didier, Laurent, Céline, Michel, Christelle et Fabrice pour votre soutien. Un grand merci à mes parents, Charline et Daniel, pour leur amour, leur gentillesse, leur dévouement, leur soutien, leurs encouragements et les valeurs qu'ils ont transmis avec leur éducation. Vous êtes des parents exceptionnels.*

*Enfin, je te remercie toi, Cécile, qui m'accompagne depuis bientôt 4 ans et qui, malgré la distance, m'a toujours encouragé et soutenu. Je souhaite de tout mon cœur que notre patience soit un jour récompensée, et que l'on ait enfin la vie que nous méritons.*

*à Didier...*



*« il faut cultiver notre jardin »*

*Candide (1759)*

*Voltaire*



## Résumé étendu

### **Devenir de mélanges de pesticides : étude des voies de biodégradation et développement d'une méthode préventive de bioremédiation**

Les pesticides de nouvelle génération utilisés en agriculture sont épanchés à des doses relativement faibles mais le plus souvent en mélange pour augmenter leur efficacité et leur spectre d'action. Peu d'informations sont disponibles quant à l'effet de ces mélanges sur le devenir et l'impact de chaque molécule. Le but de ces travaux de thèse était d'étudier les processus impliqués dans le devenir d'un mélange utilisé notamment sur les cultures de maïs, composé des herbicides mésotrione ( $\beta$ -tricétole), nicosulfuron (sulfonilurée) et S-métolachlore (chloroacétanilide). La biodégradation de ces composés, seuls et en mélange, a été étudiée *in vitro* et la toxicité des substances actives et des métabolites, seuls et en mélange, a été déterminée à l'aide du test standard Microtox<sup>®</sup>.

Une première partie des travaux de thèse s'est focalisée sur la caractérisation de la réponse de la souche *Bacillus megaterium* Mes11 capable de biotransformer la mésotrione, en présence de cet herbicide par une approche de protéomique différentielle. Les résultats de cette étude et l'identification de la structure des métabolites ont permis de déduire le rôle potentiel de nitroréductases dans la dégradation de la mésotrione. Le criblage des 9 nitroréductases de la souche Mes11 pour leur capacité à transformer la mésotrione a ensuite été réalisé. Deux d'entre elles (NfrA1 et NfrA2), appartenant à la sous-famille NfsA-FRP des Nitro-FMN réductases, possédaient cette activité et ont été caractérisées structurellement et fonctionnellement. Il s'agissait de la première description d'enzymes directement impliquées dans la dégradation de la mésotrione.

Une autre partie de l'étude s'est intéressée aux voies de biotransformation du nicosulfuron. Des cultures d'enrichissement réalisées à partir de sol agricole ont permis l'isolement d'une souche (*Pseudomonas fluorescens* SG-1) capable de transformer cet herbicide par co-métabolisme. Les voies de biotransformation du nicosulfuron et celles de deux autres sulfonilurées (metsulfuron-méthyle et tribénuron-méthyle) ont été élucidées, mettant en évidence certaines voies non décrites jusqu'à présent pour ces composés. Cette souche a également la capacité de transformer le nicosulfuron formulé (Milagro<sup>®</sup>), mais plus lentement,



montrant un effet inhibiteur des adjuvants. Cette étude a également permis de fournir, pour la première fois, la valeur de toxicité des métabolites du nicosulfuron à l'aide du test Microtox<sup>®</sup>. L'ADMP (2-amino-4,6-diméthoxypyrimidine), le métabolite du nicosulfuron qui a été systématiquement identifié avec toutes les souches dégradant cet herbicide décrites jusqu'à présent, a une toxicité 20 fois supérieure à celle de la substance active. Le potentiel de biotransformation des trois herbicides de l'étude a également été testé pour les communautés microbiennes de rivière associées à la litière de feuille. Les résultats ont montré la capacité de ces communautés à transformer le nicosulfuron, seul ou associé à la mésotrione et au S-métolachlore. Des changements de structure de communauté ont été mis en évidence suite à l'exposition au nicosulfuron.

Les voies de biotransformation des trois herbicides, seuls ou en mélange, ont également été déterminées chez la souche Mes11. Cette souche, initialement décrite comme biotransformant la mésotrione, n'est pas capable de dégrader le S-métolachlore mais transforme le nicosulfuron par co-métabolisme. Les voies de biotransformation de la mésotrione et du nicosulfuron par la souche Mes11 conduisent à la production de trois métabolites majoritaires du nicosulfuron, dont l'ADMP, et de trois métabolites de la mésotrione, l'AMBA (acide 2-amino-4-méthylsulfonyl-benzoïque) étant le produit final. La cinétique de transformation de la mésotrione a été accélérée en présence de S-métolachlore, et celle du nicosulfuron a été ralentie en présence de mésotrione. La présence des herbicides en mélange a également influencé les cinétiques d'apparition / disparition des métabolites de la mésotrione et du nicosulfuron mais ces métabolites sont les mêmes, quelles que soient les conditions. La toxicité des substances actives (test Microtox<sup>®</sup>) peut être classée dans cet ordre : mésotrione > nicosulfuron > S-métolachlore. Tous les mélanges de molécules mères testés ont montré des effets synergiques, tandis que les mélanges de métabolites étaient majoritairement synergiques et antagonistes.

La dernière partie des travaux de thèse a porté sur le développement d'une technique préventive de traitement de la pollution par les pesticides d'origine agricole (bioprophylaxie). Ce procédé consiste à appliquer simultanément un pesticide et le microorganisme capable de le dégrader afin d'optimiser les conditions de sa biodégradation (après que le composé ait agit et avant qu'il ne contamine l'écosystème environnant). Nous avons réalisé une première étude en microcosmes de sol en utilisant l'herbicide 2,4-D et la souche *Cupriavidus necator* JMP134 qui le minéralise afin de faire une preuve de concept. Les résultats ont montré que l'épandage simultané du 2,4-D et de la souche JMP134 permettait de réduire d'un facteur 3 le temps de demi-vie du composé dans le sol, tout en conservant son activité herbicide. Ces

travaux constituent donc les premières bases pour développer la bioprophylaxie en agriculture, afin de réduire la contamination de l'environnement par les pesticides.

La détermination des processus impliqués dans la biotransformation des pesticides, seuls ou en mélange, ainsi que la toxicité des mélanges de substances actives, métabolites et adjuvants (pesticidome) permet d'apporter plus d'informations sur le comportement des pesticides. D'une manière générale, les résultats de notre étude montrent qu'il est important de prendre en compte l'effet des mélanges sur la biotransformation et la toxicité des substances actives et de leurs métabolites, afin de décrire le plus précisément possible le devenir et l'impact des pesticides dans l'environnement, et, *in fine*, le risque potentiel de leur utilisation en agriculture. Enfin, le développement de nouvelles techniques de bioremédiation pourrait permettre de faire évoluer les pratiques agricoles afin de limiter la pollution de l'environnement par les pesticides.

**Mots-clés :**

Mélange de pesticides ; Mésotrione ; Nicosulfuron ; S-métolachlore ; Biotransformation ; Microorganismes ; Métabolites ; Toxicité des mélanges ; Bioprophylaxie

**Directrices de thèse :**

Isabelle Batisson et Pascale Besse-Hoggan

**Laboratoires d'accueil :**

- LMGE, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UMR 6023, CNRS, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand
- ICCF, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, UMR 6296, CNRS, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

**Financement :**

Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Ce travail de thèse s'est également inscrit dans le projet ANR (Agence Nationale de la Recherche) TRICETOX (ANR-13-CESA-0002).



## Extended abstract

### **The fate of pesticide mixtures: study of biodegradation pathways and development of a preventive method of bioremediation**

New-generation pesticides used in agriculture are sprayed at relatively low doses but often in mixtures to increase their efficiency and action spectrum. Little data is available concerning the effects of these cocktails on the fate and impact of each individual molecule. The overall aim of this Ph.D. work was to study the fate of a herbicide mixture used on maize crops. The mixture of mesotrione ( $\beta$ -triketone), nicosulfuron (sulfonylurea) and S-metolachlor (chloroacetamide) was investigated. The biodegradation of these compounds was studied *in vitro*, alone and in mixtures and the toxicity of active ingredients and metabolites, alone or in mixtures, has been evaluated with the standard Microtox<sup>®</sup> test.

A first part of the PhD work is focused on the identification of the response of the mesotrione-transforming strain *Bacillus megaterium* Mes11, previously isolated from an agricultural soil, when exposed to mesotrione, by a differential proteomic approach. The results, together with the identification of the chemical structure of the mesotrione transformation products, allowed the identification of nitroreductase enzymes as potentially involved in the transformation of this herbicide. A screening of the Mes11 nitroreductases for their mesotrione transformation activity was then carried out. Among the nine enzymes tested, two were capable of transforming mesotrione (NfrA1 and NfrA2), both belonging to the NfsA-FRP sub-family of Nitro-FMN reductases. Both were then structurally and functionally characterized, allowing the description of enzymes directly involved in the biotransformation of mesotrione for the first time.

Another part of the study was to investigate in more detail the biotransformation pathways of nicosulfuron. Enrichment cultures from an agricultural soil allowed the isolation and characterization of a novel nicosulfuron-transforming strain (*Pseudomonas fluorescens* SG-1) by co-metabolism. The biotransformation pathways of nicosulfuron and two other sulfonylurea herbicides (metsulfuron-methyl and tribenuron-methyl) were elucidated, allowing the description of novel routes of transformation for these compounds. This strain was also able to transform the formulated-nicosulfuron (Milagro<sup>®</sup>) with slower kinetics,

showing that the co-formulants present in the commercially-available pesticide can have a strong negative effect on the biodegradation of pure nicosulfuron. This work also provides for the first time the microbial toxicity of nicosulfuron metabolites (Microtox<sup>®</sup>). ADMP (2-amino-4,6-dimethoxypyrimidine), a metabolite common to all known nicosulfuron-transforming strains, presents a 20-fold higher toxicity than nicosulfuron. The potential biotransformation of the three studied herbicides was also investigated for microbial communities associated to leaves submerged in streams. The results showed the potential of these communities to transform nicosulfuron, alone or in the presence of mesotrione and S-metolachlor. Shifts in microbial community structures were also evidenced in presence of nicosulfuron.

The biotransformation pathway of the three studied herbicides, alone or in cocktail, and the toxicity of the metabolites produced were also evaluated for the mesotrione-degrading strain *Bacillus megaterium* Mes11. This strain was unable to transform S-metolachlor, but was shown to totally transform nicosulfuron, alone or in mixtures with the other herbicides studied. The biotransformation pathways of nicosulfuron and mesotrione by the Mes11 strain were characterized by the production of three major nicosulfuron metabolites, among them ADMP and three metabolites of mesotrione, AMBA (2-amino-4-methylsulfonyl-benzoic acid) being the major end-product. The kinetics of transformation of mesotrione was accelerated in the presence of S-metolachlor. However, a decrease of the initial nicosulfuron transformation kinetics was observed in the presence of mesotrione. The herbicides studied also influenced some kinetic parameters of mesotrione and nicosulfuron metabolites, which are identical whatever the conditions tested. The toxicity order of the parent molecules determined with the standard Microtox<sup>®</sup> test is as follows: mesotrione > nicosulfuron > S-metolachlor. All tested parent compound mixtures showed synergistic effects and metabolite mixtures were mainly synergistic or antagonistic, ADMP and AMBA being more toxic than nicosulfuron and mesotrione, respectively.

The last part of the Ph.D. work was focused on the development of a preventive technique for the treatment of pesticide pollution in agriculture (bioprophylaxis). This process is based on the simultaneous application of pesticide and the corresponding pesticide-degrading/mineralizing microorganism(s), providing optimal conditions for microbial degradation of pesticides after their specific action (before their transport to the surrounding ecosystems). The suitability of this concept was first tested with the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as a model and a bacterial mineralizing-strain (*Cupriavidus necator* JMP134) in soil microcosms to provide a proof of concept. The results

showed a 3-fold reduction of the formulated 2,4-D (DAM<sup>®</sup>) dissipation time when applied at the agronomic dose simultaneously with *C. necator* JMP134 compared to the un-inoculated control soil. This study constitutes the first bases for the development of bioprophylaxis as a good means to reduce environmental contamination by agricultural pesticides.

The investigation of processes involved in pesticide biotransformation, alone or in mixtures, as well as the toxicity of parent compounds, metabolites and co-formulants (pesticidome) aim to bring more details for the behaviour of pesticides. Overall, the results of our work highlight the importance of taking into account the effect of pesticide mixtures on the fate and toxicity of the parent compounds and their metabolites, to a better description of the potential risks of these pesticides used in agriculture. Finally, the development of new bioremediation tools could also lead to a shift in agricultural practices, allowing the reduction of the environmental pollution by pesticides.

**Keywords:**

Pesticide mixture; Mesotrione; Nicosulfuron; S-metolachlor; Biotransformation; Microorganisms; Metabolites; Mixture toxicity; Bioprophylaxis

**Ph.D. Supervisors:**

Isabelle Batisson and Pascale Besse-Hoggan

**Host laboratories:**

- LMGE, Laboratory Microorganisms: Genome and Environment, UMR 6023, CNRS, University Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France
- ICCF, Chemical Institute of Clermont-Ferrand, UMR 6296, CNRS, University Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France

**Funding:**

French Ministry of National Education, Higher Education and Research. This PhD work was also supported by the Agence Nationale de la Recherche (grant number ANR-13-CESA-0002 TRICETOX).



## Sommaire

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>7</b>
<b>Chapitre 1. Les pesticides : <i>quid</i> de leur utilisation en mélange ? .....</b>	<b>9</b>
1. Effets des mélanges de pesticides sur leur devenir dans l'environnement .....	11
1.1. Effets des mélanges de pesticides sur le comportement des molécules individuelles .....	14
1.1.1. Au niveau des plantes.....	14
1.1.2. Dans les sols .....	14
1.1.3. Dans les eaux.....	15
1.2. Effets des mélanges de pesticides sur la transformation des molécules individuelles .....	16
1.2.1. Photo-transformation.....	16
1.2.2. Transformation biotique.....	16
1.2.2.1. Etudes <i>in situ</i> .....	16
1.2.2.2. Etudes <i>in vitro</i> .....	17
2. Effets des mélanges de pesticides sur leur (éco)toxicité microbienne .....	18
2.1. Evaluation de l'impact sur les microorganismes : tests standardisés et souches isolées .....	20
2.1.1. Impact sur les microorganismes aquatiques .....	22
2.1.2. Impact sur les microorganismes édaphiques.....	23
2.1.2.1. Impact sur l'abondance des microorganismes .....	24
2.1.2.2. Impact sur l'activité des microorganismes .....	24
2.1.2.3. Impact sur la structure des communautés microbiennes .....	27
3. Conclusions.....	28
<b>Chapitre 2. Les herbicides choisis pour cette étude .....</b>	<b>33</b>
1. La mésotrione.....	33
1.1. Historique .....	33
1.2. Propriétés physico-chimiques.....	33
1.3. Mode d'action .....	34
1.4. Réglementation – utilisations agronomiques.....	35
1.5. Devenir dans l'environnement .....	36
1.5.1. Rétention dans les sols .....	36
1.5.2. Transformation abiotique : photo-transformation .....	39
1.5.3. Transformation biotique.....	40
1.5.3.1. Etudes <i>in situ</i> .....	40
1.5.3.2. Etudes <i>in vitro</i> .....	41



1.5.3.2.1.	Diversité des souches dégradantes .....	41
1.5.3.2.2.	Description des voies de biotransformation .....	41
1.6.	Impact environnemental et toxicité.....	43
1.6.1.	Impact sur les microorganismes.....	43
1.6.1.1.	Milieu aquatique.....	43
1.6.1.2.	Milieu terrestre .....	43
1.6.1.2.1.	Impact sur l'abondance des microorganismes.....	43
1.6.1.2.2.	Impact sur l'activité des microorganismes.....	44
1.6.1.2.3.	Impact sur la structure des communautés microbiennes .....	44
1.6.1.3.	Impact sur souches isolées - Bio-essais.....	45
1.6.2.	Impact sur des organismes supérieurs .....	45
2.	Le nicosulfuron .....	47
2.1.	Historique .....	47
2.2.	Propriétés physico-chimiques.....	48
2.3.	Mode d'action .....	49
2.4.	Réglementation – utilisations agronomiques.....	50
2.5.	Devenir dans l'environnement .....	50
2.5.1.	Rétention dans les sols .....	50
2.5.2.	Transformation abiotique .....	53
2.5.2.1.	Photo-transformation .....	53
2.5.2.2.	Hydrolyse.....	54
2.5.3.	Transformation biotique.....	55
2.5.3.1.	Etudes <i>in situ</i> .....	55
2.5.3.2.	Etudes <i>in vitro</i> .....	57
2.5.3.2.1.	Diversité des souches dégradantes .....	57
2.5.3.2.2.	Description des voies de biotransformation .....	58
2.5.3.2.3.	Enzymes potentiellement impliquées dans la biotransformation du nicosulfuron .....	59
2.6.	Impact environnemental et toxicité.....	59
2.6.1.	Impact sur les microorganismes.....	59
2.6.1.1.	Milieu aquatique.....	59
2.6.1.2.	Milieu terrestre .....	60
2.6.1.2.1.	Impact sur l'abondance des microorganismes.....	60
2.6.1.2.2.	Impact sur l'activité des microorganismes.....	60
2.6.1.2.3.	Impact sur la structure des communautés microbiennes .....	61
2.6.1.3.	Impact sur souches isolées – Bio-essais .....	61
2.6.2.	Impact sur des organismes supérieurs .....	62
3.	Le S-métolachlore.....	63
3.1.	Historique .....	63
3.2.	Propriétés physico-chimiques.....	64
3.3.	Mode d'action .....	65

3.4.	Réglementation – utilisations agronomiques.....	66
3.5.	Devenir dans l'environnement .....	67
3.5.1.	Rétention dans les sols .....	67
3.5.2.	Transformation abiotique : photo-transformation .....	70
3.5.3.	Transformation biotique.....	73
3.5.3.1.	Etudes <i>in situ</i> .....	73
3.5.3.2.	Etudes <i>in vitro</i> .....	74
3.5.3.2.1.	Diversité des souches dégradantes .....	74
3.5.3.2.2.	Description des voies de biotransformation .....	75
3.5.3.2.3.	Enzymes potentiellement impliquées dans la biotransformation du S-métolachlore.....	79
3.6.	Impact environnemental et toxicité.....	80
3.6.1.	Impact sur les microorganismes.....	81
3.6.1.1.	Milieu aquatique.....	81
3.6.1.2.	Milieu terrestre .....	81
3.6.1.2.1.	Impact sur l'abondance des microorganismes.....	81
3.6.1.2.2.	Impact sur l'activité des microorganismes.....	82
3.6.1.2.3.	Impact sur la structure des communautés microbiennes .....	82
3.6.1.3.	Impact sur souches isolées – Bio-essais .....	83
3.6.2.	Impact sur des organismes supérieurs .....	85

## **PARTIE II. OBJECTIFS DE L'ETUDE ET HYPOTHESES .....87**

## **PARTIE III. RESULTATS ET DISCUSSION .....93**

### **Chapitre 1. Isolement de souches capables de dégrader la mésotrione et/ou le nicosulfuron et/ou le S-métolachlore..... 95**

1.	Cultures d'enrichissement à l'aide de la méthode de perfusion en colonne sol-charbon .....	95
1.1.	Introduction.....	95
1.2.	Matériel et méthodes .....	96
1.2.1.	Produits chimiques et milieux de cultures .....	96
1.2.2.	Méthode de perfusion en colonne sol-charbon .....	96
1.2.3.	Culture d'enrichissement dite « classique ».....	97
1.2.4.	Suivi des cinétiques de dissipation des herbicides par HPLC.....	98
1.3.	Résultats et discussion .....	98
1.3.1.	Enrichissement à l'aide du système de perfusion sol-charbon.....	98
1.3.2.	Enrichissement en milieu liquide.....	99
1.3.3.	Isolements et tests de biodégradation .....	100
1.4.	Conclusions.....	101
2.	Cultures d'enrichissement par la méthode dite « classique » .....	101

<b>Chapitre 2. Caractérisation des voies de dégradation de la mésotrione et du nicosulfuron.....</b>	<b>105</b>
1. Caractérisation des voies de dégradation de la mésotrione .....	105
1.1. Réponse du métabolisme global de la souche <i>Bacillus megaterium</i> Mes11 en présence de mésotrione.....	105
1.2. Implication des nitroréductases dans la dégradation de la mésotrione par <i>Bacillus megaterium</i> Mes11 ?.....	106
1.2.1. Mécanisme réactionnel des nitroréductases bactériennes .....	107
1.2.1.1. Les nitroréductases de type I (insensibles à l’oxygène) .....	107
1.2.1.2. Les nitroréductases de type II (sensibles à l’oxygène) .....	108
1.2.2. Diversité des nitroréductases bactériennes de type I .....	108
1.2.3. Rôle physiologique des nitroréductases bactériennes.....	109
2. Caractérisation des voies de dégradation du nicosulfuron et toxicité des métabolites .....	129
<b>Chapitre 3. Mélange de mésotrione, nicosulfuron et S-métolachlore : étude des voies de biotransformation et toxicité des métabolites.....</b>	<b>145</b>
<b>Chapitre 4. La bioprophylaxie : une approche innovante pour réduire la contamination de l’environnement par les pesticides d’origine agricole – preuve de concept .....</b>	<b>175</b>
1. Introduction.....	175
2. Matériel et méthodes.....	177
2.1. Herbicide et sol .....	177
2.2. Souche bactérienne.....	177
2.3. Préparation de l’inoculum.....	178
2.4. Mise en place des microcosmes .....	178
2.5. Dénombrement de la souche <i>C. necator</i> JMP134 Rif <sup>r</sup> dans le sol .....	180
2.6. Quantification du 2,4-D dans le sol .....	180
2.6.1. Extraction .....	180
2.6.2. Analyses HPLC .....	180
2.7. Modélisation des cinétiques de dégradation du 2,4-D .....	180
2.8. Analyses statistiques.....	181
3. Résultats préliminaires et discussion .....	181
3.1. Survie de la souche <i>C. necator</i> JMP134 Rif <sup>r</sup> dans le sol.....	181
3.2. Cinétiques de dégradation du 2,4-D (DAM <sup>®</sup> ) dans le sol .....	182
3.3. Activité herbicide du DAM <sup>®</sup> .....	184
4. Conclusion et perspectives .....	185
<b>CONCLUSIONS, DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>187</b>
<b>Conclusions.....</b>	<b>189</b>
<b>Discussion générale.....</b>	<b>193</b>

Perspectives .....	199
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>205</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>233</b>
Annexe I.....	235
Annexe II .....	249
Annexe III.....	267



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Nombre de pesticides quantifiés dans les cours d'eau (A) et les eaux souterraines (B) en France en 2013.....	10
<b>Figure 2.</b> Distribution et transformation des pesticides et adjuvants dans l'environnement, modifié d'après Katagi (2008).....	12
<b>Figure 3.</b> Représentation schématique des modèles théoriques de l'effet des mélanges de molécules toxiques (RECORD, 2011; Heys <i>et al.</i> , 2016).....	19
<b>Figure 4.</b> Impact des pesticides sur les communautés microbiennes.....	20
<b>Figure 5.</b> Interactions entre le type de pesticide (insecticide, herbicide ou fongicide) et le taxon (algues, bactéries, protozoaires ou champignons) sur l'abondance microbienne (Staley <i>et al.</i> , 2015).....	22
<b>Figure 6.</b> Représentation schématique des interactions entre le pesticidome, l'interactome (flèches rouges) et l'environnement.....	29
<b>Figure 7.</b> Mode d'action de la mésotrione chez les plantes. 4-HPPD : 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase..	35
<b>Figure 8.</b> Pourcentage des surfaces traitées en Région Aquitaine au moins une fois par les principales matières actives herbicides utilisées sur maïs grain en 2011 (AGRESTE, 2013).....	36
<b>Figure 9.</b> Quantification de la mésotrione dans les eaux souterraines au niveau des sites de prélèvements d'eau potable en France métropolitaine pour la période 2003-2015 (ADES, 2016).....	38
<b>Figure 10.</b> Photo-produits de la mésotrione obtenus par photolyse directe P1, P2, P3 (Ter Halle and Richard, 2006) et après irradiation sur de la cire cuticulaire reconstituée P1, P2, P4, P5 (Ter Halle <i>et al.</i> , 2010). ...	40
<b>Figure 11.</b> Voies de biodégradation de la mésotrione proposées chez différentes souches bactériennes pures. ..	42
<b>Figure 12.</b> Voies de biotransformation de la mésotrione chez le rat et la souris (Gledhill <i>et al.</i> , 2001). .....	46
<b>Figure 13.</b> Mode d'action du nicosulfuron chez les plantes. ALS : acétolactate synthase.....	50
<b>Figure 14.</b> Quantification du nicosulfuron dans les eaux souterraines au niveau des sites de prélèvements d'eau potable en France métropolitaine pour la période 2003-2015 (ADES, 2016).....	52
<b>Figure 15.</b> Photo-produits du nicosulfuron obtenus par photolyse directe (Benzi <i>et al.</i> , 2011) et après irradiation sur de la cire cuticulaire reconstituée (Ter Halle <i>et al.</i> , 2010). .....	54
<b>Figure 16.</b> Hydrolyse du nicosulfuron (Sabadie, 2002).....	55
<b>Figure 17.</b> Voies de biodégradation du nicosulfuron chez différentes souches bactériennes et fongiques pures..	56
<b>Figure 18.</b> Isomères du métolachlore. ....	64
<b>Figure 19.</b> Mode d'action du S-métolachlore chez les plantes. ....	66
<b>Figure 20.</b> Quantification du S-métolachlore dans les eaux souterraines au niveau des sites de prélèvements d'eau potable en France métropolitaine pour la période 2003-2015 (ADES, 2016). ....	69
<b>Figure 21.</b> Structure chimique des deux métabolites principaux du métolachlore : l'acide oxalinique (OXA, <i>oxalinic acid</i> ) et l'acide éthane-sulfonique (ESA, <i>ethan sulfonic acid</i> ). ....	70
<b>Figure 22.</b> Structure chimique des métabolites CGA40919 et CGA37913 du métolachlore. ....	71

<b>Figure 23.</b> Voies de photo-dégradation proposées du métolachlore, menant à la production de produits monohydroxylés (Nicol <i>et al.</i> , 2015). .....	72
<b>Figure 24.</b> Voies de photo-dégradation proposées du <i>S</i> -métolachlore (Gutowski <i>et al.</i> , 2015). .....	73
<b>Figure 25 A et B.</b> Voies de biotransformation du métolachlore chez différentes souches pures de bactéries et de champignons. ....	79
<b>Figure 26.</b> Voie métabolique proposée du butachlore par la souche <i>Paracoccus</i> sp. FLY-8. ....	80
<b>Figure 27.</b> Dispositif expérimental de perfusion en colonne sol-charbon utilisé dans cette étude. ....	97
<b>Figure 28.</b> Evolution du pourcentage résiduel de mésotrione (Méso), nicosulfuron (Nico) et <i>S</i> -métolachlore ( <i>S</i> -méto), seuls ou en mélange (mix) dans la solution du système de perfusion sol-charbon.....	99
<b>Figure 29.</b> Pourcentage résiduel de nicosulfuron, mésotrione et <i>S</i> -métolachlore dans l'eau de Volvic® additionnée de 25 mg L <sup>-1</sup> de chaque molécule, après 13 j d'incubation en présence de souches fongiques (resting cells) isolées à partir du repiquage N°2 (25 mg L <sup>-1</sup> ) de l'enrichissement en milieu liquide. ....	101
<b>Figure 30.</b> Mécanisme réactionnel des nitroréductases de type I et II (De Oliveira <i>et al.</i> , 2010).....	107
<b>Figure 31.</b> Mécanisme réactionnel de type ordonné Bi-Bi ping pong des nitroréductases de type I. ....	108
<b>Figure 32.</b> Arbre phylogénétique des nitroréductases de type I (Roldán <i>et al.</i> , 2008).....	109
<b>Figure 33.</b> Relations phylogénétiques des nitroréductases de <i>B. megaterium</i> Mes11 avec leurs homologues respectifs, sur la base des séquences en acides aminés. ....	112
<b>Figure 34.</b> Analyse SDS-PAGE du culot (C) et du surnageant (S) suite à la centrifugation du lysat des bactéries hébergeant les vecteurs recombinants codant chacune des 9 nitroréductases de la souche Mes11, après 6 h d'induction. ....	113
<b>Figure 35.</b> Cinétiques de dissipation de la mésotrione (A) et du nicosulfuron (B) seuls par les souches <i>B. megaterium</i> Mes11, <i>P. fluorescens</i> SG-1 et du mélange équimolaire (1 mM chacun) des deux herbicides par le consortium des deux.....	146
<b>Figure 36.</b> Voie de dégradation du 2,4-D par la souche <i>C. necator</i> JMP134. TCA : acide tricarboxylique. Les gènes de dégradation ( <i>tfd</i> ) sont indiqués à chaque étape de la dégradation (Kumar <i>et al.</i> , 2014). ....	177
<b>Figure 37.</b> Photographie de l'ensemble des microcosmes au début de l'expérience. ....	179
<b>Figure 38.</b> Dénombrement de <i>C. necator</i> JMP134 Rif <sup>r</sup> dans le sol pour les traitements Bactérie (en noir) et Bioprophylaxie (en rouge) au cours du temps. ....	182
<b>Figure 39.</b> Cinétiques de dégradation du 2,4-D (DAM®) dans le sol 5M pour les traitements Herbicide et Bioprophylaxie. ....	183
<b>Figure 40.</b> Suivi visuel de l'activité herbicide du 2,4-D (DAM®) suite à l'épandage d'eau de Volvic® (Contrôle), d'eau de Volvic® additionnée de <i>C. necator</i> JMP134 (Bactérie), d'eau de Volvic® additionnée de DAM® à la dose agronomique (Herbicide) et d'eau de Volvic® additionnée de <i>C. necator</i> JMP134 + DAM® (Bioprophylaxie).....	185
<b>Figure 41.</b> Représentation schématique des différents axes abordés et étapes réalisées au cours de mes travaux de thèse. ....	190

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Identité et propriétés physico-chimiques de la mésotrione (EFSA, 2016).....	34
<b>Tableau 2.</b> Souches pures de microorganismes capables de transformer la mésotrione.....	41
<b>Tableau 3.</b> Structure générale de la famille des herbicides sulfonyleurées (Berger and Wolfe, 1996). .....	48
<b>Tableau 4.</b> Identité et propriétés physico-chimiques du nicosulfuron (EFSA, 2007).....	49
<b>Tableau 5.</b> Souches pures de microorganismes capables de transformer le nicosulfuron.....	57
<b>Tableau 6.</b> Identité et propriétés physico-chimiques du S-métolachlore (EFSA, 2004). .....	65
<b>Tableau 7.</b> Souches pures de microorganismes capables de transformer le métolachlore. ....	75
<b>Tableau 8.</b> Conditions d'analyse des cinétiques de biodégradation des herbicides étudiés par HPLC. ....	98
<b>Tableau 9.</b> Evolution du pourcentage résiduel de mésotrione (Méso), nicosulfuron (Nico) et S-métolachlore (S-méto), seuls ou en mélange (mix), dans les cultures d'enrichissement ensemencées avec le sol ou les billes de charbon.....	100
<b>Tableau 10.</b> Taux de dissipation de la mésotrione (Méso) et du nicosulfuron (Nico) seuls ou en mélange, par les souches <i>B. megaterium</i> Mes11 et <i>P. fluorescens</i> SG-1 seules ou en consortium artificiel. ....	145
<b>Tableau 11.</b> Propriétés physico-chimiques du sol standard OCDE 5M (LUF A Speyer, Allemagne). ....	177
<b>Tableau 12.</b> Paramètres cinétiques de la dégradation du 2,4-D (DAM®) dans le sol 5 M pour les traitements Herbicide et Bioprophyllaxie.....	183





# **Introduction générale**



Une évolution drastique des pratiques agricoles s'est opérée dans le monde depuis la deuxième moitié du XX<sup>ème</sup> siècle afin de satisfaire aux besoins alimentaires liés à la croissance de la population mondiale, qui est passée de 2,5 à 7,2 milliards d'êtres humains entre 1950 et 2015 (Statistique Mondiale, 2016). Les moyens à mettre en œuvre pour augmenter la production agricole étaient déjà clairement affichés dans le tout premier bulletin de la FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) datant de 1947 et traitant de l'état de l'alimentation et de l'agriculture (FAO, 1947). Les agriculteurs étaient alors incités à utiliser davantage de fertilisants, de machines agricoles et de pesticides afin d'augmenter les rendements (FAO, 1965). Ainsi, jusqu'en 1965, les bulletins annuels de la FAO ne parlaient que de l'efficacité des pesticides vis-à-vis des espèces cibles, des formulations à développer pour augmenter leur efficacité, leur stabilité et faciliter leur manutention et leur approvisionnement, et des équipements agricoles nécessaires à leur épandage, le tout dans un contexte général de développement de l'agriculture. Le risque potentiel de leurs utilisations pour l'environnement et la santé humaine n'a commencé à être évoqué qu'au milieu des années 1960, avec l'indication d'une perturbation possible de l'équilibre de la nature (« *balance of nature* ») par ces molécules (FAO, 1965).

La prise de conscience de ce risque potentiel a mené à la mise en place de réglementations concernant la régulation de l'utilisation de pesticides, notamment aux Etats-Unis par l'Agence pour la Protection de l'Environnement créée en 1970 (US EPA, *Environmental Protection Agency*) et la mise en place du « *Federal Environmental Pesticides Control Act* » (FEPCA) qui a contraint les fabricants de pesticides à réaliser des tests prouvant que les pesticides n'ont pas d'effets négatifs trop importants sur la santé humaine et l'environnement. En Europe, ce sont des directives de la Commission Européenne (CE) qui ont conduit au développement dès 1992 d'un programme de révision de l'ensemble des molécules actives utilisées pour la protection des plantes au sein de l'Union Européenne (UE). Différents critères sont ainsi appliqués à chaque molécule pour évaluer (i) leurs impacts sur la santé humaine et l'environnement, (ii) leur écotoxicité et (iii) la présence de résidus dans la chaîne alimentaire (règlement (CE) n° 396/2005). Les pesticides satisfaisant ces critères sont inscrits dans l'annexe I de la directive 91/414/EEC (abrogée depuis par le règlement (CE) n° 1107/2009) et peuvent ainsi être utilisés dans les pays membres. Dans le cas contraire, l'usage de ces pesticides est interdit.

Un changement des pratiques agricoles s'est également opéré dès le début des années 1970 (basé sur le concept d'IPM, *Integrated Pest Management*), prônant l'utilisation raisonnée des pesticides et favorisant les méthodes non-chimiques. Ceci a notamment abouti à l'utilisation

de molécules pesticides efficaces à de plus faibles doses (dites molécules de « nouvelle génération ») pour réduire les quantités épandues au champ. Cette évolution des pratiques agricoles fait également partie des objectifs des plans Ecophyto I et II en France, qui visent à réduire de 50% le recours aux produits phytosanitaires d'ici 2025.

Les molécules de « nouvelle génération » sont toutefois employées la plupart du temps en mélange afin d'augmenter l'efficacité et le spectre d'action du traitement. Cependant, le cadre législatif n'inclut pas d'évaluer la toxicité et l'écotoxicité des mélanges de pesticides, qui sont uniquement testés individuellement. Il existe donc un vide juridique et législatif pour évaluer l'impact des mélanges de pesticides sur l'environnement et la santé humaine. Par ailleurs, leur effet n'est que ponctuellement décrit dans la littérature scientifique, notamment en raison d'un manque d'informations sur leur comportement dans l'environnement et leur toxicité.

Mes travaux de thèse ont donc eu pour but d'étudier les processus impliqués dans le devenir d'un mélange de pesticides dans l'environnement, afin de pouvoir mieux en apprécier l'impact. Notre choix s'est porté sur un mélange d'herbicides couramment employés sur les cultures de maïs (mésotrione, nicosulfuron et *S*-métolachlore) en remplacement notamment de l'atrazine, interdite dans l'Union Européenne depuis 2003. L'étude a consisté à déterminer de manière détaillée les processus de biodégradation de ces pesticides *in vitro*, seuls ou en mélange, et la toxicité des métabolites générés. Afin de proposer des alternatives aux pratiques actuelles d'épandage de pesticides, j'ai également entrepris de développer une approche préventive de bioremédiation (la bioprophylaxie) afin de minimiser les risques dus à leur application au champ.

Le manuscrit de thèse se divise en 4 parties :

I- une **synthèse bibliographique**, dressant, dans le **Chapitre 1**, un état des lieux des connaissances actuelles sur le devenir et l'impact sur les communautés microbiennes de mélanges de pesticides utilisés en agriculture, en se focalisant, dans le **Chapitre 2**, sur les trois pesticides faisant partie du mélange étudié au cours de mes travaux de thèse ;

II- les **objectifs** de mon travail de thèse par rapport aux données de la littérature ;

III-les **résultats et discussion** de l'ensemble de mes travaux de thèse. Le **Chapitre 1** présente l'isolement de microorganismes capables de transformer certains herbicides du mélange étudié, seuls ou en mélange. Le **Chapitre 2** est consacré à la caractérisation des voies de biotransformation de la mésotrione et du nicosulfuron seuls. Le **Chapitre 3** décrit l'étude des voies de biotransformation de la mésotrione et du nicosulfuron, seuls et en mélange, et associés ou non au *S*-métolachlore, ainsi que la toxicité des métabolites produits dans ces différentes conditions. Enfin, le **Chapitre 4** décrit la mise en place d'une approche de bioprophylaxie permettant d'envisager de nouvelles stratégies d'épandage des pesticides en agriculture ;

IV-les **conclusions, discussion générale et perspectives**, présentant les principales avancées découlant de la thèse et établissant des perspectives plus globales sur la thématique des mélanges de pesticides.



## **Partie I. Synthèse bibliographique**





## Chapitre 1. Les pesticides : *quid* de leur utilisation en mélange ?

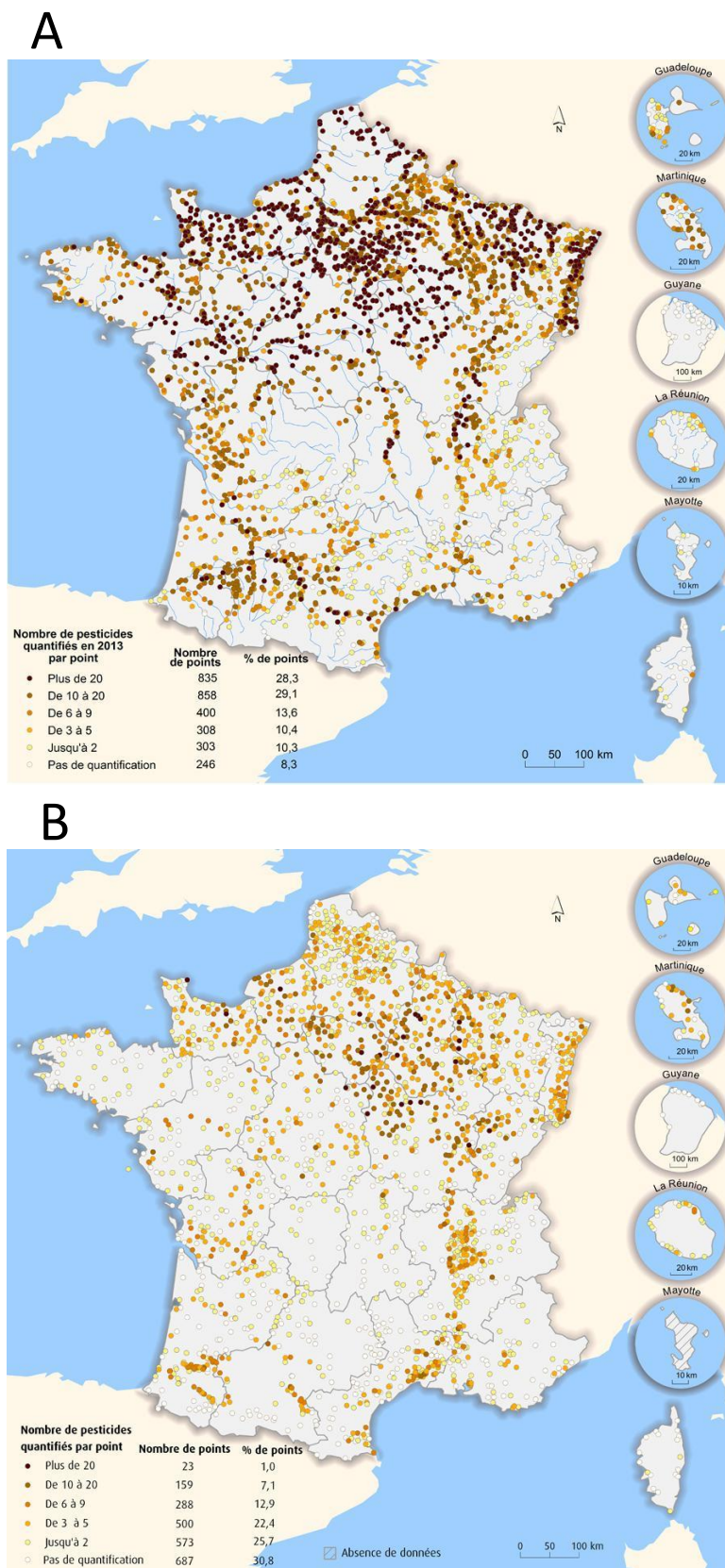
L'application d'une seule molécule à fort grammage sur les cultures, préconisée durant des décennies, a fait place, en accord avec les recommandations des pratiques agricoles actuelles, à l'usage de plus faibles doses de pesticides associés en mélange au sein d'une ou plusieurs spécialités commerciales. Sur les 483 substances actives autorisées en Europe (inscrites dans l'annexe I du règlement (CE) n° 1107/2009), 127 substances actives sont à usage herbicide, soit environ 750 spécialités commerciales (E-Phy, 2016a; European Commission, 2016).

### Remarque :

Les pesticides sont communément associés à des adjuvants au sein des spécialités/formulations commerciales. Ces adjuvants permettent de solubiliser et de stabiliser sur de longues périodes la substance active mais aussi d'augmenter son efficacité, notamment en favorisant sa pénétration et sa diffusion dans la plante. Les adjuvants les plus répandus sont les surfactants, les huiles végétales et minérales, les polymères naturels ou synthétiques, les humectants, les sels organiques, les solutions tampons, les solvants, etc. (Luiz *et al.*, 2013). Une formulation typique contient moins de 50% de substance active (Mullin *et al.*, 2015). Il faut également savoir que certains adjuvants sont ajoutés juste avant épandage (*tank mix adjuvants*) (Nobels *et al.*, 2011).

Le terme « mélange de pesticides » peut se définir de différentes manières. D'un point de vue agricole, le mélange de pesticides peut être une spécialité contenant plusieurs substances actives ou plusieurs spécialités épandues conjointement ou séquentiellement dans un court laps de temps. Selon l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation (ANSES), « Un mélange de produits phytopharmaceutiques se compose de plusieurs produits phytopharmaceutiques rendus solubles, bénéficiant chacun d'une autorisation de mise sur le marché à titre individuel. La préparation du mélange doit se faire juste avant son utilisation : on parle de mélange extemporané. La pratique du mélange doit être étudiée et justifiée pour des raisons agronomiques et économiques » (E-Phy, 2016b). En France, les modalités relatives à l'utilisation de mélanges extemporanés de pesticides sont définies par un arrêté

ministériel en date du 7 avril 2010, modifié par l'arrêté du 12 juin 2015. Les formulations contenant plusieurs substances actives ne sont donc pas incluses dans le cadre législatif.



**Figure 1.** Nombre de pesticides quantifiés dans les cours d'eau (A) et les eaux souterraines (B) en France en 2013. Sources : Agences et offices de l'eau, 2015 (SOEs, 2015a).

D'un point de vue environnemental, le mélange de pesticides est l'ensemble des molécules issues de formulations commerciales (y compris les adjuvants inclus dans la formulation ou ajoutés juste avant l'épandage) qui se retrouvent ensemble dans un environnement donné. Suite à leur épandage, ces molécules peuvent migrer vers les eaux de surface et souterraines, donnant lieu à des contaminations multiples. Ainsi, au moins 10 pesticides différents ont été quantifiés dans plus de la moitié des points d'échantillonnage de cours d'eau et dans plus de 8% des points d'échantillonnage des eaux souterraines de France en 2013 (SOeS, 2015a) (Figure 1).

A l'heure de l'avènement des techniques en « -omique », le « mélange de pesticides » pourrait donc être défini comme un « pesticidome », correspondant à l'ensemble des substances actives et leurs éventuels produits de transformation, ainsi que les adjuvants présents dans les spécialités. La « pesticidomique » correspondrait à l'étude de l'ensemble de ces molécules et des processus qui régissent leur devenir (rétention, transformations biotiques et abiotiques, etc.). L'étude du devenir et de l'impact des mélanges de pesticides dans l'environnement se situe notamment à l'interface du « pesticidome » et de « l'interactome global » (ensemble des interactions dans un écosystème, depuis l'échelle moléculaire jusqu'à l'échelle écosystémique). Peu de données concernant ces aspects sont actuellement disponibles.

Il faut également noter un manque d'homogénéité dans la littérature s'intéressant à cette thématique, puisque les mélanges de pesticides peuvent être nommés de différentes manières (« *mixture* », « *cocktail* », « *combination* » ou « *pesticides A and B...* ») dans les revues scientifiques. Un recensement exhaustif des publications sur cette thématique n'est donc pas facile et il est possible que des publications pertinentes soient absentes de ce chapitre, malgré le soin apporté à la recherche bibliographique. L'accent a été mis sur les travaux ayant comparé les molécules pesticides seules et en mélange.

## **1. Effets des mélanges de pesticides sur leur devenir dans l'environnement**

Deux voies d'entrée principales dans les sols existent pour les pesticides : une voie directe, correspondant à la fraction de pesticide non interceptée par la couverture végétale lors de l'épandage, et une voie indirecte, *via* les plantes (Figure 2). Une fois sur le sol, les pesticides

subissent différents processus influençant leur transport (adsorption, volatilisation, lixiviation et lessivage sur la surface du sol) et leur persistance (transformations/dégradations biotique et abiotique). Le devenir des pesticides est ainsi dépendant des propriétés physico-chimiques propres de chaque molécule, des propriétés du sol et des conditions climatiques (Ueji *et al.*, 2001). Suite à un épandage de pesticides, les substances actives, les adjuvants entrant dans la composition des spécialités commerciales, ainsi que les produits de transformation de ces molécules peuvent donc atteindre différents compartiments environnementaux et y persister plus ou moins longtemps. Ces molécules peuvent également interagir entre elles et ainsi influencer le comportement de chacune d'elles, notamment dans le sol, en modifiant leur adsorption, leur volatilisation ou leur dégradation. *In fine*, leur transfert vers les eaux de surface et souterraines peut ainsi être modifié, et ceci doit être pris en compte afin d'évaluer avec précision le risque de contamination environnementale.

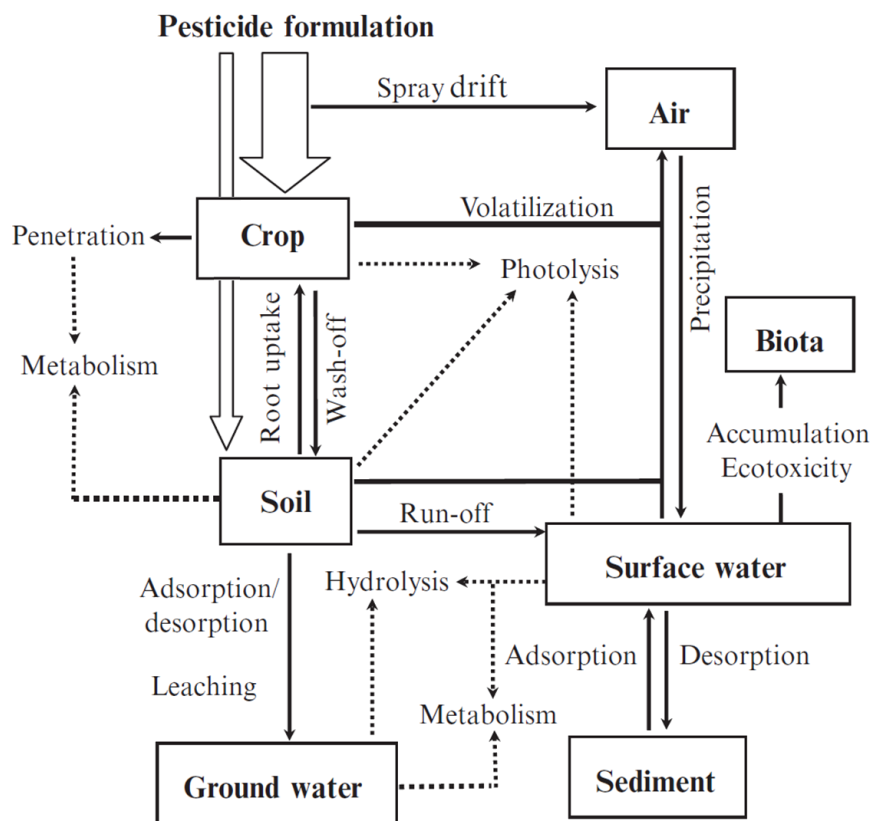


Figure 2. Distribution et transformation des pesticides et adjuvants dans l'environnement, modifié d'après Katagi (2008).

La biotransformation, qui résulte en grande partie de l'action des microorganismes, est considérée comme un des processus majeurs régissant le devenir des molécules pesticides dans l'environnement lorsque ces pesticides sont biodisponibles. Ce processus s'accompagne

de la production de produits de transformation, ou métabolites, qui possèdent le plus souvent des propriétés physico-chimiques et toxicologiques différentes de celles de la molécule mère. La dégradation de molécules complexes par les microorganismes est majoritairement réalisée à l'aide d'enzymes, et minoritairement par des modifications du microenvironnement au voisinage de la cellule microbienne (ex. acidification) ou des réactions biochimiques spontanées avec des composés intracellulaires. Certains microorganismes sont ainsi capables d'utiliser une molécule pesticide comme source de carbone ou d'électrons, et possèdent l'ensemble des enzymes permettant de transformer la molécule mère complexe en molécules plus simples entrant *in fine* dans le métabolisme central de la cellule. La biodégradation de la molécule est alors qualifiée de totale (minéralisation). D'autres souches ne sont pas capables de minéraliser la molécule pesticide mais possèdent une ou plusieurs enzymes catalysant la transformation de cette molécule, sans pour autant que cette transformation apporte un avantage à la souche en termes de source d'énergie. Il s'agit dans ce cas de transformation par co-métabolisme, nécessitant un co-substrat comme source de carbone et d'énergie.

Remarque :

Les études s'intéressant aux processus de biotransformation des pesticides *in situ* sont d'une manière générale assez difficiles à mettre en œuvre. En effet, le découplage de l'activité biologique au sein d'un environnement complexe, tel qu'un sol, est difficile à réaliser, car cela nécessite d'être capable de déterminer avec précision l'ensemble des processus influençant le devenir de la molécule étudiée, que ce soit en termes de transport, d'adsorption, de biodisponibilité, ou en termes de transformations (biotique ou abiotique). Une mise au point fastidieuse des techniques analytiques est aussi souvent nécessaire afin de doser avec précision la molécule mère étudiée et ses éventuels métabolites. L'utilisation de molécules marquées, à l'aide d'isotopes du carbone ou de l'azote notamment, permet de faciliter les analyses, mais ces techniques sont très coûteuses, ne serait-ce qu'en termes d'achat de la molécule marquée, et demandent des accréditations spéciales dans le cas de marquages radioactifs. C'est pourquoi la majorité des études s'intéressant aux processus de biotransformation de pesticides sont réalisées en conditions contrôlées de laboratoire avec des pesticides non marqués.

## 1.1. Effets des mélanges de pesticides sur le comportement des molécules individuelles

### 1.1.1. Au niveau des plantes

Peu d'études se sont intéressées à l'effet des adjuvants sur le comportement des pesticides. Il a cependant été montré que la présence de surfactants permet d'accroître la quantité de chlorantraniliprole retenue sur les feuilles de maïs et de blé, et d'augmenter la quantité absorbée par la plante au travers de la cire cuticulaire (Melo *et al.*, 2015). Certains surfactants sont aussi capables d'augmenter la dispersion de la goutte de pesticide à la surface des feuilles d'Eucalyptus (Lin *et al.*, 2016).

La présence de plusieurs molécules actives lors d'un épandage peut également influencer le comportement de chacune d'elles sur les plantes. Ainsi, la persistance de l'endosulfan au niveau des tomates est augmentée d'un facteur 2 et celle de la cyperméthrine diminuée d'un facteur 1,5 quand ces deux insecticides sont associés par rapport à leur application individuelle (Banshtu *et al.*, 2015).

### 1.1.2. Dans les sols

La mobilité d'un pesticide dépend des propriétés physico-chimiques de la molécule active, mais également du type de sol. En s'adsorbant aux particules du sol, les adjuvants peuvent en modifier les propriétés physico-chimiques et ainsi influencer la mobilité de la matière active de pesticide. La mobilité du diazinon, de l'atrazine et de l'acéphate est ainsi diminuée en présence de surfactants non-ioniques (Krogh *et al.*, 2003). L'ajout d'adjuvants a également entraîné une diminution de la lixiviation du bromacile, tandis qu'aucun effet n'a été observé pour le diuron (Reddy and Singh, 1993). Cette différence de comportement pourrait s'expliquer par la forte solubilité du bromacile dans l'eau comparée au diuron. Le type de formulation galénique influence aussi le devenir du pesticide. Ainsi, le transport de la cyperméthrine dans le sol est considérablement réduit quand l'insecticide est sous forme de micro-granules comparé au concentré émulsionnable (Mantzou *et al.*, 2016). Au contraire, une plus forte mobilité a été observée dans le cas des formulations commerciales de deux herbicides de la famille des sulfonilurées (chlorsulfuron et tribénuron-méthyle) par rapport aux substances actives pures (Földényi *et al.*, 2013).

La présence d'autres pesticides peut également influencer la mobilité d'un composé, en modifiant notamment ses capacités d'adsorption aux particules du sol. Il a ainsi été montré que les deux herbicides amétryne et glyphosate étaient plus fortement adsorbés sur les particules de sol quand ils étaient appliqués simultanément en comparaison de leur application individuelle (Alves, 2012). Au contraire, la présence du mélange *S*-métolachlore + terbuthylazine n'influence pas l'adsorption de la mésotrione (Mendes *et al.*, 2016). De même, la présence de diuron et d'atrazine ne modifie pas la mobilité du carbaryl dans le sol (Nkedi-Kizza and Brown, 1998).

De même, la persistance et la biodisponibilité des pesticides peuvent être influencées par des adjuvants (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2007; Kucharski and Sadowski, 2009; Cabrera *et al.*, 2010; Kucharski *et al.*, 2011). Des temps de demi-vie plus grands ont ainsi été reportés pour l'atrazine et le coumaphos en présence de surfactants non-ioniques (Mata-Sandoval *et al.*, 2001). Il a également été montré une plus grande persistance de la protéine Cry de *Bacillus thuringiensis* dans le sol quand elle est épanchée sous forme de biopesticide formulé, par rapport à la protéine pure, montrant un effet protecteur des adjuvants (Hung *et al.*, 2016).

Enfin, la persistance des pesticides dans les sols peut aussi être influencée par la présence d'autres substances actives, les effets étant variables selon les molécules. Les temps de demi-vie dans le sol peuvent en effet être réduits (Alves, 2012) ou au contraire augmentés (Karanth *et al.*, 1984; Fogg *et al.*, 2003; Ke-Bin *et al.*, 2008; Nunes and Vidal, 2008; White *et al.*, 2010). Ces effets ne sont cependant pas généralisables à l'ensemble des molécules, puisque dans certains cas, la persistance de pesticides n'a pas été influencée par la présence d'autres molécules (Ashburn Poppell *et al.*, 2002; Swarcewicz and Gregorczyk, 2012).

### 1.1.3. Dans les eaux

Peu d'études ont comparé le devenir des pesticides purs ou formulés dans le compartiment aquatique. Seuls les travaux de Bromilow *et al.* (2003) se sont intéressés à l'étude du devenir de plusieurs pesticides dans un système eau/sédiment, révélant une dissipation supérieure de l'isoproturon formulé par rapport à la substance active pure, tandis que l'effet inverse a été observé pour la pendiméthaline. Dans cette étude, la dissipation a principalement été attribuée à des processus d'adsorption sur les sédiments, indiquant un effet des adjuvants présents dans les formulations différents pour les deux pesticides.



## 1.2. Effets des mélanges de pesticides sur la transformation des molécules individuelles

### 1.2.1. Photo-transformation

L'effet des adjuvants sur la photo-dégradation de pesticides a été mis en évidence dans l'eau, avec notamment une photo-dégradation plus importante du *S*-métolachlore formulé (Mercantor Gold®) par rapport à la substance active pure (Gutowski *et al.*, 2015). De même, à la surface de cire cuticulaire synthétique mimant la surface de feuille, la photo-dégradation de la mésotrione et du nicosulfuron est considérablement augmentée en présence d'adjuvants par rapport à chacune des molécules pures (Ter Halle *et al.*, 2010). La photo-dégradation des deux pesticides précités, formulés en mélange, est encore augmentée par rapport à la dégradation des deux formulations séparément.

Ce processus étant également utilisé dans le traitement des eaux *via* les procédés de photo-oxydation avancée, quelques études ont montré des comportements très différents en fonction des molécules : le traitement UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a entraîné un taux de dégradation moins important de l'ioprodine en présence de carbofurane par rapport à la molécule seule, tandis que la présence d'ioprodine n'affecte pas la dégradation de carbofurane (Lopez-Alvarez *et al.*, 2016). De même, le procédé d'oxydation avancée photo-Fenton (Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV) s'est également avéré réduire la dégradation de l'alachlore formulé par rapport à la substance active pure (Huston and Pignatello, 1999). Enfin, le traitement des formulations commerciales de tébuthiuron et amétryne par le procédé photo-électro-Fenton solaire est légèrement moins efficace (c.-à-d. taux inférieur de dégradation) pour le mélange des deux formulations par rapport aux formulations traitées séparément (Gozzi *et al.*, 2016).

### 1.2.2. Transformation biotique

#### 1.2.2.1. Etudes *in situ*

La présence d'agents d'enrobage des semences influence la dégradation de certains pesticides dans le sol. Une inhibition de la dégradation du triticonazole a ainsi été observée en présence de surfactants, mais uniquement quand ces derniers étaient ajoutés à de fortes doses (1 g kg<sup>-1</sup> de sol) (Charnay *et al.*, 2000).

Plusieurs études ont montré l'impact de la présence de certains pesticides sur la dégradation d'autres pesticides dans le sol. La dégradation peut ainsi être inhibée, comme c'est le cas pour le chlorpyrifos et le fénamiphos en présence de chlorothalonil (Singh *et al.*, 2002), pour la mésotrione en présence de *S*-métochlor (Joly *et al.*, 2012), ou encore pour l'atrazine en présence de glufosinate et de sulfate d'ammonium (Zablotowicz *et al.*, 2008) ou en présence de glyphosate (Krutz *et al.*, 2003). Deux pesticides peuvent aussi inhiber réciproquement leur biodégradation quand ils sont associés en mélange, ce qui est le cas pour le glyphosate et le diflufenican (Tejada, 2009). A l'inverse, certains pesticides peuvent favoriser la biodégradation d'un autre pesticide. Ainsi, la dégradation microbienne du fluometron (Lancaster *et al.*, 2008) et la minéralisation de l'atrazine (Bonfleur *et al.*, 2010) sont augmentées en présence de glyphosate, par rapport à ce qui est observé avec les molécules seules. L'hypothèse avancée dans ce dernier cas est que l'apport d'une source d'azote par le glyphosate favoriserait la flore microbienne responsable de la dégradation de l'atrazine.

#### 1.2.2.2. Etudes *in vitro*

L'impact des adjuvants sur la biodégradation de pesticides a été mis en évidence à l'aide de souches pures de microorganismes capables de dégrader les substances actives. Ainsi, les effets des adjuvants (formulation Callisto<sup>®</sup>, 100 g L<sup>-1</sup> de mésotrione) sur la dégradation de la mésotrione sont variables suivant les souches : (i) inhibition de la biodégradation de la mésotrione formulée par les souches de *Bacillus* sp. testées, (ii) effets non significatifs des adjuvants sur la dégradation de la mésotrione par une souche de *Pantoea* sp. et (iii) stimulation de la biodégradation de la mésotrione en présence d'adjuvants par la souche *Escherichia coli* ATCC 11303, pouvant s'expliquer par la biodégradation simultanée d'adjuvants et de la substance active (co-métabolisme) (Youness, 2013).

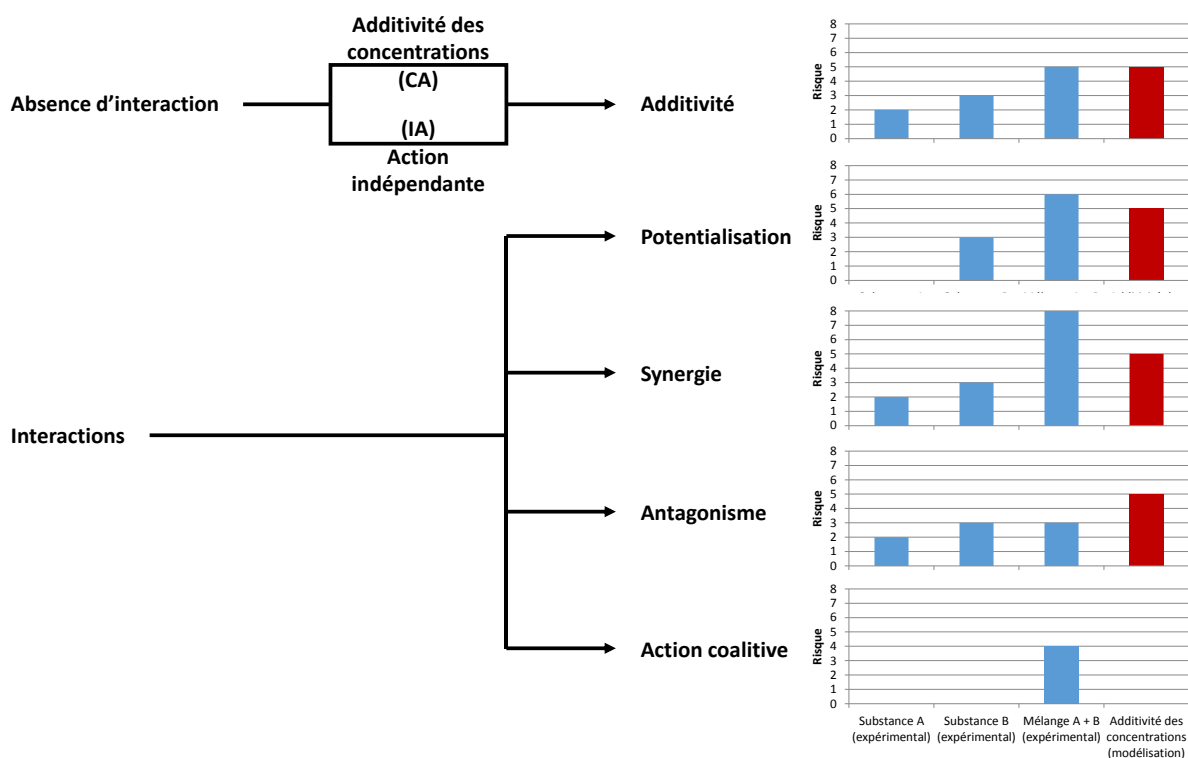
Les effets des mélanges de pesticides sur leur biodégradation ont également été mis en évidence à l'aide de consortia et d'isolats microbiens cultivés en conditions de laboratoire. Ainsi, la dégradation de l'atrazine par un consortium microbien n'a pas été affectée par la présence de cyanazine, simazine ou métribuzine ajoutées séparément mais l'ajout des 3 molécules simultanément a augmenté d'un facteur 2 à 3 le temps de demi-vie de l'atrazine (Grigg *et al.*, 1997). De même, la diminution de la dégradation du méthyle-parathion et du

chlorpyrifos par un consortium bactérien a été constatée quand les deux pesticides étaient en mélange par rapport à la dégradation observée pour chaque pesticide séparément (Pino and Peñuela, 2011). Au contraire, la dégradation du quinclorac par la souche *Ochrobactrum* sp. LS s'est avérée augmentée en présence de bensulfuron-méthyle par rapport à la dégradation du quinclorac seul (Lü *et al.*, 2008).

## 2. Effets des mélanges de pesticides sur leur (éco)toxicité microbienne

Les premières descriptions de la toxicité de mélanges de molécules datent du début du XX<sup>ème</sup> siècle et ont conduit depuis au développement de trois principaux modèles (Figure 3). Les deux premiers (le modèle d'addition des concentrations, *Concentration Addition* (CA) ou « *Loewe additivity* » et le modèle d'action indépendante, *Independent Action* (IA) ou « *Bliss independance* ») sont appliqués en absence d'interaction entre les molécules du mélange (Loewe and Muischnek, 1926; Bliss, 1939; Plackett and Hewlett, 1948). Le troisième modèle est utilisé dans le cas où il y a des interactions entre molécules, menant à un effet synergique ou antagoniste (Plackett and Hewlett, 1952).

Ainsi, un **effet additif** signifie que l'effet du mélange de substances est égal à la somme des effets de chaque substance considérée individuellement, que les cibles soient identiques ou non. Le terme de **potentialisation** est utilisé pour décrire une augmentation de la toxicité d'une substance causée par une autre substance n'ayant pas d'effet. Un effet est qualifié de **synergique** quand l'effet du mélange de plusieurs substances est supérieur à la somme des effets de chaque substance considérée individuellement. A l'inverse, l'**antagonisme** correspond à la diminution de la toxicité d'une substance par une autre. Enfin, l'**action coalitive** décrit deux substances n'ayant un effet que si elles sont en mélange. Une revue bibliographique de 2014 a recensé les cas de synergie et d'antagonisme, observés dans les études de toxicité des mélanges de pesticides (Cedergreen, 2014). Ces deux types d'interactions sont définis dans cette revue *via* le ratio de déviation par rapport au modèle (MDR, *Model Deviation Ratio*), correspondant au rapport de la « concentration efficace du mélange prédite par le modèle CA » sur la « concentration efficace du mélange observé ». La synergie correspond ainsi à un  $MDR > 2$ , l'additivité des concentrations à  $0,5 \leq MDR \leq 2$  et l'antagonisme à un  $MDR < 0,5$ . La majorité des études font état d'un effet additif. Les cas de synergie et d'antagonisme sont observés la plupart du temps uniquement pour les concentrations testées les plus élevées.



**Figure 3.** Représentation schématique des modèles théoriques de l'effet des mélanges de molécules toxiques (RECORD, 2011; Heys *et al.*, 2016).

Dans l'environnement, les effets des mélanges de pesticides sont très souvent complexes, ce qui oblige à considérer plusieurs modèles. L'approche dose-réponse est communément utilisée pour évaluer la toxicité de mélanges de molécules. Cependant, des limitations techniques existent en raison des méthodes de quantification ou de facteurs influençant la réponse qui ne sont pas nécessairement identifiés. D'autres limitations viennent du manque de connaissances sur les doses à tester et les variabilités interspécifiques. La principale difficulté est donc de bien définir la toxicité attendue de chaque molécule du mélange, ce qui nécessite d'identifier le mode d'action et les interactions entre molécules.

La suite de ce chapitre sera consacrée uniquement à la toxicité des mélanges de pesticides vis-à-vis des microorganismes. Là encore, la recherche bibliographique ne se veut pas exhaustive, mais donne tout de même un aperçu des effets que peuvent causer les mélanges de pesticides sur le compartiment microbien de l'environnement.

## 2.1. Evaluation de l'impact sur les microorganismes : tests standardisés et souches isolées

La partie des pesticides qui n'est pas interceptée par les plantes atteint le sol et peut en altérer les propriétés chimiques et biologiques, notamment en impactant les microorganismes présents. Or, les microorganismes sont connus pour assurer des fonctions écosystémiques majeures dans l'environnement, telles que le recyclage de la matière organique, la production primaire, ou encore la fixation de l'azote. Leur très grande diversité (structurale et fonctionnelle) leur confère un avantage adaptatif en cas d'exposition à des mélanges de molécules potentiellement toxiques comme les pesticides. Malgré tout, ces communautés microbiennes sont sujettes à des modifications (de structure, de biomasse, de fonctions) pouvant entraîner une perturbation du fonctionnement global de l'écosystème (Figure 4). Il est donc primordial d'évaluer avec précision l'impact des mélanges de pesticides sur les microorganismes.

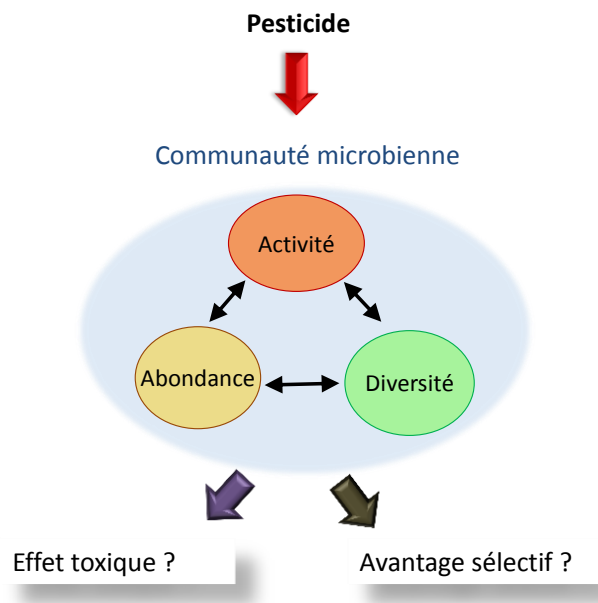


Figure 4. Impact des pesticides sur les communautés microbiennes.

Des tests standardisés ont été développés par l'Union Européenne (Organisation de Coopération et de Développement Économiques, OCDE) et les États-Unis (*Environmental Protection Agency*, EPA) afin d'identifier et de caractériser le risque des pesticides pour les organismes vivants dans l'environnement. Cependant, l'évaluation de ce risque pour les communautés microbiennes est restreinte à l'utilisation de deux tests standardisés évaluant la minéralisation de l'azote et du carbone (tests OCDE N° 216 et 217). Ces tests sont, de plus,

limités à l'évaluation de la toxicité de la substance active uniquement, sans prendre en compte d'éventuels effets des adjuvants contenus dans les formulations commerciales.

Un autre test standardisé, Microtox<sup>®</sup> (NF EN ISO 11348-3), permet également d'apprécier la toxicité aiguë d'une molécule en se basant sur l'inhibition de la fluorescence de la bactérie marine *Aliivibrio fischeri*. Ainsi, l'existence de différents types d'interactions a pu être montrée : synergie ou antagonisme pour les mélanges binaires, ternaires ou quaternaires de cyromazine, fénamiphos, formétanate et propamocarbe (Fernández-Alba *et al.*, 2001), synergie pour quatre des 6 mélanges binaires testés de prochloraz avec l'acifluorfen, le diquat ou le terbuthylazine, et d'azoxystrobin avec le chlorfenvinphos, le diméthoate ou le pirimicarbe (Cedergreen *et al.*, 2006) ou avec les mélanges binaires de triazophos, profenofos et chlorpyrifos-méthyle (Mansour *et al.*, 2015), antagonisme pour le mélange fosthiazate + métalaxyl-M (Kungolos *et al.*, 2009) ou au contraire absence d'interaction (toxicité correspondant au modèle CA) pour les mélanges composés de *S*-métolachlore + bénomaxor + mésotrione + nicosulfuron et de mésotrione + nicosulfuron (Joly *et al.*, 2013). Cette dernière étude a également mis en évidence une plus forte toxicité des formulations commerciales de *S*-métolachlore + bénomaxor (Dual Gold Safener<sup>®</sup>), mésotrione (Callisto<sup>®</sup>) et nicosulfuron (Milagro<sup>®</sup>) par rapport à celle des substances actives pures correspondantes. Les effets peuvent également varier en fonction de la dose de pesticides, comme c'est le cas pour les mélanges binaires de monolinuron, linuron et diuron, pour lesquels des interactions de type synergie, antagonisme ou le modèle CA ont pu être observées suivant les concentrations en pesticides testées (Gatidou *et al.*, 2015).

Cet essai est cependant limité à l'évaluation de la toxicité vis-à-vis d'une seule espèce. Une revue bibliographique a d'ailleurs mis en évidence le manque de représentativité des études de toxicité des pesticides sur les microorganismes, les auteurs ayant recensé environ 200 études basées sur l'analyse d'un seul critère d'une seule espèce, et pour un seul pesticide à chaque fois (Puglisi, 2012).

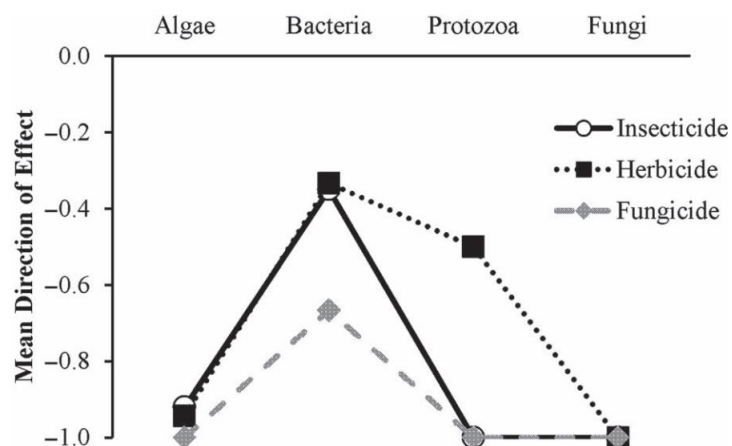
D'autres études ont par ailleurs déterminé l'effet des adjuvants sur l'impact de substances actives sur des souches pures de microorganismes (tests non standardisés). L'effet du glyphosate sur trois souches microbiennes entrant dans la composition de starters microbiens utilisés dans les produits laitiers a ainsi été comparé à l'effet de la formulation commerciale Roundup<sup>®</sup> (Clair *et al.*, 2012). Les résultats ont montré une inhibition supérieure de la croissance et de la viabilité des souches testées par la formulation commerciale, comparée à la substance active pure. Le métabolisme énergétique de la souche fongique *Aspergillus*

*nidulans* est également plus fortement altéré par le Roundup® que par le glyphosate pur (Nicolas *et al.*, 2016). Des travaux ont également mis en évidence un impact plus important des formulations commerciales de mésotrione et tébuconazole, ainsi que du mélange des deux, sur la croissance de plusieurs souches bactériennes, en comparaison aux substances actives seules (Youness, 2013). Il en est de même pour certains insecticides néonicotinoïdes qui ont un impact plus important sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* quand ils sont sous forme commerciale par rapport aux substances actives (Mattiuzzi Ušaj *et al.*, 2014).

L'évaluation de l'impact des mélanges de pesticides doit donc passer nécessairement par des études prenant en compte la diversité des molécules auxquelles peuvent être exposés les microorganismes, et leurs interactions potentielles.

### 2.1.1. Impact sur les microorganismes aquatiques

D'une manière générale, les études font état d'un impact direct négatif des pesticides sur les microorganismes dans les milieux aquatiques (Figure 5), avec un effet dépendant du taxon considéré et du type de pesticide (Staley *et al.*, 2015). Les microalgues et les champignons sont les plus impactés et les bactéries, les moins perturbées.



**Figure 5.** Interactions entre le type de pesticide (insecticide, herbicide ou fongicide) et le taxon (algues, bactéries, protozoaires ou champignons) sur l'abondance microbienne. 0 = absence d'effet ; -1 = baisse significative (Staley *et al.*, 2015).

Les microalgues et les cyanobactéries constituent la base de la chaîne alimentaire des milieux aquatiques et jouent un rôle clé dans les cycles des nutriments. De ce fait, l'impact des mélanges de pesticides sur les écosystèmes aquatiques peut être évalué en déterminant

leur effet sur ces producteurs primaires, avec des tests standardisés (test OCDE N° 201). Cependant, les études publiées de l'impact de mélanges de pesticides sur les microorganismes aquatiques sont peu nombreuses. Il a cependant été montré qu'un mélange d'atrazine avec le chlorpyrifos ou le chlorothalonil présentait, respectivement, une toxicité égale à la somme des toxicités de chaque molécule, ou une toxicité supérieure à la somme des toxicités des deux molécules (interaction de type synergie) pour la microalgue marine *Dunaliella tertiolecta* (DeLorenzo and Serrano, 2003). L'hypothèse est que la dégradation de la membrane cellulaire par le chlorothalonil faciliterait l'entrée de l'atrazine dans la cellule et son action inhibitrice sur la photosynthèse.

L'impact d'herbicides seuls ou en mélanges binaires sur la microalgue d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* est variable suivant les molécules testées. Une interaction de type antagonisme a été mise en évidence pour le mélange simazine + terbuthylazine (Perez *et al.*, 2011) et pour le mélange fosthiate + métalaxyl-M (Kungolos *et al.*, 2009). Les mécanismes à l'origine de cet effet sont très peu décrits, même si certaines hypothèses, telles que la diminution de l'entrée des molécules dans la cellule ou la modification de la cible moléculaire ont été avancées. Au contraire, un effet synergique a été démontré pour l'atrazine associée à la simazine ou à la terbuthylazine, et pour le métolachlore associé à ces deux mêmes molécules (Perez *et al.*, 2011). Un effet additif de la toxicité des mélanges binaires de diuron, tébuthiuron, atrazine, simazine, hexazinone et des produits de transformation déséthyl-atrazine (DEA) et 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) a également pu être montré sur les trois espèces de microalgues benthiques *Navicula* sp., *Cylindrotheca closterium* et *Nephroselmis pyriformis* (Magnusson *et al.*, 2010).

### 2.1.2. Impact sur les microorganismes édaphiques

Le sol étant le récepteur primaire des pesticides, les microorganismes édaphiques sont les premiers à être potentiellement impactés par les substances actives épandues (notamment celles qui sont relativement toxiques et persistantes). Bien que considérés comme des organismes non-cibles, ils peuvent posséder la cible moléculaire de certaines substances actives (Chowdhury *et al.*, 2008). De plus, certaines molécules peuvent être transformées en métabolites, et l'ensemble de ces composés peut alors également impacter les processus microbiens édaphiques, et ainsi perturber le fonctionnement de l'écosystème.



Cependant, l'apport de substances actives peut aussi conférer un avantage à certaines populations microbiennes, soit direct pour celles qui sont capables de métaboliser ces substances, soit indirect pour les populations qui assimilent des produits de transformation générés par d'autres populations, ou qui, insensibles aux pesticides, profitent d'une niche écologique laissée vacante par une population sensible.

#### 2.1.2.1. Impact sur l'abondance des microorganismes

La biomasse microbienne représente la quantité de "carbone vivant" contenue dans les microorganismes du sol, essentiellement les bactéries et les champignons. Elle constitue un indicateur précoce de la dynamique de la matière organique qui réagit rapidement aux modifications favorables ou défavorables du milieu comme par exemple, la présence de pesticides. Il n'y a cependant que peu d'études ayant pris en compte l'effet de mélanges de pesticides sur cette biomasse. Dans la majorité de ces études, une réduction de la biomasse microbienne a été observée en présence de mélanges de pesticides comparée aux molécules seules : c'est le cas pour le glyphosate associé à l'endosulfan, en comparaison du glyphosate seul (Pereira *et al.*, 2008), pour le chlorpyrifos associé au nicosulfuron, en comparaison du chlorpyrifos seul (de Oliveira *et al.*, 2009), et pour le chlorothalonil associé au chlorpyrifos (Chu *et al.*, 2008) ou au chlorpyrifos + fénamiphos, en comparaison du chlorothalonil seul (Singh *et al.*, 2002). Cependant, il a été montré que l'association du glyphosate et du diflufenican engendrait une augmentation de la biomasse microbienne du sol par rapport au traitement par chaque pesticide individuellement (Tejada, 2009). L'effet des mélanges de pesticides sur la biomasse microbienne est donc variable en fonction des pesticides.

#### 2.1.2.2. Impact sur l'activité des microorganismes

Le métabolisme des microorganismes présents dans le sol participe également aux réactions biochimiques impliquées dans les cycles biogéochimiques tels que ceux de l'azote, du phosphore, du soufre et du carbone. Ainsi, toute perturbation de ces activités, par les mélanges de pesticides par exemple, peut avoir des conséquences importantes sur le fonctionnement de l'écosystème.

Un des indices du bon fonctionnement des sols est l'activité de respiration, qui renseigne sur le niveau de l'activité globale des microorganismes. Ce processus correspond à la

dégradation et l'oxydation de la matière organique, et conduit à la libération de CO<sub>2</sub>. La perturbation des processus de transformation de la matière organique en présence de mélanges de pesticides peut donc être mesurée à l'aide de l'activité de respiration. La majorité des études ont montré un effet inhibiteur de la présence de mélanges de pesticides sur la respiration du sol, comme dans le cas du mélange des deux fongicides mancozèbe et diméthomorphe (Cycoń *et al.*, 2010), du chlorpyrifos associé au nicosulfuron (de Oliveira *et al.*, 2009) et du tébuconazole associé à la carbendazime, les effets de ces derniers étant additifs (Wang *et al.*, 2016a). L'inhibition de la respiration par les mélanges de pesticides en comparaison aux molécules seules peut s'expliquer par la sensibilité de certaines espèces au multi-traitement. La plupart du temps, elle est effective à de fortes concentrations de pesticides, tandis qu'à de plus faibles concentrations, c'est l'effet inverse qui est observé (stimulation des microorganismes capables d'utiliser les pesticides comme sources de carbone, conduisant à une augmentation de la respiration) (Wang *et al.*, 2016a). L'oxygène peut également être détourné pour oxyder des composés organiques tels que les pesticides, au détriment de l'activité respiratoire pour laquelle il sert d'accepteur terminal d'électrons, expliquant l'inhibition de l'activité respiratoire (Tejada, 2009). Il peut également ne pas y avoir d'interaction entre les pesticides d'un mélange, comme c'est le cas pour l'atrazine, la pendiméthaline et le métolachlore (Anhalt *et al.*, 2000).

De même, l'activité de minéralisation du carbone organique peut être affectée par les mélanges de pesticides. En effet, cette activité est diminuée quand l'amétryne est associée à de fortes concentrations en glyphosate (synergie) mais est au contraire augmentée en présence de faibles concentrations en glyphosate (antagonisme) (Alves, 2012). Des résultats contrastés ont aussi été obtenus avec, par exemple, l'inhibition de la minéralisation du carbone suite à l'addition de glyphosate formulé dans un sol traité avec des formulations de fluométuron, aldicarbe ou méfénoxam + pentachloronitrobenzène (Lancaster *et al.*, 2006), et, au contraire, l'augmentation de cette activité après exposition des microorganismes à un mélange d'atrazine et de glyphosate par rapport à l'atrazine seule (Haney *et al.*, 2002; Krutz *et al.*, 2003). D'autres travaux ont également montré la réduction de la minéralisation du carbone organique quand le glyphosate est associé à l'endosulfan (synergie), en comparaison du glyphosate seul (Pereira *et al.*, 2008).

Les enzymes jouant un rôle prépondérant dans la dégradation de la matière organique d'origine naturelle ou anthropique, le suivi d'activités généralistes (ex. déshydrogénase,

catalase, phosphatase, et bêta-glucosidase) permet également de mettre en évidence la perturbation du fonctionnement du sol en réponse aux contaminants (Parween *et al.*, 2016).

Des effets négatifs (synergie) de l'association de pesticides en mélanges en comparaison aux molécules seules ont ainsi été mis en évidence dans le cas du chlorothalonil associé au chlorpyrifos et au fénamiphos sur les activités déshydrogénase et phosphatase (Singh *et al.*, 2002), du glyphosate et du diflufenican sur les activités déshydrogénase, uréase, bêta-glucosidase, phosphatase et arylsulfatase (Tejada, 2009), de l'imidaclopride + triadiméfon sur l'activité cellulase (Deborah *et al.*, 2013) et de la cyperméthrine associée au monocrotophos ou au quinalphos sur les activités cellulases et amylases (Gundi *et al.*, 2007). Il a également été mis en évidence une inhibition (effet additif) du tébuconazole et de la carbendazime sur les activités uréase, alcaline phosphatase, invertase et déshydrogénase (Wang *et al.*, 2016a). Au contraire, d'autres activités enzymatiques peuvent être stimulées (effet antagoniste) par des pesticides associés en mélange en comparaison des molécules seules, comme les activités catalase, uréase et acide phosphatase en présence d'un mélange de diflufenican, mésosulfuron-méthyle et iodosulfuron-méthyle-sodium (Baćmaga *et al.*, 2015). Les auteurs précisent que les effets observés sur l'activité catalase (clivage du peroxyde d'hydrogène) peuvent être liés à la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de pesticides. Il faut également noter que l'effet des mélanges de pesticides sur les activités enzymatiques est dépendant de la concentration en pesticides testée, avec, dans la plupart des cas, un effet synergique observé à de faibles doses, et antagoniste à de fortes doses.

Des activités spécifiques, notamment celles impliquées dans le cycle de l'azote, peuvent également être affectées directement ou indirectement par les mélanges de pesticides en favorisant ou défavorisant les microorganismes qui les réalisent, ou en activant ou désactivant certaines enzymes spécifiques (Kinney *et al.*, 2005) impliquées dans les différentes étapes permettant de maintenir la balance entre les formes oxydées et réduites de l'azote : (i) fixation de l'azote atmosphérique (production d'ammonium à partir de diazote), (ii) ammonification (minéralisation de l'azote caractérisée par la libération d'ammonium inorganique au cours de l'assimilation de matière organique azotée par les microorganismes), (iii) nitrification (processus aérobie d'oxydation de l'ammonium en nitrates) et (iv) dénitrification (processus anaérobie de réduction des nitrates en diazote).

Ainsi, des travaux ont montré l'augmentation (effet synergique) de l'ammonification et de la nitrification dans deux sols traités par les mélanges de monocrotophos + mancozèbe et chlorpyrifos + carbendazime en comparaison des traitements avec les molécules seules

(Srinivasulu *et al.*, 2012b), ainsi qu'une augmentation de l'abondance des membres appartenant au genre *Azospirillum* (Srinivasulu *et al.*, 2012a). Le mélange de deux fongicides (mancozèbe et diméthomorphe) a également augmenté l'ammonification dans le sol, et diminué la quantité de nitrates et le nombre de bactéries nitrifiantes et fixatrices d'azote (Cycoń *et al.*, 2010). Il a également été montré que la minéralisation de l'azote organique dans le sol était favorisée quand l'atrazine était associée au glyphosate par rapport à l'atrazine seule (Haney *et al.*, 2002; Krutz *et al.*, 2003) et que l'association du thiobencarbe avec le molinate ou le chlorpyrifos dans deux sols différents entraînait une inhibition transitoire de la nitrification (Saison *et al.*, 2009). Enfin, les résultats d'une étude en microcosmes de sol s'intéressant à l'impact du mélange de trois herbicides formulés (*S*-métolachlore, Dual Gold Safener®; mésotrione, Callisto® et nicosulfuron, Milagro®) sur l'abondance, la diversité et les activités des communautés microbiennes du sol ont montré une relative résistance de ces communautés, avec cependant des effets transitoires des traitements sur les communautés impliquées dans le cycle de l'azote (augmentation de l'ammonification et baisse de la nitrification à court terme, puis augmentation de la dénitrification et accumulation de nitrates) (Joly *et al.*, 2015). Dans une étude similaire utilisant les trois formulations d'herbicides citées précédemment, Joly *et al.* (2014) ont également montré un effet significatif du traitement par la formulation commerciale du *S*-métolachlore sur la biomasse et la composition des communautés phototrophes, en présence ou non des autres herbicides du mélange étudié.

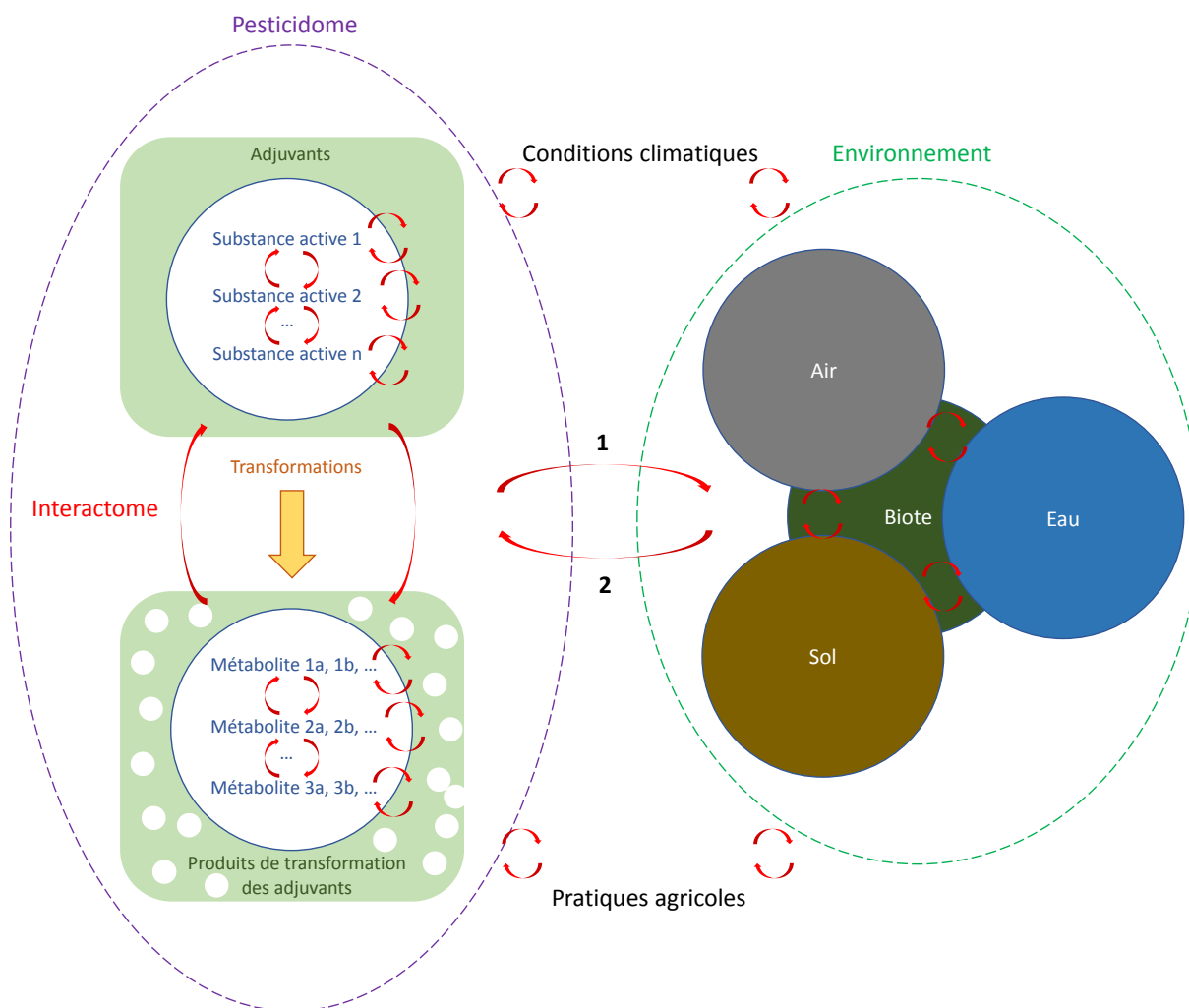
#### 2.1.2.3. Impact sur la structure des communautés microbiennes

L'impact des mélanges de pesticides sur les communautés microbiennes peut se traduire par une modification de leur structure, évaluée dans un premier temps par des techniques culturales, et de plus en plus à l'aide de techniques moléculaires (empreintes moléculaires, séquençage, etc.). Un impact de l'atrazine associé au métolachlore a ainsi pu être mis en évidence sur la structure des communautés bactériennes et fongiques du sol, les modifications observées étant différentes de celles obtenues pour le traitement avec l'atrazine seule (Ayansina and Oso, 2006). Une étude en microcosmes de sol a également montré une baisse de diversité bactérienne et fongique suite au traitement par un mélange de *S*-métolachlore et de mésotrione, comparée aux changements de structure observés avec les molécules séparément (Joly *et al.*, 2012). Enfin, la structure des communautés microbiennes d'un sol traité avec un mélange de diflufenican, mésosulfuron-méthyle et iodosulfuron-méthyle-

sodium a été modifiée différemment par rapport au traitement avec les molécules séparées, avec une augmentation de l'abondance des bactéries litho- et organotrophes et des actinomycètes, et une baisse des champignons et du genre *Azotobacter* (Baćmaga *et al.*, 2015).

### 3. Conclusions

L'ensemble des résultats présentés montre à quel point il est difficile de déterminer l'effet combiné de plusieurs pesticides en mélange, et encore plus *in situ*. En effet, de nombreux paramètres entrent en jeu : la nature de chaque pesticide du mélange (propriétés physico-chimiques / écotoxicité), la matrice environnementale (eau / air / sol), le biote (microorganismes / macroorganismes), les conditions climatiques (température / humidité / ensoleillement) et les pratiques agricoles (labour / amendement / irrigation) (Figure 6). Un degré supplémentaire de complexité est ajouté avec les interactions intra- et inter-paramètres qui conditionnent le devenir et la toxicité des molécules des mélanges.



**Figure 6.** Représentation schématique des interactions entre le pesticide, l'interactome (flèches rouges) et l'environnement. **1** : écotoxicité et/ou source d'énergie et/ou de nutriments. **2** : transformations biotiques et abiotiques.

Il est cependant possible de faire ressortir certains points importants sur les effets de mélanges de pesticides comparés aux effets des molécules utilisées individuellement.

Concernant l'effet des mélanges sur leur devenir dans l'environnement :

(i) la **mobilité**, la **persistance** et la **biodisponibilité** d'une substance active au niveau des plantes et dans le sol sont en général modulées en présence d'**adjuvants** et/ou d'**autres substances actives**. Ces effets sont cependant variables selon la substance active étudiée. Bien que les surfactants présents dans les adjuvants augmentent d'une manière générale la dispersion et la solubilisation d'une substance active donnée, aucune information n'est disponible quant à la nature des processus qui permettent à une substance active d'influencer la mobilité, la persistance et la biodisponibilité d'une autre substance active.

(ii) La **photo-transformation** d'une substance active dans l'eau est d'une manière générale stimulée en présence d'autres molécules (**adjuvants** et/ou autres **substances**

**actives**). Il n'y a cependant pas d'étude ayant mis précisément en évidence les mécanismes à l'origine de cette stimulation. Les hypothèses pourraient être une augmentation de l'accessibilité de la substance active aux rayonnements lumineux par les surfactants, et la photolyse indirecte de la substance active suite à la production d'espèces radicalaires issues de la photo-transformation des autres molécules.

(iii) La **biotransformation** d'une substance active est, suivant les cas, inhibée ou accélérée en présence d'autres **substances actives** et/ou d'**adjuvants**. Ces effets peuvent résulter d'interactions entre les molécules influençant la biodisponibilité de la substance active, de modifications de la structure de la paroi cellulaire influençant l'entrée de la substance active dans la cellule, d'induction ou de répression de gènes codant des enzymes de dégradation, de l'impact négatif ou positif (ex. en servant de source de nutriments et/ou d'énergie) d'une substance active sur les microorganismes dégradant l'autre substance active. Cependant, les études citées dans ce document n'ont pas permis de mettre en évidence avec précision le rôle de chacun de ces phénomènes dans l'impact sur la biotransformation.

Concernant les effets des mélanges sur leur toxicité :

(i) en comparaison des molécules seules, la **toxicité des mélanges** de pesticides sur les **microorganismes des milieux aquatiques** est variable (effets antagonistes, synergiques, additivité des concentrations) en fonction de la nature de la molécule et de l'espèce concernée. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ces phénomènes : la modification de la membrane cellulaire par une substance active facilitant ainsi l'entrée d'une autre substance active dans la cellule et son action toxique, les interactions entre les molécules qui peuvent réduire leurs activités ou encore la modification de la cible moléculaire.

(ii) L'effet des mélanges de pesticides et des adjuvants sur la toxicité d'une substance active sur les **microorganismes édaphiques** est également variable (effets antagonistes, synergiques, additivité des concentrations, absence d'effet) en fonction des espèces et de la nature chimique et de la concentration des pesticides. Des effets sont notamment observés sur l'**abondance**, l'**activité** et la **structure** des communautés microbiennes. Les effets sur l'abondance sont variables en fonction des molécules et ne sont pas généralisables en raison du faible nombre d'études disponibles dans la littérature. Les effets des mélanges de pesticides ont été davantage décrits sur différentes activités des microorganismes, à la fois sur les activités généralistes (respiration, minéralisation du carbone), sur les activités enzymatiques généralistes (phosphatase, déshydrogénase, etc.) et sur les activités enzymatiques plus spécifiques (cycle de l'azote). Là encore, il n'est pas facile de généraliser

car les effets sont variables selon les molécules, mais la tendance globale indique tout de même un effet synergique à de faibles doses et un effet antagoniste à de plus fortes doses. Il n'y a en revanche pas d'hypothèse sur les mécanismes moléculaires à l'origine de l'effet des mélanges de pesticides sur les activités microbiennes spécifiques telles que celles impliquées dans les cycles biogéochimiques. Les mélanges de pesticides ont aussi des effets variables sur la structure des communautés microbiennes et différents groupes peuvent en être la cible (bactéries, champignons, phototrophes).





## Chapitre 2. Les herbicides choisis pour cette étude

### 1. La mésotrione

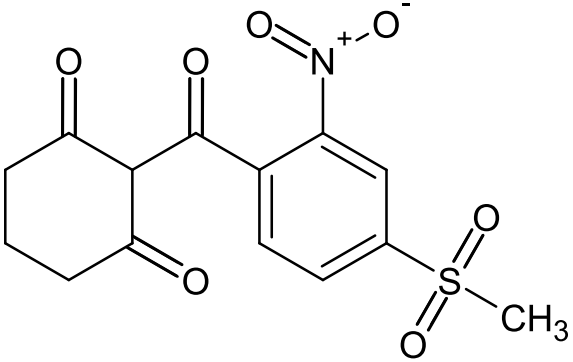
#### 1.1. Historique

La mésotrione appartient à la famille chimique des  $\beta$ -tricétones (benzoylcyclohexane-1,3-diones). La première description d'une molécule herbicide appartenant à cette famille chimique a été faite en 1977 par la firme agro-pharmaceutique Zeneca (Californie). Il s'agissait alors d'une tricétone naturelle (la leptospermone), phytotoxine présente dans les exsudats racinaires de la plante *Callistemon citrinus*. D'autres tricétones naturelles ont par la suite été décrites (Dayan *et al.*, 2007), mais l'amélioration de leurs propriétés herbicide, en termes d'efficacité et de dose utilisée, a nécessité des études de relations structure-activité conduisant à la famille des tricétones synthétiques commerciales parmi lesquelles la mésotrione (Lee *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 2001; Beaudegnies *et al.*, 2009). Cette dernière a été mise sur le marché pour la première fois aux Etats-Unis en 2001 par la société Syngenta Crop Protection (anciennement Zeneca) sous la formulation commerciale Callisto<sup>®</sup> (mésotrione 100 g L<sup>-1</sup>).

#### 1.2. Propriétés physico-chimiques

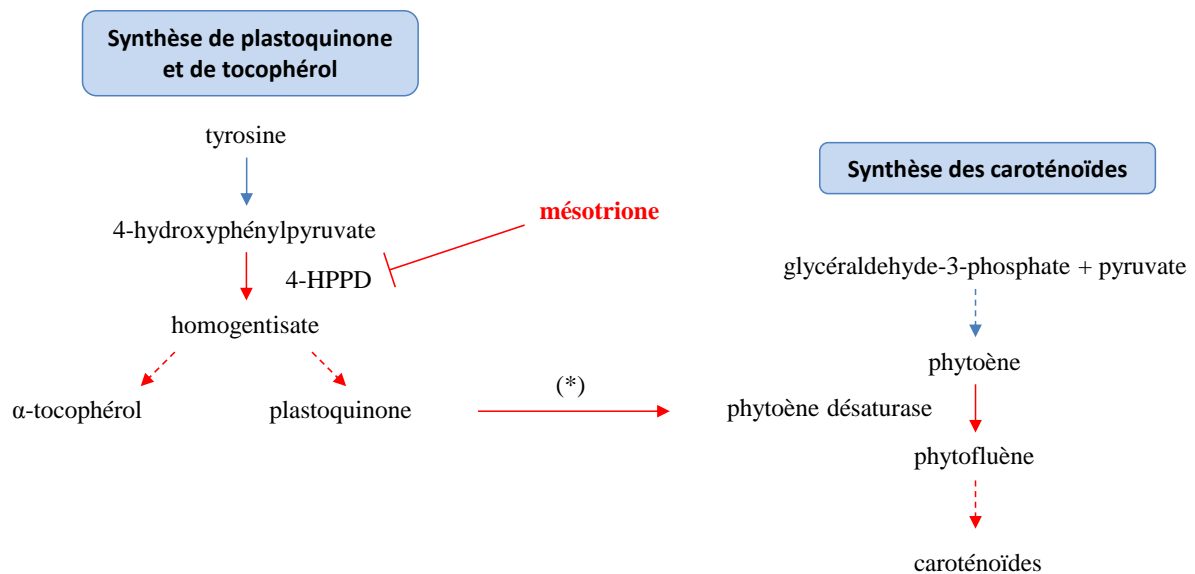
Les principales propriétés physico-chimiques de la mésotrione sont présentées dans le Tableau 1. La mésotrione (2-(4-méthylsulfonyl-2-nitrobenzoyl)cyclohexane-1,3-dione) est un acide faible ( $pK_a = 3,12$  à 20 °C) qui possède une solubilité dans l'eau supérieure à pH basique (22 g L<sup>-1</sup> à pH 9) par rapport à celle à pH acide (2,2 g L<sup>-1</sup> à pH 4,8) (WSSA, 2007). Très peu volatile, elle est stable dans l'eau dans une large gamme de pH et de température.

**Tableau 1.** Identité et propriétés physico-chimiques de la mésotrione (EFSA, 2016).

Substance active (s.a.)	Mésotrione
Activité	Herbicide
Nom complet	2-(4-méthylsulfonyl-2-nitrobenzoyl)cyclohexane-1,3-dione
Formule brute	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>7</sub> S
Masse molaire	339,3 g mol <sup>-1</sup>
Structure chimique	
Constante de Henry, K <sub>H</sub>	5,1 10 <sup>-7</sup> Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> à 20°C
Solubilité dans l'eau	160 mg L <sup>-1</sup> dans l'eau à 20°C
-log <sub>10</sub> (constante de dissociation), pK <sub>a</sub>	3,12

### 1.3. Mode d'action

La mésotrione est un herbicide systémique à action foliaire, actif sur les dicotylédones et les graminées. Comme l'ensemble des composés de la famille des  $\beta$ -tricétones, la mésotrione inhibe compétitivement la 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (4-HPPD), une enzyme clé de la biosynthèse des caroténoïdes chez les plantes (Mitchell *et al.*, 2001) (Figure 7). Les caroténoïdes empêchent la destruction des pigments chlorophylliens des plantes par l'excès d'énergie lumineuse. En conséquence, en leur absence, les rayonnements lumineux détruisent les chlorophylles, ce qui entraîne un blanchiment des tissus de la plante et, *in fine*, des nécroses et la mort de la plante.

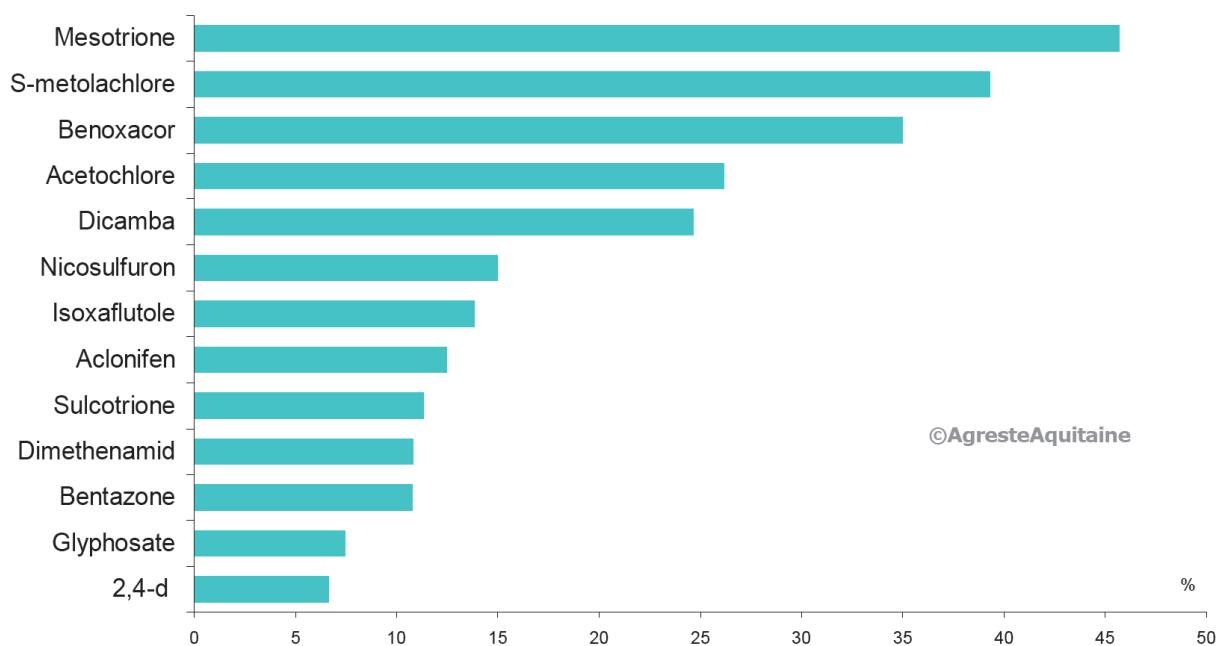


**Figure 7.** Mode d'action de la mésotrione chez les plantes. 4-HPPD : 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase. (\*) La plastoquinone est un cofacteur pour la phytoène désaturase.

#### 1.4. Réglementation – utilisations agronomiques

L'utilisation de la mésotrione est autorisée dans l'Union Européenne depuis le 1<sup>er</sup> octobre 2003, date de son inscription à l'Annexe I du règlement (CE) n° 1107/2009. Elle est appliquée principalement pour le traitement des cultures de maïs en post-levée, à une dose maximale de 150 g de substance active (s.a.) ha<sup>-1</sup>. Différentes formulations commerciales contenant la mésotrione comme seule substance active (ex. Callisto<sup>®</sup>, 100 g L<sup>-1</sup> de mésotrione) ou associée à d'autres substances herbicides telles que le S-métolachlore (ex. Calibra<sup>®</sup> 400 g L<sup>-1</sup> de S-métolachlore, 40 g L<sup>-1</sup> de mésotrione) ou le nicosulfuron (ex. Choriste<sup>®</sup> 30 g L<sup>-1</sup> de nicosulfuron, 75 g L<sup>-1</sup> de mésotrione) sont actuellement sur le marché.

La mésotrione est la molécule la plus utilisée sur les cultures de maïs en région Aquitaine, au sein de laquelle se trouvent les deux principaux départements producteurs de maïs en France (Landes et Pyrénées-Atlantiques). A titre indicatif, en 2011, 46% des surfaces traitées avec un herbicide ont reçu au moins une fois la substance mésotrione (AGRESTE, 2013) (Figure 8). Au niveau national, les ventes de cette substance n'ont cessé d'augmenter pour passer de 154 676 kg en 2011 à 192 412 kg en 2014 (AGRESTE, 2016).



**Figure 8.** Pourcentage des surfaces traitées en Région Aquitaine au moins une fois par les principales matières actives herbicides utilisées sur maïs grain en 2011 (AGRESTE, 2013).

## 1.5. Devenir dans l'environnement

### 1.5.1. Rétention dans les sols

Les temps de demi-vie ( $DT_{50}$ , *Dissipation Time 50%*) de la mésotrione sont variables (de 2 à 50 jours) en fonction de la composition du sol (Beraud *et al.*, 2001; Maeghe *et al.*, 2001; Rouchaud *et al.*, 2001; Dyson *et al.*, 2002; Chaabane *et al.*, 2008; Crouzet *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012; Joly *et al.*, 2012, 2015; Shaner *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015). Une étude récente a confirmé que le temps de demi-vie de la mésotrione était influencé par le pH des sols et était 6 fois plus élevé dans des sols à pH basique que dans des sols à pH acide (Barchanska *et al.*, 2015).

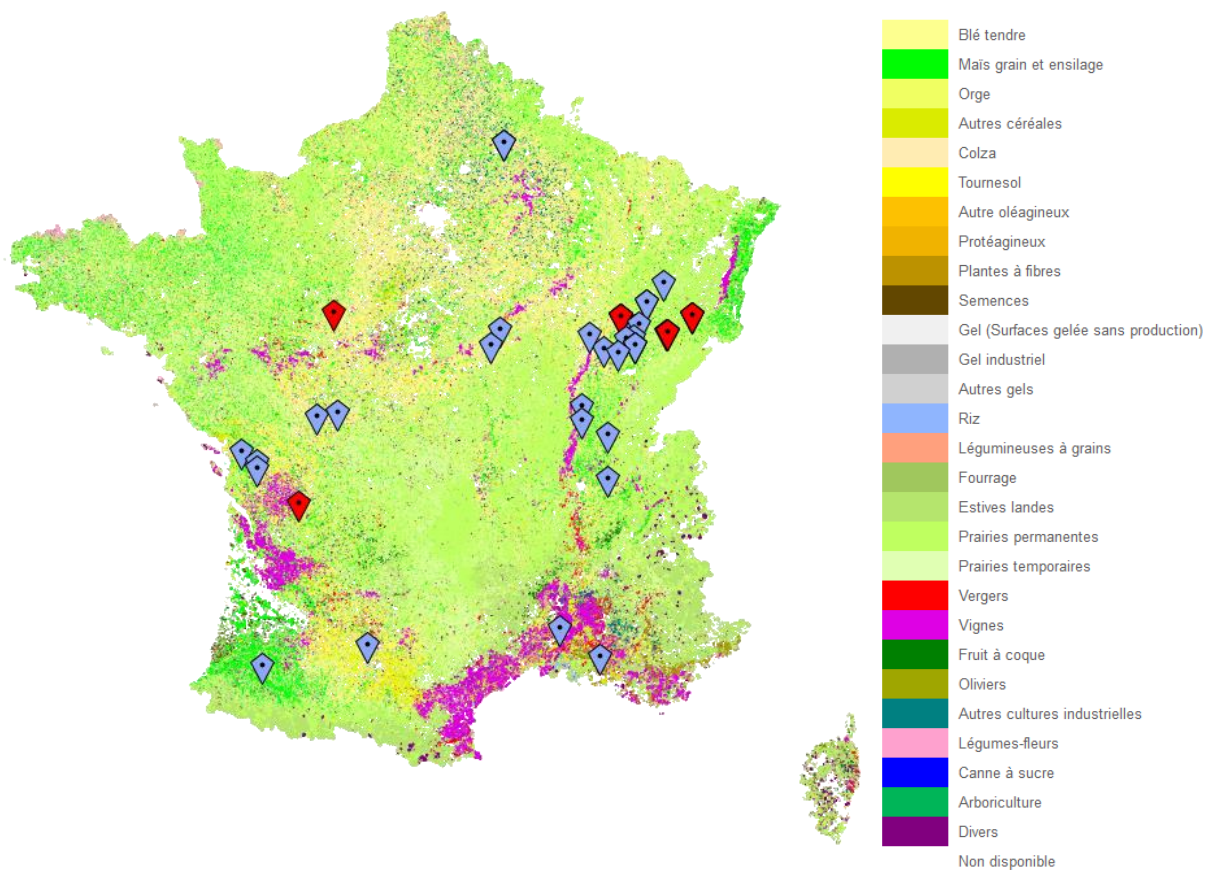
Les valeurs de coefficients d'adsorption ( $K_d$ ) de la mésotrione dans des sols aux caractéristiques variées (pH, teneurs en matière organique et en argiles) sont généralement relativement faibles (0,13 à 5 L kg<sup>-1</sup>). L'augmentation du pH peut également entraîner une diminution de son  $K_d$ , et donc de son adsorption, en faisant passer la mésotrione de sa forme moléculaire à sa forme ionisée (EFSA, 2016). En plus du pH, l'adsorption de la mésotrione peut également être favorisée par la teneur en argile des sols (Martinazzo *et al.*, 2011) ; en revanche, la présence d'autres pesticides (*S*-métolachlore + terbuthylazine) n'influence pas son adsorption (Mendes *et al.*, 2016).

La mésotrione est donc considérée comme faiblement à modérément mobile dans les sols et peut être potentiellement transportée vers les eaux de surface et souterraines après épandage. Cependant, le potentiel de lixiviation de cette molécule vers les eaux souterraines est faible, comme l'indique sa valeur de GUS (*Groundwater Ubiquity Score*) qui est de 1,47 (Pfeiffer, 2010).

Remarque :

Les valeurs de GUS permettent d'estimer le potentiel de lixiviation d'un pesticide vers les eaux souterraines, sur la base de leur persistance et de leur adsorption aux particules du sol :  $GUS = \log_{10}(DT_{50}) * [4 - \log_{10}(K_{oc})]$ , avec  $DT_{50}$ , *Dissipation Time* 50% (temps de demi-vie du pesticide considéré), et  $K_{oc}$ , coefficient de partage carbone organique/eau (Pfeiffer, 2010). Le potentiel de lixiviation du pesticide considéré est ainsi qualifié de très faible ( $GUS < 1$ ) à très élevé ( $GUS > 4$ ).

La mésotrione fait tout de même partie des 664 substances recherchées dans les cours d'eau de France métropolitaine (Agence de l'eau, SANDRE). Sa fréquence de détection (nombre de points de mesure avec quantification / nombre de points de mesure avec recherche) dans les eaux de surface est relativement élevée : 10,3 % en 2013 (SOeS, 2015b). En revanche, la fréquence de détection de la mésotrione dans les eaux souterraines analysées au niveau des points de captage d'eau potable en France métropolitaine pour la période 2003-2015 est bien plus faible (environ 0,09 %) (ADES, 2016) (Figure 9). Les zones de cultures environnant les sites de prélèvements d'eaux souterraines positifs pour la mésotrione sont majoritairement dédiées à la culture de maïs, soulignant le transport de la molécule depuis la surface d'épandage vers les nappes phréatiques.



**Figure 9.** Quantification de la mésotrione dans les eaux souterraines au niveau des sites de prélèvements d'eau potable en France métropolitaine pour la période 2003-2015 (ADES, 2016). Localisation des sites de prélèvement pour lesquels la mésotrione a été quantifiée (◇), et où la concentration était supérieure à  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  (◆). La carte indique également les zones de cultures déclarées par les exploitants en 2012 (registre parcellaire graphique (RPG) 2012, Agence de services et de paiement (ASP), Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt).

Il est important de noter ici que les métabolites des pesticides ne sont pas nécessairement inclus dans les analyses d'eaux de surface et souterraines. Ainsi, les deux principaux métabolites de la mésotrione décrits dans l'environnement (l'acide 4-méthylsulfonyl-2-nitrobenzoïque, MNBA et l'acide 2-amino-4-méthylsulfonylbenzoïque, AMBA (Alferness and Wiebe, 2002)) ne sont pas recherchés, ce qui ne permet pas de pouvoir apprécier le comportement global de cet herbicide dans l'ensemble des compartiments environnementaux. En effet, certains produits de transformation peuvent être plus persistants que la molécule mère, ce qui est le cas pour le MNBA et l'AMBA (Barchanska *et al.*, 2015).

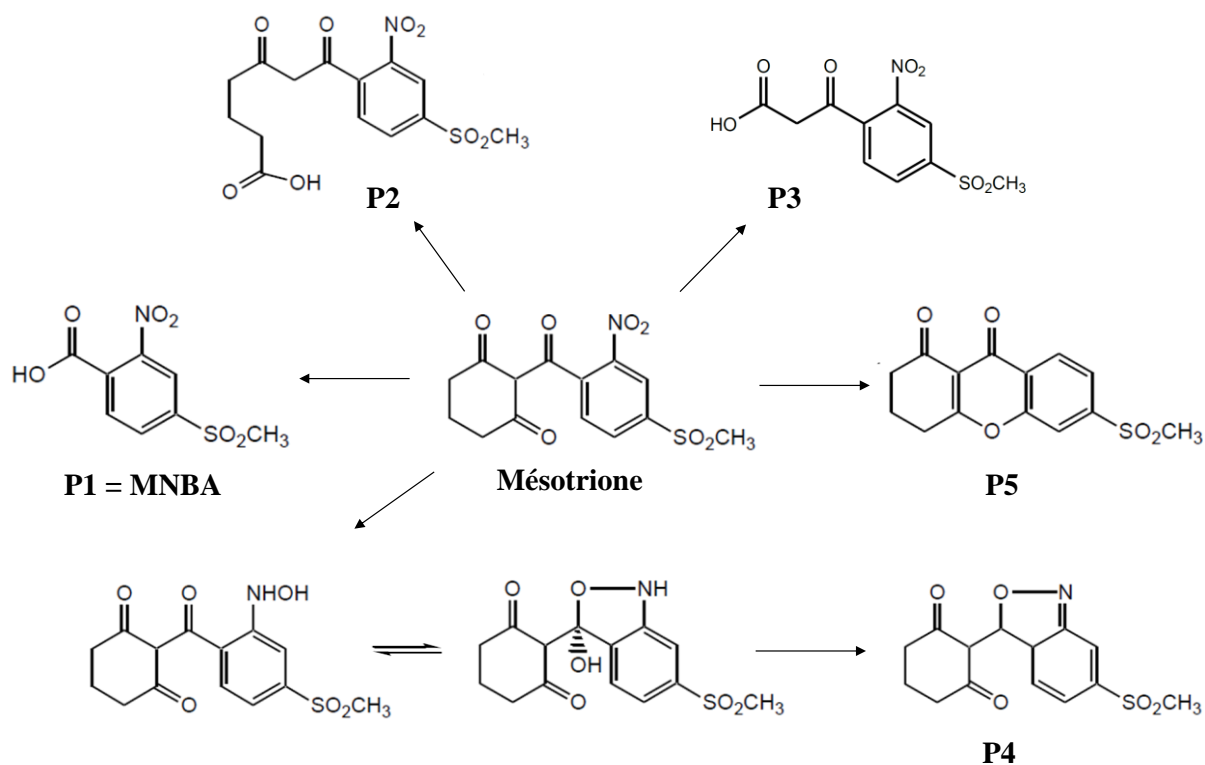
La faible fréquence de détection de la mésotrione dans les eaux souterraines, malgré sa forte solubilité et sa faible adsorption dans les sols, suggère la présence de processus de transformation efficaces qui éliminent cette molécule de l'environnement. Ces processus de transformation peuvent être abiotiques (majoritairement photolyse) ou biotiques (biotransformation principalement réalisée par les microorganismes).

### 1.5.2. Transformation abiotique : photo-transformation

La photolyse directe de la mésotrione est relativement lente (10 % après 30 jours d'irradiation) et conduit à la formation de 3 photo-produits : le MNBA, le P2 et le P3 (Ter Halle and Richard, 2006) (Figure 10). La photolyse indirecte, due à la présence d'espèces radicalaires hautement réactives générées par l'action du rayonnement solaire sur des composés photo-réactifs du milieu, est inhibée en présence de matière organique dissoute (Karpuzcu *et al.*, 2016) ou de nitrates (Ter Halle and Richard, 2006) et est au contraire augmentée quand la matière organique dissoute et les nitrates sont présents à de plus fortes concentrations (supérieures ou égales à 10 mg L<sup>-1</sup>) (Ter Halle and Richard, 2006). La forme ionisée de la mésotrione est moins sensible à la photolyse et à l'hydrolyse que sa forme moléculaire, expliquant des temps de demi-vie plus longs dans des sols à pH basique comparés à des sols à pH acide (Barchanska *et al.*, 2015).

La photo-transformation de la mésotrione à la surface des feuilles de plantes a également été étudiée à l'aide de films de cire cuticulaire reconstituée. Les résultats ont montré une vitesse de photo-transformation supérieure à celle observée dans l'eau et qui est augmentée lors de l'utilisation de la formulation Callisto<sup>®</sup> par rapport à la molécule pure. Ceci souligne l'effet des surfactants qui influencent la distribution de la mésotrione à la surface des feuilles (Lavieille *et al.*, 2008, 2009; Ter Halle *et al.*, 2010). Quatre photo-produits de la mésotrione ont été identifiés à la surface des films de cire cuticulaire: le MNBA, le P2, le P4 et le P5 (Ter Halle *et al.*, 2010) (Figure 10).





**Figure 10.** Photo-produits de la mésotrione obtenus par photolyse directe P1, P2, P3 (Ter Halle and Richard, 2006) et après irradiation sur de la cire cuticulaire reconstituée P1, P2, P4, P5 (Ter Halle *et al.*, 2010).

### 1.5.3. Transformation biotique

#### 1.5.3.1. Etudes *in situ*

Les différents processus impliqués dans le devenir de la mésotrione (processus d'adsorption, de dissipation et voies de transformation) ont été étudiés dans divers environnements tels que l'eau, les sols ou encore les plantes (Rouchaud *et al.*, 2001; Alferness and Wiebe, 2002; Batisson *et al.*, 2010; Martinazzo *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012, 2014; Deng *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013; Alekseeva *et al.*, 2014). Les métabolites classiquement retrouvés sont le MNBA et l'AMBA (Alferness and Wiebe, 2002). Bien que ces études aient permis d'apporter des informations sur le devenir de la mésotrione dans l'environnement, la compréhension détaillée des processus de biotransformation de cette molécule passe nécessairement par des travaux sur des souches dégradantes isolées.

### 1.5.3.2. Etudes *in vitro*

#### 1.5.3.2.1. Diversité des souches dégradantes

Plusieurs souches bactériennes de laboratoire ou isolées à partir de différents environnements ont montré une capacité de transformation de la mésotriane (Tableau 2). Elles appartiennent à plusieurs phyla parmi les bactéries à Gram positif (ex. le genre *Bacillus*) et à Gram négatif (ex. le genre *Escherichia*). La diversité des environnements à partir desquels les souches capables de transformer la mésotriane ont été isolées met en exergue un phénomène de redondance fonctionnelle à l'échelle de la biosphère, phénomène rendu possible par la grande diversité des capacités métaboliques des microorganismes. Ces souches ne sont cependant pas capables de minéraliser la mésotriane et de croître dans un milieu minimum avec cette molécule comme source de carbone. Elles ne font que la transformer partiellement en produisant plusieurs métabolites.

**Tableau 2.** Souches pures de microorganismes capables de transformer la mésotriane.

Phylum/Division	Genre/Espèce/Souche	Origine	Référence
Firmicutes	<i>Bacillus pumilus</i> HZ-2	Boues activées	(Liu <i>et al.</i> , 2015)
Firmicutes	<i>Bacillus megaterium</i> Mes11	Sol agricole	(Batisson <i>et al.</i> , 2009)
Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp. 3B6	Eau de nuage	(Durand <i>et al.</i> , 2006)
$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SR1	Sol agricole	(Romdhane <i>et al.</i> , 2015)
$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	Laboratoire	(Youness, 2013)
$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Escherichia coli</i> TOP10	Laboratoire	(Pileggi <i>et al.</i> , 2012)
$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Escherichia coli</i> DH5- $\alpha$	Laboratoire	(Pileggi <i>et al.</i> , 2012)
$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Escherichia coli</i> CGSC 5713	Laboratoire	(Pileggi <i>et al.</i> , 2012)
$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Escherichia coli</i> CGSC 5365	Laboratoire	(Pileggi <i>et al.</i> , 2012)
$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pantoea ananatis</i>	Lac	(Pileggi <i>et al.</i> , 2012)
$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pantoea</i> sp. 5B12	Eau de nuage	(Youness, 2013)

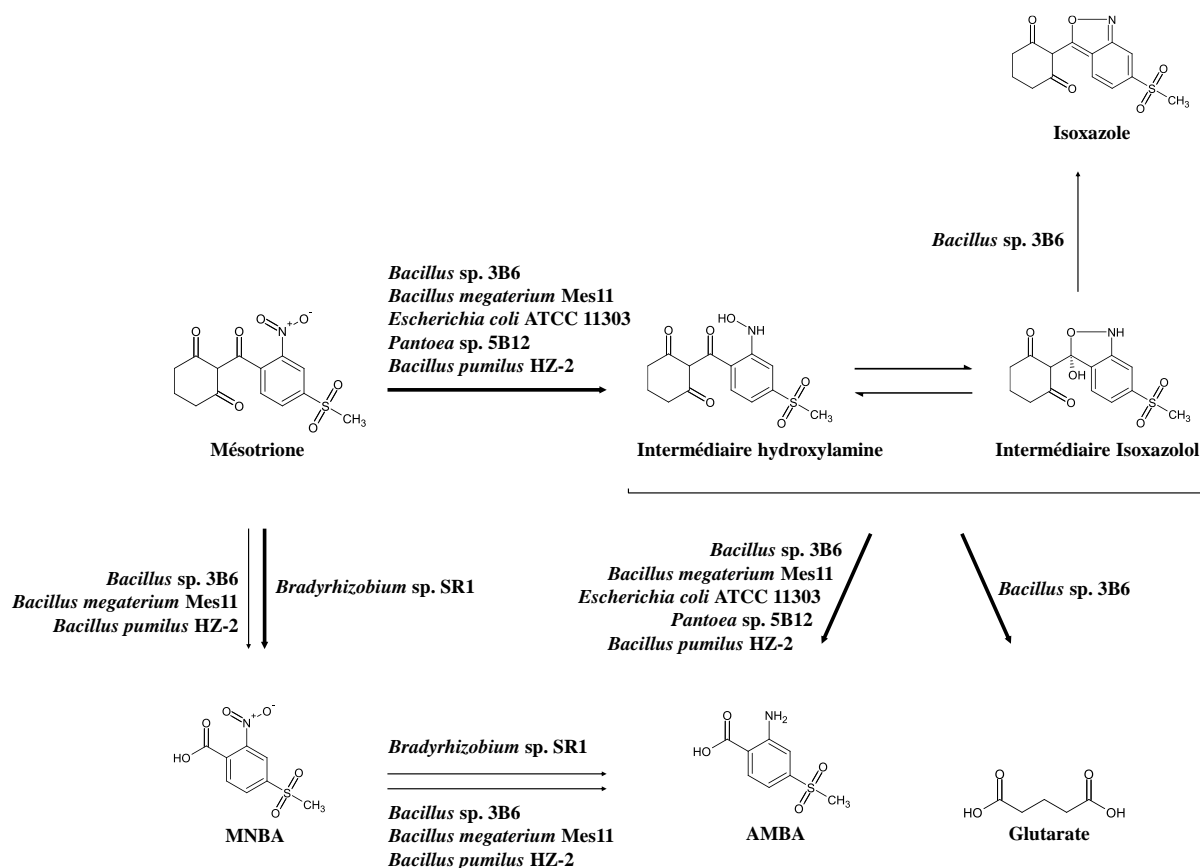
#### 1.5.3.2.2. Description des voies de biotransformation

Deux voies principales de biotransformation de la mésotriane ont été décrites en fonction des souches étudiées : (i) la voie dont la première étape correspond à la réduction du

groupement nitro (-NO<sub>2</sub>) de la mésotriane, et (ii) la voie commençant par un clivage oxydatif ou une hydrolyse de la molécule (Figure 11).

(i) La réduction du groupement -NO<sub>2</sub> produit, dans un premier temps, un intermédiaire hydroxylamine (-NHOH). Une cyclisation intramoléculaire du groupement hydroxyle (-OH) de l'hydroxylamine sur le groupement carbonyle le plus proche (-C=O) conduit à l'intermédiaire isoxazolol. Ces deux formes en équilibre sont ensuite majoritairement transformées en AMBA. La souche *Bacillus* sp. 3B6 produit également le métabolite isoxazole, en très faible quantité (Durand *et al.*, 2010). Cette souche produit également, *via* un clivage oxydatif de la partie cyclohexanedione de la molécule, du glutarate qui entre dans le métabolisme central de la bactérie.

(ii) Le clivage oxydatif ou l'hydrolyse de la mésotriane conduit à la formation de MNBA, ce dernier pouvant par la suite être transformé en AMBA par réduction du groupement -NO<sub>2</sub>. Cette voie est minoritaire chez beaucoup de souches transformant la mésotriane, à l'exception de la souche *Bradyrhizobium* sp. SR1, pour laquelle le métabolite majoritairement retrouvé est le MNBA (Romdhane *et al.*, 2015).



**Figure 11.** Voies de biodégradation de la mésotriane proposées chez différentes souches bactériennes pures. Les flèches épaisses et fines indiquent respectivement les voies majoritaires et minoritaires utilisées par les bactéries.

## 1.6. Impact environnemental et toxicité

### 1.6.1. Impact sur les microorganismes

#### 1.6.1.1. Milieu aquatique

Les milieux aquatiques de surface sont particulièrement concernés par d'éventuelles contaminations par les pesticides, qui peuvent être directement drainés depuis les surfaces cultivées aux alentours du point d'eau ou migrer jusqu'aux eaux souterraines. C'est le cas de la mésotrione qui, de par sa forte solubilité et sa faible adsorption aux particules de sol, peut migrer vers les eaux de surface et les eaux souterraines. Elle a cependant un temps de demi-vie relativement court car elle est facilement biodégradable. La question de son impact sur l'environnement ne se pose donc pas seulement en tant que molécule mère, mais aussi pour l'ensemble de ses produits de transformation.

La fiche de sécurité de la mésotrione indique que cette molécule est très toxique pour les organismes aquatiques, et entraîne des effets néfastes à long terme (phrases de risque H400 et H410). Cependant, peu d'études publiées se sont intéressées à l'impact de la mésotrione sur les microorganismes aquatiques. Elles concernent les valeurs de CE<sub>50</sub> (Concentration Efficace 50%) de la mésotrione pour les microalgues d'eau douce *Amphora coffeaformis* et *Ankistrodesmus fusiformis*, qui ont été déterminées à 13,1 et 56,1 mg L<sup>-1</sup>, respectivement, indiquant une toxicité relativement faible de la molécule (Valiente Moro *et al.*, 2012). Il a également été montré que la mésotrione affectait l'activité de photosynthèse de *Microcystis* sp. et *Scenedesmus quadricauda*, avec des valeurs de CE<sub>50</sub> de 6,19 et 4,41 mg.L<sup>-1</sup>, respectivement, indiquant là aussi une toxicité relativement faible de la molécule (Ni *et al.*, 2014).

#### 1.6.1.2. Milieu terrestre

##### 1.6.1.2.1. Impact sur l'abondance des microorganismes

Des études réalisées à l'aide de microcosmes de sol ont mis en évidence une faible sensibilité des communautés microbiennes vis-à-vis de la mésotrione à la dose agronomique recommandée (0.45 mg kg<sup>-1</sup> sol) (Crouzet *et al.*, 2010, 2013, 2015) mais un effet non

négligeable sur l'abondance de ces communautés exposées à une forte concentration de mésotrione (50 mg kg<sup>-1</sup> sol) (Pose-Juan *et al.*, 2015). A 10 fois la dose agronomique recommandée, un impact négatif de la mésotrione formulée (Callisto<sup>®</sup>) a été observé sur la biomasse des communautés phototrophes (Crouzet *et al.*, 2013), et des bactéries et archées oxydant l'ammonium (AOB et AOA, *Ammonia-Oxidizing Bacteria* et *Archaea*) impliquées dans le cycle de l'azote (Crouzet *et al.*, 2015).

#### 1.6.1.2.2. *Impact sur l'activité des microorganismes*

L'impact de la mésotrione sur l'activité des communautés microbiennes des sols n'a été observé qu'à des doses élevées correspondant à 10 ou 100 fois la dose agronomique et correspondait, d'une part, à la stimulation des activités déshydrogénase et de respiration (SIR, *Substrate-Induced Respiration*) (Crouzet *et al.*, 2010), et, d'autre part, à l'inhibition de la nitrification, puis la stimulation de la dénitrification, induisant une augmentation de la teneur en ammonium et une baisse de la teneur en nitrates dans les sols traités (Crouzet *et al.*, 2015). Un effet transitoire, caractérisé par une stimulation de l'ammonification et une inhibition de la nitrification, a également été observé à la dose agronomique quand la mésotrione est associée au nicosulfuron et au S-métolachlore (Joly *et al.*, 2015).

#### 1.6.1.2.3. *Impact sur la structure des communautés microbiennes*

La structure des communautés microbiennes a faiblement été impactée par la mésotrione utilisée à la dose agronomique (Crouzet *et al.*, 2010, 2013, 2015). Une légère baisse de la diversité bactérienne (indice de Shannon-Weaver) a été mise en évidence uniquement dans des microcosmes traités avec la formulation commerciale de la mésotrione (Callisto<sup>®</sup>) à la dose agronomique recommandée (Joly *et al.*, 2012). Une autre étude n'a montré aucun effet significatif du double traitement composé de mésotrione et de S-métolachlore sur la structure des communautés microbiennes associées à la rhizosphère de maïs (Valverde *et al.*, 2014).

D'une manière générale, la mésotrione ne semble pas affecter significativement les communautés microbiennes des sols quand elle est appliquée à la dose agronomique bien que son enzyme cible (HPPD) soit également présente chez certaines bactéries et microalgues (Lee *et al.*, 2008; Gálvez-Valdivieso *et al.*, 2010). Ceci peut s'expliquer par des différences de

perméabilité membranaire (Heipieper *et al.*, 1994) ou des différences structurales des enzymes microbiennes, qui seraient alors moins inhibées que celles des plantes.

Cependant, les effets de la mésotrione sur les communautés microbiennes des sols semblent être potentialisés lorsqu'elle est formulée.

#### 1.6.1.3. Impact sur souches isolées - Bio-essais

L'impact des adjuvants sur la cinétique de transformation de la mésotrione est variable suivant les souches bactériennes dégradantes testées, allant d'une inhibition de la croissance et de la biotransformation pour des souches à Gram positif à une stimulation de la biotransformation pour la souche *Escherichia coli* ATCC 11303 (Youness, 2013). D'autres études ont mis en évidence des mécanismes de tolérance mis en jeu par les souches *E. coli* DH5- $\alpha$  et *Pantoea ananatis* CCT 7673, caractérisés par des changements dans la composition des phospholipides membranaires en réponse aux espèces réactives de l'oxygène produites par ces souches en présence de mésotrione (Olchanheski *et al.*, 2014; Prione *et al.*, 2016). La toxicité aiguë de la mésotrione a également été évaluée à l'aide de microorganismes modèles procaryote (test standardisé Microtox<sup>®</sup>, *A. fischeri*) et eucaryote (*Tetrahymena pyriformis*). Les résultats ont montré une toxicité modérée, voire une absence de toxicité de la mésotrione pure ( $CE_{50} = 43,6 \text{ mg L}^{-1}$  et  $7728,4 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivement) par rapport à la toxicité de la formulation commerciale (Callisto<sup>®</sup>) de la mésotrione ( $CE_{50} = 1,1 \text{ mg L}^{-1}$  et  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), respectivement pour *A. fischeri* et *T. pyriformis* (Bonnet *et al.*, 2008). Cette étude a aussi mis en évidence une plus forte toxicité de l'AMBA et une plus faible toxicité du MNBA vis-à-vis d'*A. fischeri* par rapport à la molécule mère.

#### 1.6.2. Impact sur des organismes supérieurs

La  $CL_{50}$  (Concentration Létale 50%) de la mésotrione dans l'eau a été déterminée pour le poisson-chat d'Amérique du Sud *Rhamdia quelen* à  $532 \text{ mg L}^{-1}$ , et est donc considérée comme peu toxique (Kreutz *et al.*, 2008). Une autre étude, plus récente, a mis en évidence la toxicité aiguë de la mésotrione chez les poissons *Oreochromis niloticus* et *Geophagus brasiliensis* à l'aide de biomarqueurs. Les résultats ont montré que l'exposition de chacune des deux espèces à la mésotrione cause un stress oxydant (augmentation significative des

niveaux de glutathion réduit et de l'activité glutathion peroxydase) et des dommages à l'ADN, et ce, à de faibles concentrations de mésotrione (1,8 à 460  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Piancini *et al.*, 2015).

La  $DL_{50}$  (Dose Létale 50%) de la mésotrione chez le rat (voie orale) a été déterminée à 5  $\text{g kg}^{-1}$  (Beraud *et al.*, 2001). Chez le rat et la souris, une partie de la dose de mésotrione administrée par voie orale est absorbée et rapidement excrétée par les urines, et l'autre partie est biotransformée par la microflore du système digestif. Plusieurs voies de biotransformation ont été identifiées (Figure 12). Une voie principale correspond à l'hydroxylation du cycle aromatique, et une autre voie est caractérisée par un clivage de la molécule et la réduction du groupement  $-\text{NO}_2$ , menant à la production de MNBA, puis d'AMBA (Gledhill *et al.*, 2001).

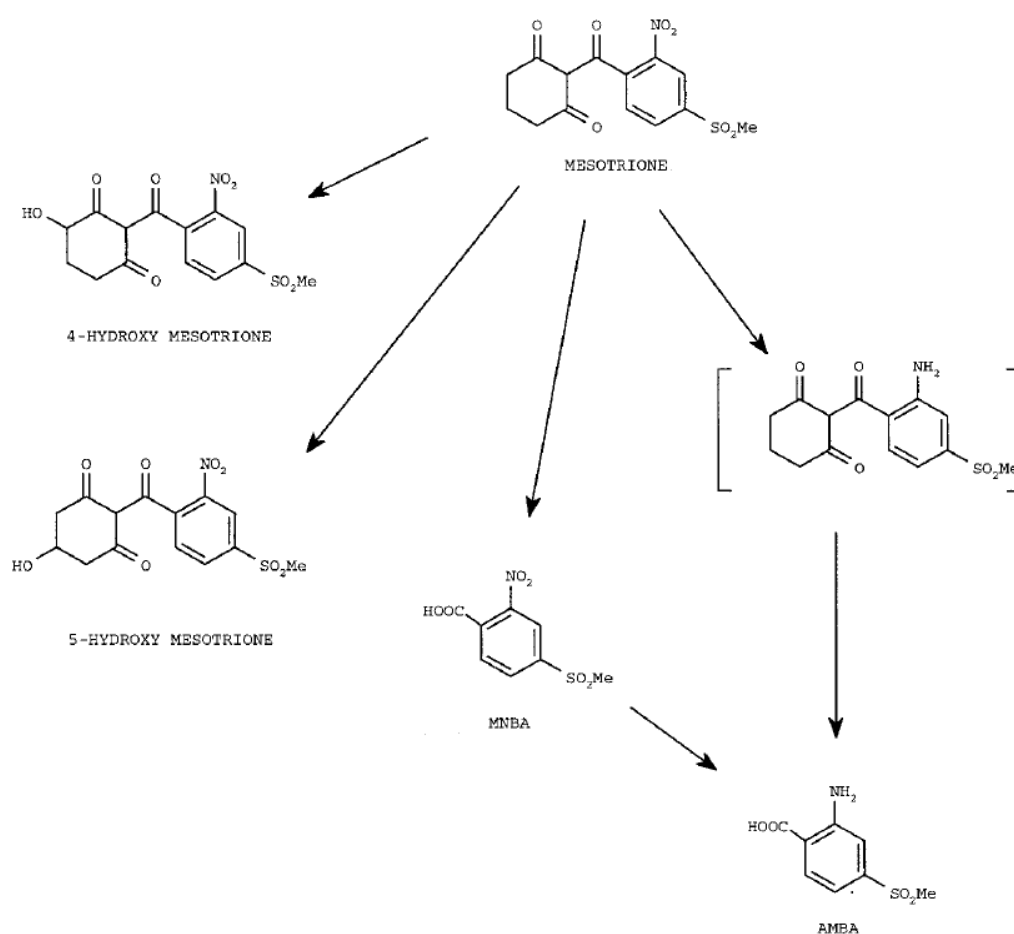


Figure 12. Voies de biotransformation de la mésotrione chez le rat et la souris (Gledhill *et al.*, 2001).

L'exposition de la petite lentille d'eau *Lemna minor* à la mésotrione a mis en évidence des différences dans la formation de métabolites endogènes possédant des groupements méthyle, méthylène, hydroxyle, amine et thiol, et donc un véritable impact sur le métabolome de cette plante, mais qui ne semble pas altérer sa physiologie (Aliferis *et al.*, 2009).

### Conclusions :

La mésotrione, utilisée à la dose agronomique, peut donc être considérée comme un composé ayant un impact relativement faible sur les différents organismes vivants car elle est faiblement persistante dans l'environnement. Les effets toxiques de la mésotrione sont la plupart du temps observés à des doses supérieures aux concentrations retrouvées dans l'environnement. Cependant, deux éléments importants de discussion sont à relever : (i) la plus forte toxicité de la mésotrione quand elle est associée à des adjuvants, et (ii) la faible persistance de la mésotrione dans l'environnement n'est pas forcément synonyme de minéralisation de la molécule et d'élimination du risque environnemental, puisque deux métabolites principaux (l'AMBA et le MNBA) sont très souvent produits et qu'ils peuvent présenter des toxicités supérieures à celle de la molécule mère.

## **2. Le nicosulfuron**

### **2.1. Historique**

Le nicosulfuron appartient à la famille chimique des sulfonyles. L'activité herbicide de ces composés a été rapportée pour la première fois en 1966 (Koog, 1966). Les premières molécules sulfonyles étaient initialement dérivées d'herbicides triazines et présentaient des efficacités herbicides similaires à l'atrazine. Ce n'est que dans les années 1970 que les chercheurs de la société E.I. du Pont de Nemours & Co., Inc. ont synthétisé une nouvelle classe de sulfonyles contenant un cycle aminopyrimidine à la place de l'aniline présent dans les premières molécules, et présentant, de ce fait, des activités herbicides supérieures (Kearney and Kaufman, 1975). De nombreux autres composés de cette famille ont été brevetés par la suite (Tableau 3). Le nicosulfuron, un des herbicides le plus vendu de cette famille (AGRESTE, 2016), a, quant à lui, été commercialisé pour la première fois aux Etats-Unis en 1990 par la société E.I. du Pont de Nemours & Co., Inc. sous le nom DPX-V9360 (Nalewaja *et al.*, 1991).



**Tableau 3.** Structure générale de la famille des herbicides sulfonylurées (Berger and Wolfe, 1996). <sup>a</sup> benzyle à la place du cycle phényle ; <sup>b</sup> thiophène à la place du cycle phényle ; <sup>c</sup> N(CH<sub>3</sub>)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> à la place du cycle phényle ; <sup>d</sup> pyridine à la place du cycle phényle. Trois sous-classes de sulfonylurées sont ainsi décrites, suivant la nature des cycles : (I) absence des cycles pyridine et triazine ; (II) présence du cycle triazine ; (III) présence des cycles pyridine et pyrimidine (Sarmah and Sabadie, 2002).

	CAS-RM	X	Y	Z	A	B
Bensulfuron-methyl	83055-99-6	C	H	COOCH <sub>3</sub> <sup>a</sup>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Sulfometuron-methyl	74222-97-2	C	H	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Ethametsulfuron-methyl	97780-06-8	N	H	COOCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NHCH <sub>3</sub>
Triasulfuron	82097-50-5	N	H	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Cl	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Tribenuron-methyl	101200-48-0	N	CH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Nicosulfuron	111991-09-4	C	H	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>d</sup>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Chlorimuron-ethyl	90982-32-4	C	H	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl
Thifensulfuron-methyl	79277-27-3	N	H	COOCH <sub>3</sub> <sup>b</sup>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Primisulfuron-methyl	86209-51-0	C	H	COOCH <sub>3</sub>	OCF <sub>2</sub> H	OCF <sub>2</sub> H
Metsulfuron-methyl	74223-64-6	N	H	COOCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Chlorsulfuron	64902-72-3	N	H	Cl	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Amidosulfuron	120923-37-7	C	H	<sup>c</sup>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

## 2.2. Propriétés physico-chimiques

Les principales propriétés physico-chimiques du nicosulfuron sont décrites dans le Tableau 4. Le nicosulfuron (2-[(4,6-diméthoxypyrimidin-2-ylcarbamoyle)sulfamoyl]-N,N-diméthylnicotinamide) est un acide faible qui possède une solubilité dans l'eau supérieure à pH basique. Cette molécule est relativement stable en milieu basique tandis qu'en milieu acide, le nicosulfuron subit une hydrolyse acide (EFSA, 2007).

**Tableau 4.** Identité et propriétés physico-chimiques du nicosulfuron (EFSA, 2007).

Substance active (s.a.)	Nicosulfuron
Activité	Herbicide
Nom complet	2-[(4,6-diméthoxypyrimidin-2-ylcarbamoyle)sulfamoyl]-N,N-diméthylnicotinamide
Formule brute	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S
Masse molaire	410,4 g mol <sup>-1</sup>
Structure chimique	
Constante de Henry, K <sub>H</sub>	1,48 10 <sup>-11</sup> Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> à 20 °C
Solubilité dans l'eau	0,25 g L <sup>-1</sup> à 20 °C (pH 5) 7,5 g L <sup>-1</sup> à 20 °C (pH 6,5) 76,4 g L <sup>-1</sup> à 20 °C (pH 9)
-log <sub>10</sub> (constante de dissociation), pKa	pKa <sub>1</sub> = 4,78 pKa <sub>2</sub> = 7,58

### 2.3. Mode d'action

Le nicosulfuron est un herbicide systémique à action foliaire, actif sur les dicotylédones, les graminées et les vivaces. Comme les autres sulfonyleurées, il agit en inhibant l'acétolactate synthase (ALS, aussi appelée acétohydroxyacide synthase) des plantes, ce qui bloque la première étape de la biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (Schloss, 1990) et entraîne un arrêt de la division cellulaire et de la croissance de la plante (Figure 13).

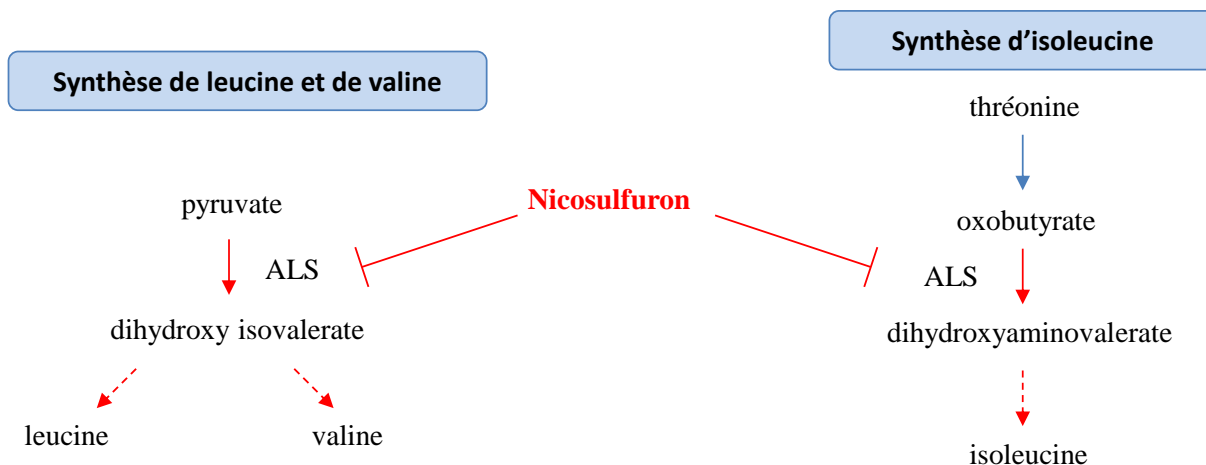


Figure 13. Mode d'action du nicosulfuron chez les plantes. ALS : acétolactate synthase.

## 2.4. Réglementation – utilisations agronomiques

Le nicosulfuron étant inscrit à l'Annexe I du règlement (CE) n° 1107/2009, son utilisation est autorisée dans l'Union Européenne. Le traitement des cultures de maïs par le nicosulfuron se fait en post-levée, à une dose d'application de 60 g s.a. ha<sup>-1</sup>. Il existe différentes formulations commerciales contenant du nicosulfuron comme seule substance active (ex. Milagro<sup>®</sup>, 40 g L<sup>-1</sup> de nicosulfuron) ou associé à d'autres substances herbicides telles que la mésotrione (ex. Choriste<sup>®</sup> 30 g L<sup>-1</sup> de nicosulfuron, 75 g L<sup>-1</sup> de mésotrione) ou le rimsulfuron (ex. Cursus Duo<sup>®</sup> 300 g kg<sup>-1</sup> de nicosulfuron, 150 g kg<sup>-1</sup> de rimsulfuron).

Le nicosulfuron fait partie des molécules les plus utilisées sur les cultures de maïs en région Aquitaine (Figure 8). A titre indicatif, en 2011, 15% des surfaces traitées par un herbicide ont reçu au moins une fois la substance nicosulfuron (AGRESTE, 2013). Au niveau national, les ventes de cette substance ont augmenté progressivement durant la période 2011-2014 (de 47 000 à 53 000 kg) (AGRESTE, 2016).

## 2.5. Devenir dans l'environnement

### 2.5.1. Rétention dans les sols

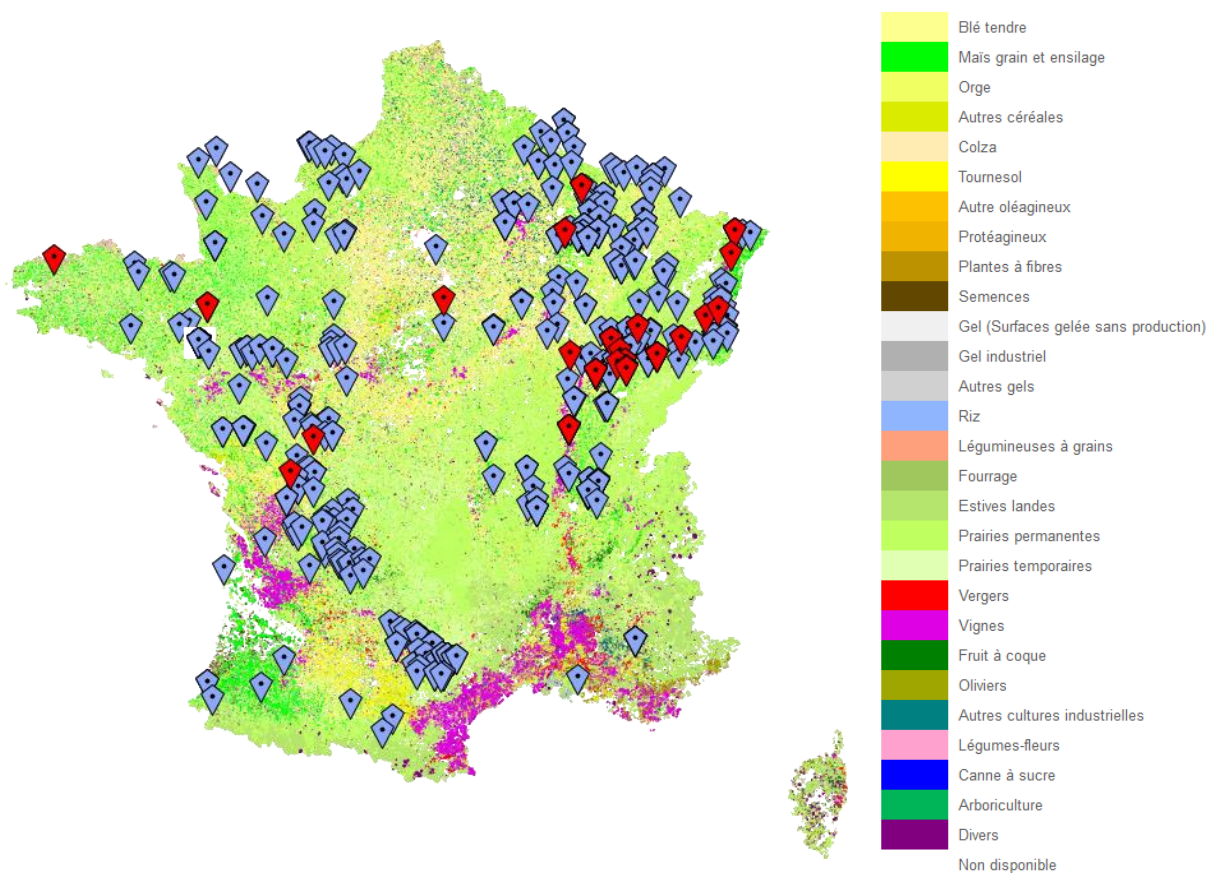
Différentes études se sont intéressées à la mobilité et à la persistance du nicosulfuron dans le sol. Sa mobilité est supérieure dans les sols à pH basique, et des temps de demi-vie allant de 6 à 70 jours ont été reportés dans la littérature (Augustijn-Beckers *et al.*, 1994; Ashburn

Poppell *et al.*, 2002; Russell *et al.*, 2002; Steinheimer and Scoggin, 2003; de Lafontaine *et al.*, 2014; Azcarate *et al.*, 2015). Ce temps de demi-vie a même été raccourci à moins de 6 jours dans un sol limoneux, l'humidité et le pH légèrement acide du sol influençant positivement la dissipation de ce composé (Ashburn Poppell *et al.*, 2002).

De plus, il a été montré que le travail agricole des sols (labour) pouvait favoriser la migration du nicosulfuron vers les eaux souterraines, indiquant une faible tendance du nicosulfuron à s'adsorber sur le sol (Steinheimer and Scoggin, 2003). Ceci est confirmé par les faibles valeurs de  $K_d$  du nicosulfuron qui varient de 0,14 à 2,15 L kg<sup>-1</sup> en fonction du sol étudié (Gonzalez and Ukrainczyk, 1996, 1999; Oliveira *et al.*, 2001; Regitano and Koskinen, 2008; Trigo *et al.*, 2014; Azcarate *et al.*, 2015). Cependant, la mobilité du nicosulfuron peut être réduite quand les teneurs en argiles et en matière organique du sol augmentent (Gonzalez and Ukrainczyk, 1999). L'étude de l'adsorption du nicosulfuron sur trois argiles différentes (smectites d'Arizona et du Wyoming, et hectorite) a en effet révélé un  $K_d$  de 147 L kg<sup>-1</sup> pour l'argile la plus apte à fixer cette molécule (smectite d'Arizona), avec néanmoins une absence d'effet de la teneur en carbone organique sur l'adsorption du nicosulfuron (Carrizosa *et al.*, 2004). Au contraire, l'étude de l'adsorption du nicosulfuron dans différents sols d'Argentine a montré une corrélation positive avec le contenu en carbone organique, une corrélation négative avec le pH, et l'absence d'effet de la teneur en argiles (Azcarate *et al.*, 2015).

Les faibles valeurs de  $K_d$  montrent que le nicosulfuron est susceptible de migrer vers les eaux de surface et souterraines. Cette molécule possède en effet un fort potentiel de lixiviation vers les eaux souterraines au regard de sa valeur de GUS, qui est de 3,34 (Pfeiffer, 2010). Plusieurs études se sont intéressées au suivi de la concentration en nicosulfuron dans différents environnements aquatiques à travers le monde. La persistance du nicosulfuron a pu être observée dans des réservoirs d'eau au Canada (temps de demi-vie de 70 jours), indiquant sa faible photolyse, sa faible biodégradation et sa faible hydrolyse dans ces réservoirs dont le pH est légèrement basique (Cessna *et al.*, 2015). La présence de nicosulfuron a également été révélée deux années consécutives dans 8,6 % des échantillons de trois rivières du Canada, avec une concentration maximale de 0,5 µg L<sup>-1</sup> (de Lafontaine *et al.*, 2014) et dans 52 % des échantillons d'eau de surface et souterraine (n = 212) aux Etats-Unis en 1998, avec une concentration maximale de 0,012 µg L<sup>-1</sup> dans les eaux souterraines et de 0,266 µg L<sup>-1</sup> dans les eaux de surface (Battaglin *et al.*, 2000). Ces concentrations ont atteint des valeurs de 3,29 µg L<sup>-1</sup> dans des mares printanières et rivières des Etats-Unis entre 2005 et 2006, classant le nicosulfuron en 7<sup>ème</sup> position des molécules les plus retrouvées en termes de concentration (Battaglin *et al.*, 2009).

Le nicosulfuron fait également partie des substances analysées dans les eaux de surface de France métropolitaine (Agence de l'eau, SANDRE). Sa fréquence de détection était de 26,9 % en 2013 (SOeS, 2015b). Les résultats de l'analyse des eaux souterraines au niveau des zones de captage d'eau potable pour la période 2003-2015 indiquent une fréquence de détection du nicosulfuron de 0,6 % (ADES, 2016) (Figure 14). Malgré la faible dose agronomique recommandée pour le nicosulfuron (60 g s.a. ha<sup>-1</sup>), cette molécule est retrouvée de façon notable dans les eaux de surface et les eaux souterraines, mettant en évidence sa forte mobilité dans l'environnement.



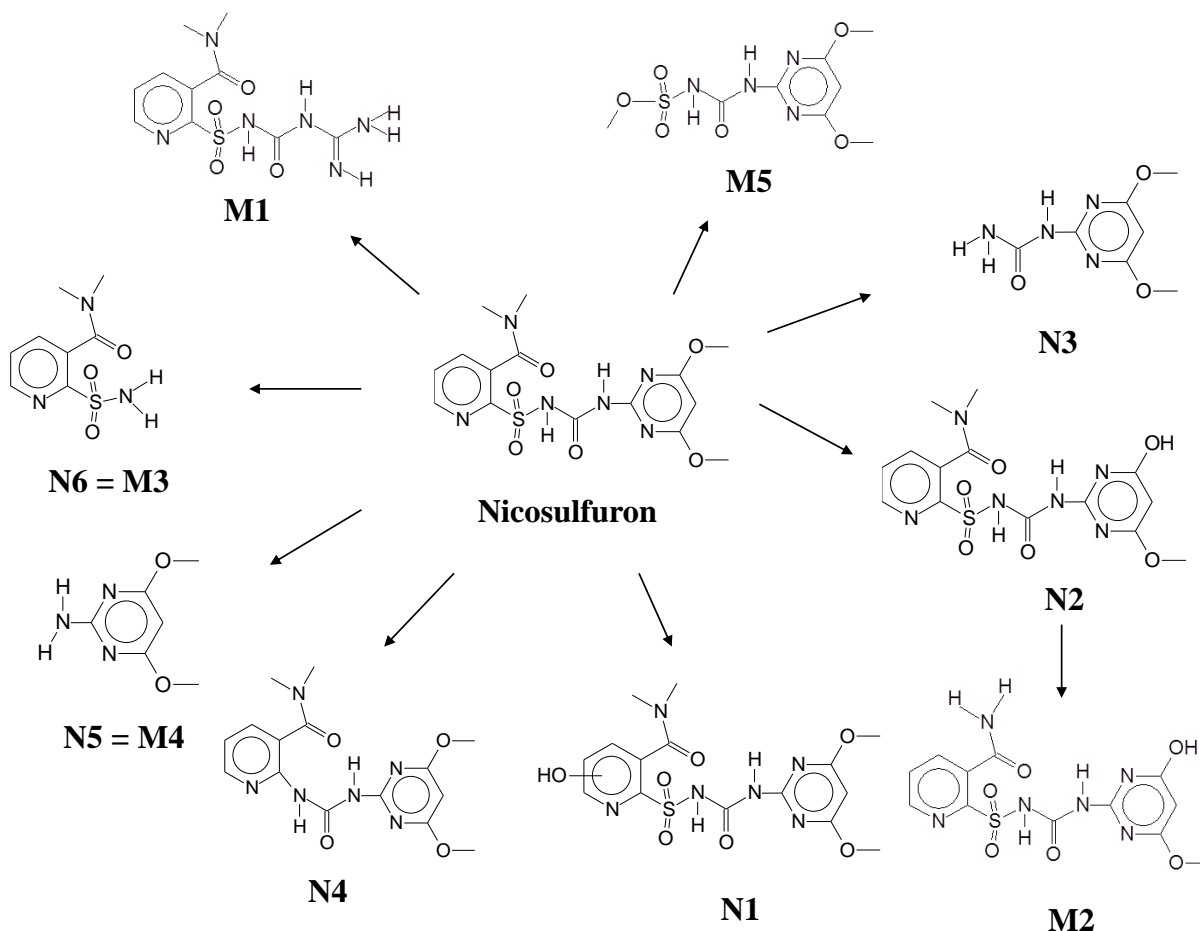
**Figure 14.** Quantification du nicosulfuron dans les eaux souterraines au niveau des sites de prélèvements d'eau potable en France métropolitaine pour la période 2003-2015 (ADES, 2016). Localisation des sites de prélèvement pour lesquels le nicosulfuron a été quantifié (◇), et où la concentration était supérieure à 0,1 µg L<sup>-1</sup> (◆). La carte indique également les zones de cultures déclarées par les exploitants en 2012 (registre parcellaire graphique (RPG) 2012, Agence de services et de paiement (ASP), Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt).

## 2.5.2. Transformation abiotique

### 2.5.2.1. Photo-transformation

Cinq photo-produits du nicosulfuron ont été identifiés au cours de la photolyse du nicosulfuron en milieu aqueux (M1 à M5), résultant de l'ouverture du cycle pyrimidine (M1), de *N*- et *O*-déméthylations (M2), du clivage de la liaison sulfonylurée (M3 et M4) et de la perte du cycle pyridine suivie d'une réaction de méthylation sur le soufre -OCH<sub>3</sub> (M5) (Benzi *et al.*, 2011) (Figure 15). La photo-dégradation du nicosulfuron à la surface de feuilles de plantes (films de cire cuticulaire reconstituée) est, quant à elle, caractérisée par la production de 6 photo-produits (N1 à N6) issus d'hydroxylation (N1), de *O*-désalkylation (N2), du clivage de la liaison N-S (N3), de photo-extrusion du groupement SO<sub>2</sub> (N4) et du clivage de la liaison sulfonylurée par photo-hydrolyse (N5 = M4 et N6 = M3) (Ter Halle *et al.*, 2010) (Figure 15).

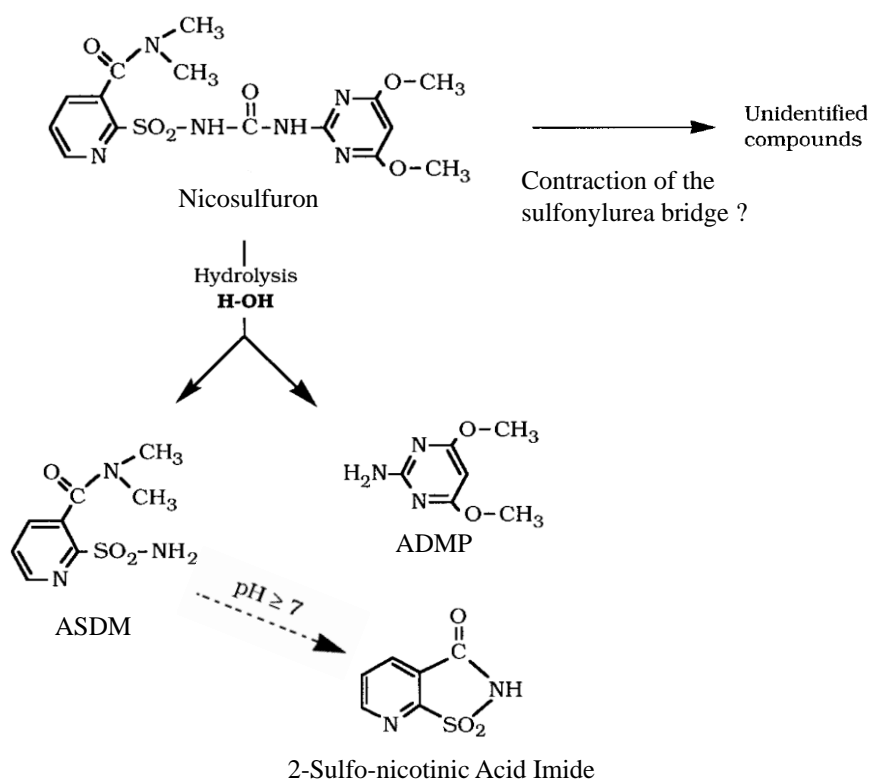
Le temps de demi-vie du nicosulfuron à la surface des feuilles, de 51 h pour la molécule pure, s'est avéré réduit en présence d'adjuvants (32 h) et en présence de mésotrione (20 h). Les temps de demi-vie correspondant à la photolyse du nicosulfuron ont été estimés en laboratoire à 12-46 jours sur le sol et 36 jours dans l'eau (Ter Halle *et al.*, 2010). Bien que non négligeable, la photo-dégradation du nicosulfuron n'est cependant pas considérée par l'autorité européenne de sécurité des aliments comme une voie importante de dégradation du nicosulfuron dans les sols (EFSA, 2007).



**Figure 15.** Photo-produits du nicosulfuron obtenus par photolyse directe (Benzi *et al.*, 2011) et après irradiation sur de la cire cuticulaire reconstituée (Ter Halle *et al.*, 2010).

### 2.5.2.2. Hydrolyse

L'hydrolyse de la liaison sulfonylurée est la principale voie de transformation abiotique du nicosulfuron (Sarmah and Sabadie, 2002), la vitesse d'hydrolyse étant d'autant plus grande que le pH diminue (Berger and Wolfe, 1996). L'hydrolyse chimique du nicosulfuron décrite dans la Figure 16 est caractérisée par deux voies : (i) une voie majoritaire, correspondant à l'hydrolyse de la liaison sulfonylurée, produisant l'ADMP (4,6-diméthoxypyrimidin-2-amine) et l'ASDM (N,N-diméthyl-2-sulfamoylpyridine-3-carboxamide), ce dernier pouvant se cycliser à pH basique ; (ii) une voie minoritaire, menant à des composés dont la structure n'a pas été déterminée, mais qui pourraient résulter de la contraction de la liaison sulfonylurée, comme cela a déjà été décrit pour le rimsulfuron (Scrano *et al.*, 1999) et le flupyrsulfuron-méthyle (Rouchaud *et al.*, 1999).



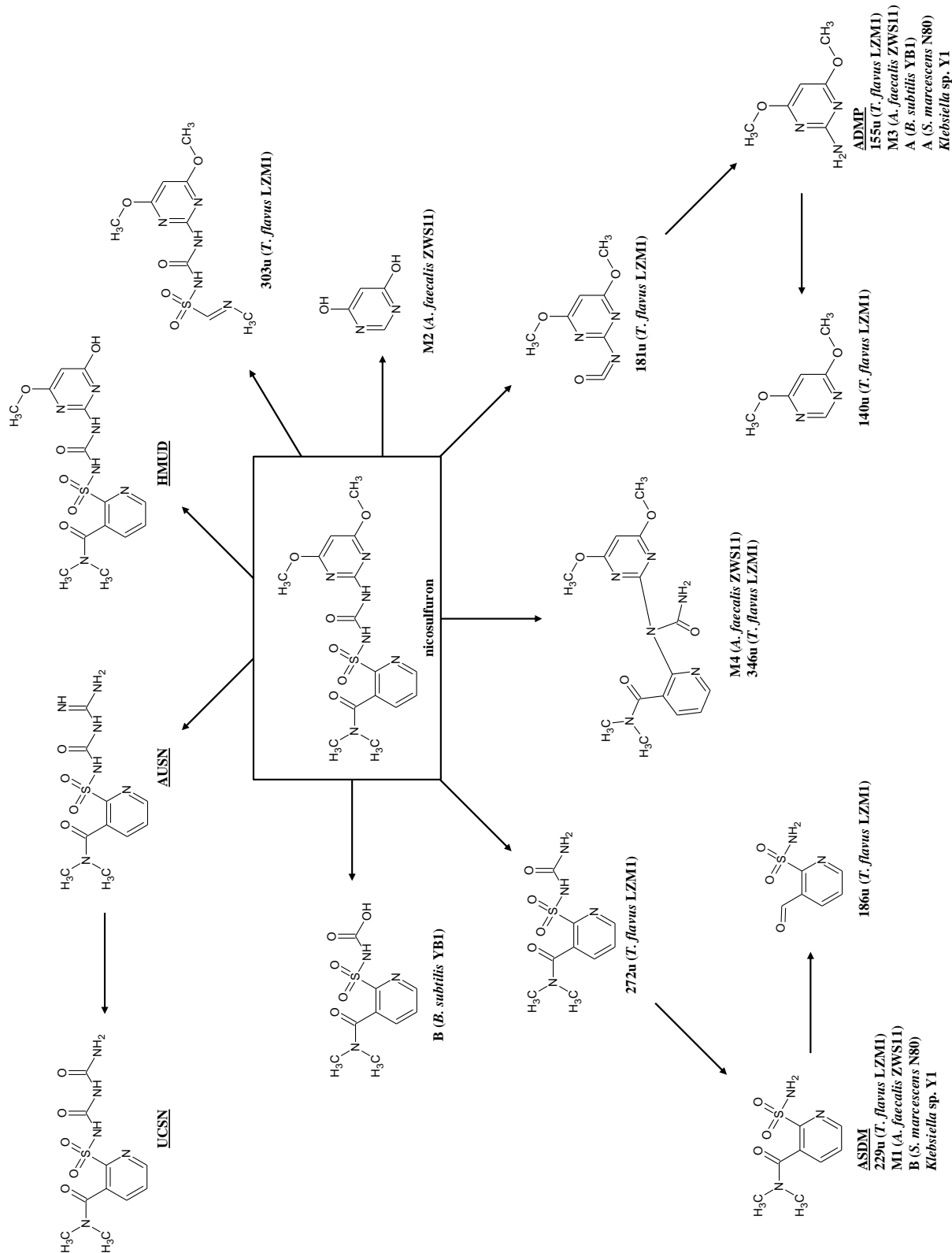
**Figure 16.** Hydrolyse du nicosulfuron (Sabadie, 2002). ADMP, 4,6-diméthoxyypyrimidin-2-amine ; ASDM, N,N-diméthyl-2-sulfamoylpyridine-3-carboxamide.

### 2.5.3. Transformation biotique

#### 2.5.3.1. Etudes *in situ*

Peu d'informations sont disponibles quant au devenir du nicosulfuron dans l'environnement. En effet, une seule étude, réalisée en microcosmes de sol, s'est intéressée au devenir et à l'impact du nicosulfuron (formulation commerciale Milagro<sup>®</sup>) appliqué à la dose agronomique sur les communautés microbiennes du sol (Joly *et al.*, 2015). Les résultats ont montré une dissipation progressive du nicosulfuron atteignant environ 60 % à la fin de l'expérience (120 jours), sans pour autant que la part due à la biotransformation n'ait pu être déterminée. Durant les 22 premiers jours d'incubation, la dissipation du nicosulfuron a été environ 4 fois supérieure en présence de l'un ou des deux autres pesticides étudiés (formulations commerciales de mésotrione (Callisto<sup>®</sup>) et de S-métolachlore (Dual Gold Safeneur<sup>®</sup>, 960 g L<sup>-1</sup> de S-métolachlore)) comparée au traitement avec le nicosulfuron seul.





**Figure 17.** Voies de biodégradation du nicosulfuron chez différentes souches bactériennes et fongiques pures. Les métabolites du nicosulfuron retrouvés dans l'environnement sont également indiqués sur la figure (noms soulignés) : HMUD (2-[[[4-hydroxy-6-méthoxy-2-pyrimidin-2-yl]carbamoyl]sulfamoyl]-N,N-diméthylpyridine-3-carboxamide), AUSN (2-[[[carbamimidyl]carbamoyl]sulfamoyl]-N,N-diméthylpyridine-3-carboxamide), ASDM (N,N-diméthyl-2-sulfamoylpyridine-3-carboxamide), UCSN (2-[[[carbamoyl]carbamoyl]sulfamoyl]-N,N-diméthylpyridine-3-carboxamide) et ADMP (4,6-diméthoxy-2-aminopyrimidine). *Bacillus subtilis* YB1 (Lu *et al.*, 2012), *Serratia marcescens* N80 (Zhang *et al.*, 2012), *Talaromyces flavus* LZM1 (Song *et al.*, 2013), *Alcaligenes faecalis* ZWS11 (Zhao *et al.*, 2015a) et *Klebsiella* sp. Y1 (Wang *et al.*, 2016b).

Les voies de biotransformation du nicosulfuron dans les plantes, le sol et les eaux sont similaires (Hutson, 1998). Les produits de transformation du nicosulfuron identifiés sont le HMUD (2-[[4-hydroxy-6-méthoxypyrimidin-2-yl]carbamoyle]sulfamoyle]-N,N-diméthylpyridine-3-carboxamide), l'AUSN (2-[(carbamiidoyle]carbamoyle]sulfamoyle]-N,N-diméthylpyridine-3-carboxamide), l'ASDM (N,N-diméthyl-2-sulfamoyle]pyridine-3-carboxamide), l'ADMP (4,6-diméthoxypyrimidin-2-amine) et le DUDN (2-[[4,6-diméthoxypyrimidin-2-yl]carbamoyle]amino]-N,N-diméthylpyridine-3-carboxamide), l'UCSN (2-[(carbamoyle]carbamoyle]sulfamoyle]-N,N-diméthylpyridine-3-carboxamide), l'ASDM et l'ADMP étant les métabolites majoritairement retrouvés dans les sols et les eaux (EFSA, 2007) (Figure 17).

### 2.5.3.2. Etudes *in vitro*

#### 2.5.3.2.1. Diversité des souches dégradantes

Plusieurs souches bactériennes et fongiques isolées à partir de sols agricoles ou de bassins d'aération de stations d'épuration ont montré leur capacité à transformer le nicosulfuron (Tableau 5). Aucune de ces souches n'est capable d'utiliser le nicosulfuron comme source de carbone pour sa croissance, ni de le minéraliser. Cependant, deux de ces souches (*T. flavus* LZM1 et *S. marcescens* N80) sont capables d'utiliser le nicosulfuron comme source d'azote (Zhang *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013).

**Tableau 5.** Souches pures de microorganismes capables de transformer le nicosulfuron.

Phylum/Division	Genre/Espèce/Souche	Origine	Référence
Ascomycota	<i>Talaromyces flavus</i> LZM1	STEP	(Song <i>et al.</i> , 2013)
Ascomycota	<i>Aspergillus niger</i> YF1	STEP	(Yang <i>et al.</i> , 2008)
Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i> YB1	STEP	(Yang <i>et al.</i> , 2008)
$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Ochrobactrum</i> sp. ZWS16	Sol agricole	(Zhao <i>et al.</i> , 2015b)
$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Rhodopseudomonas</i> sp. J5-2	Sol agricole	(Zhang <i>et al.</i> , 2011a)
$\beta$ -Proteobacteria	<i>Alcaligenes faecalis</i> ZWS11	Sol agricole	(Zhao <i>et al.</i> , 2015a)
$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Klebsiella</i> sp. Y1	Sol agricole	(Wang <i>et al.</i> , 2016b)
$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Serratia marcescens</i> N80	STEP	(Zhang <i>et al.</i> , 2012)

STEP : station d'épuration.

#### 2.5.3.2.2. Description des voies de biotransformation

Les souches pures de microorganismes ont permis de décrire plusieurs voies de biotransformation du nicosulfuron (Figure 17).

1. La voie commune à l'ensemble des souches décrites jusqu'à présent correspond au clivage de la liaison sulfonylurée, qui est la voie classiquement décrite pour les molécules de la famille des sulfonylurées (Sarmah and Sabadie, 2002). Ainsi, la souche *Bacillus subtilis* YB1 transforme le nicosulfuron en deux produits, dont l'ADMP, après clivage de la liaison (C=O) – N du côté du cycle pyrimidine (Lu *et al.*, 2012). Le clivage de la liaison (C=O) – N de part et d'autre du groupement C=O au niveau de la liaison sulfonylurée est réalisé par la souche *Serratia marcescens* N80, menant à la production d'ADMP et d'ASDM (Zhang *et al.*, 2012). Ces deux métabolites sont également retrouvés lors de la transformation du nicosulfuron par la souche *Talaromyces flavus* LZM1 (Song *et al.*, 2013). L'ADMP et l'ASDM sont ensuite partiellement transformés par déméthylation (métabolite 140u) et perte du groupement –N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (métabolite 186u), respectivement. La souche *Alcaligenes faecalis* ZWS11, en plus de l'ASDM et l'ADMP, est aussi capable de produire un métabolite M2 après une *O*-désalkylation (Zhao *et al.*, 2015a). Enfin, la transformation du nicosulfuron par la souche *Klebsiella* sp. Y1 produit l'ADMP, qui est ensuite dégradé (Wang *et al.*, 2016b).

2. Les souches *T. flavus* LZM1 et *A. faecalis* ZWS11 produisent également un autre métabolite (M4) résultant de la contraction de la liaison sulfonylurée et de l'élimination du groupement -SO<sub>2</sub>.

3. Enfin, un dernier métabolite décrit uniquement chez la souche *T. flavus* LZM1 est le métabolite 303u, résultant de l'ouverture du cycle pyridine.

Certains métabolites du nicosulfuron décrits dans l'environnement ne sont pas retrouvés au cours de la biodégradation avec les souches pures de microorganismes. Cependant, les deux métabolites du nicosulfuron majoritairement retrouvés dans l'eau et dans le sol (l'ADMP et l'ASDM) ont été aussi identifiés chez toutes les souches isolées dégradantes.

#### 2.5.3.2.3. *Enzymes potentiellement impliquées dans la biotransformation du nicosulfuron*

Les enzymes impliquées dans la dégradation des herbicides sulfonyles sont très peu décrites. Seule SuIE, une estérase issue de la souche *Hansschlegelia zihuaiae* S113, a été décrite comme étant impliquée dans l'étape de désestérification lors de la biotransformation de certains de ces herbicides (Hang *et al.*, 2012). Cette enzyme n'a cependant montré une activité que pour les sulfonyles portant des groupements méthyle ou éthyl-ester (thifensulfuron-méthyle, metsulfuron-méthyle, éthametsulfuron-méthyle, bensulfuron-méthyle, chlorimuron-éthyle).

Malgré l'identification de nombreux produits de transformation du nicosulfuron, aucune enzyme impliquée dans sa transformation n'a encore été purifiée et caractérisée. Certains travaux ont mis en évidence que le maximum d'activité enzymatique de dégradation du nicosulfuron se trouvait dans la fraction protéique extracellulaire chez la souche *Bacillus subtilis* YB1 et que 3 enzymes codées par les gènes *mntA* (transporteur ABC de manganèse), *katA* (végétative catalase I) et une acétoïne déshydrogénase E1 seraient responsables de cette transformation (Kang *et al.*, 2012, 2013). Cependant, l'implication réelle de ces enzymes dans la transformation du nicosulfuron reste à confirmer.

## 2.6. Impact environnemental et toxicité

### 2.6.1. Impact sur les microorganismes

La cible moléculaire du nicosulfuron, l'ALS, est une enzyme présente chez les plantes, mais aussi chez les bactéries et les eucaryotes unicellulaires (Schloss, 1990; Kingsbury *et al.*, 2004). Les premiers tests *in vitro* d'inhibition d'enzymes par les sulfonyles ont d'ailleurs été réalisés avec des ALS bactériennes, plus faciles à purifier.

#### 2.6.1.1. Milieu aquatique

Une étude en mésocosme a mis en évidence une augmentation du contenu en chlorophylle *a* de communautés composées à 99 % de diatomées suite à leur exposition à des doses environnementales de nicosulfuron (2 et 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Seguin *et al.*, 2001a). De même, des

études en microcosmes ont montré que le nicosulfuron modifiait légèrement la structure des communautés phytoplanctoniques sans en altérer la croissance (Nélieu *et al.*, 2005), mais que ces effets n'étaient plus observés avec des souches pures de microalgues (Seguin *et al.*, 2001b). En effet, il a été montré que seules certaines espèces de microalgues étaient impactées par le nicosulfuron (Leboulanger *et al.*, 2001), soulignant ainsi la limitation des tests de toxicité standardisés basés sur l'utilisation d'une seule espèce pour évaluer l'impact d'un xénobiotique sur un écosystème d'eau douce et l'importance d'étudier les effets des xénobiotiques à l'aide de systèmes se rapprochant le plus possible de la diversité des microorganismes retrouvés dans l'environnement.

#### 2.6.1.2. Milieu terrestre

##### 2.6.1.2.1. *Impact sur l'abondance des microorganismes*

La présence de nicosulfuron (formulation commerciale Motivell® : 60 g L<sup>-1</sup> de nicosulfuron) entraîne une baisse de la biomasse microbienne totale des sols, mais également des communautés spécifiques comme les bactéries fixatrices d'azote, avec cependant une stimulation des communautés fongiques, suggérant une meilleure tolérance de ces dernières vis-à-vis de l'herbicide par rapport aux communautés bactériennes (Šantrić *et al.*, 2004). Cette baisse de biomasse est d'autant plus grande que la quantité de nicosulfuron appliquée sur le sol est importante (de Oliveira *et al.*, 2009; Karpouzas *et al.*, 2014a). Aucun effet significatif du nicosulfuron formulé (Milagro®) utilisé à la dose agronomique n'a cependant été observé sur l'abondance des communautés phototrophes de deux sols, composées majoritairement de chlorophycées, de diatomées, de cyanobactéries et de bryophytes (Joly *et al.*, 2014).

##### 2.6.1.2.2. *Impact sur l'activité des microorganismes*

La présence de nicosulfuron dans le sol entraîne une diminution transitoire du taux basal de respiration et de l'activité déshydrogénase des communautés microbiennes du sol, d'autant plus importante que les doses appliquées augmentent (de Oliveira *et al.*, 2009). En revanche, l'abondance et l'activité des méthanotrophes ne semblent pas affectées par le nicosulfuron (Seghers *et al.*, 2005).

Un effet transitoire, caractérisé par une stimulation de l'ammonification et une inhibition de la nitrification dans le sol, a été mis en évidence après application du nicosulfuron en mélange avec la mésotrione et le *S*-métolachlore, mais le rôle de chacune de ces molécules n'a pas été élucidé (Joly *et al.*, 2015).

Les activités liées aux cycles du carbone et du phosphore (c.-à-d. bêta-glucosidase, bêta xylosidase, L-alanine-aminopeptidase, N-acétyl-bêta-glucosaminidase, phosphatase et cellobiohydrolase) ont également été décrites comme étant impactées par la présence de nicosulfuron (Karpouzas *et al.*, 2014a).

#### 2.6.1.2.3. Impact sur la structure des communautés microbiennes

Aucun effet significatif du nicosulfuron formulé (Milagro<sup>®</sup>), et utilisé à la dose agronomique recommandée, n'a été observé sur la structure des communautés phototrophes de deux sols différents (Joly *et al.*, 2014). Cependant, des effets du nicosulfuron ont été mis en évidence sur la structure des communautés microbiennes du sol et des communautés fongiques mycorhiziennes après application de 5 fois la dose agronomique recommandée (Karpouzas *et al.*, 2014a; b). La présence de nicosulfuron semble sélectionner certaines espèces microbiennes, dont une majorité appartient aux Firmicutes et aux Actinobacteria (Petric *et al.*, 2016). L'absence de l'ALS ou la présence d'une ALS modifiée (et par conséquent non inhibée par le nicosulfuron) chez ces espèces pourrait expliquer leur tolérance au nicosulfuron.

#### 2.6.1.3. Impact sur souches isolées – Bio-essais

L'effet inhibiteur du nicosulfuron a été mis en évidence sur plusieurs souches bactériennes isolées, (*Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Streptomyces griseus* et *Streptomyces coelicolor*). La cible moléculaire de l'herbicide a été décrit comme étant des chitinases bactériennes (Vlădoiu *et al.*, 2015a). Une approche de docking moléculaire a permis d'identifier les résidus d'acides aminés impliqués dans l'interaction entre le nicosulfuron et chacune des enzymes, suggérant l'effet inhibiteur potentiel de l'herbicide sur ce type d'enzyme. L'interaction potentielle entre le nicosulfuron et l'uréase de *Bacillus pasteurii* a également été démontrée, mais cette interaction n'est pas localisée au niveau du site actif de l'enzyme, suggérant une allostérie (Vlădoiu *et al.*, 2015b).

Le test standardisé Microtox<sup>®</sup> a été utilisé pour déterminer la toxicité aiguë du nicosulfuron et de sa formulation commerciale Milagro<sup>®</sup> (Joly *et al.*, 2013). La CE<sub>50</sub> (15 min) du nicosulfuron pur est très supérieure à celle du nicosulfuron formulé (167,8 et 4,1 mg L<sup>-1</sup>, respectivement), indiquant une toxicité plus importante de la formulation commerciale pour *A. fischeri* par rapport à la molécule active pure.

### 2.6.2. Impact sur des organismes supérieurs

Les résultats des études d'impact du nicosulfuron sur les invertébrés sont assez contrastés. Aucun effet du nicosulfuron n'a été observé chez les arthropodes *Folsomia candida* et *Collembola*, et l'annélide *Enchytraeus crypticus* (Scoriza *et al.*, 2015) présents dans le sol (Lins *et al.*, 2007). Au contraire, le nicosulfuron a un impact négatif sur les insectes du sol, pouvant être expliqué par l'action inhibitrice de ce composé vis-à-vis de l'acétylcholinestérase (Bretaud *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2005). Il est également capable d'altérer le sexe ratio de l'hyménoptère *Palmistichus elaeisis*, un ennemi naturel des lépidoptères (de Menezes *et al.*, 2014). Une inhibition significative de l'acétylcholinestérase a aussi été mise en évidence dans le cerveau du poisson rouge *Carassius auratus* à la suite d'une exposition à une dose sub-létale de nicosulfuron (Bretaud *et al.*, 2000). Il a également été montré que l'exposition du poisson rouge à différentes doses de nicosulfuron affecte certaines caractéristiques de son comportement telles que la nage, le regroupement et la fuite (Saglio *et al.*, 2001, 2003).

L'impact du nicosulfuron sur le développement et la maturation de l'amphibien *Xenopus laevis* a, quant à lui, été décrit comme relativement faible (Fort *et al.*, 1999).

La DL<sub>50</sub> du nicosulfuron chez le rat (voie orale) est > 5 g kg<sup>-1</sup> (EFSA, 2007). Chez cet animal, la majorité du nicosulfuron est rapidement éliminée par les urines et les fèces, la partie restante étant principalement transformée en ADMP et ASDM (Hutson, 1998).

Le nicosulfuron est également capable de potentialiser les effets toxiques d'autres composés comme l'insecticide organophosphoré diazinon vis-à-vis de l'insecte lépidoptère *Helicoverpa zea* en augmentant l'inhibition de l'acétylcholinestérase par l'insecticide (Massa *et al.*, 2008).

### Conclusions :

D'une manière générale, les résultats de toxicité et d'écotoxicité du nicosulfuron laissent supposer que cette molécule a un effet limité sur les organismes vivants en raison de (i) la faible dose agronomique recommandée, (ii) sa faible persistance dans l'environnement, et (iii) ses impacts sur les organismes vivants souvent uniquement observés à des doses bien supérieures à la dose agronomique recommandée. Cependant, compte-tenu de la grande diversité des produits de transformation du nicosulfuron, générés soit par voie chimique (principalement l'hydrolyse), soit par voie biologique, il est nécessaire de s'intéresser à l'impact indirect du nicosulfuron sur les écosystèmes, notamment en caractérisant la toxicité (principalement pour les microorganismes) de ses métabolites.

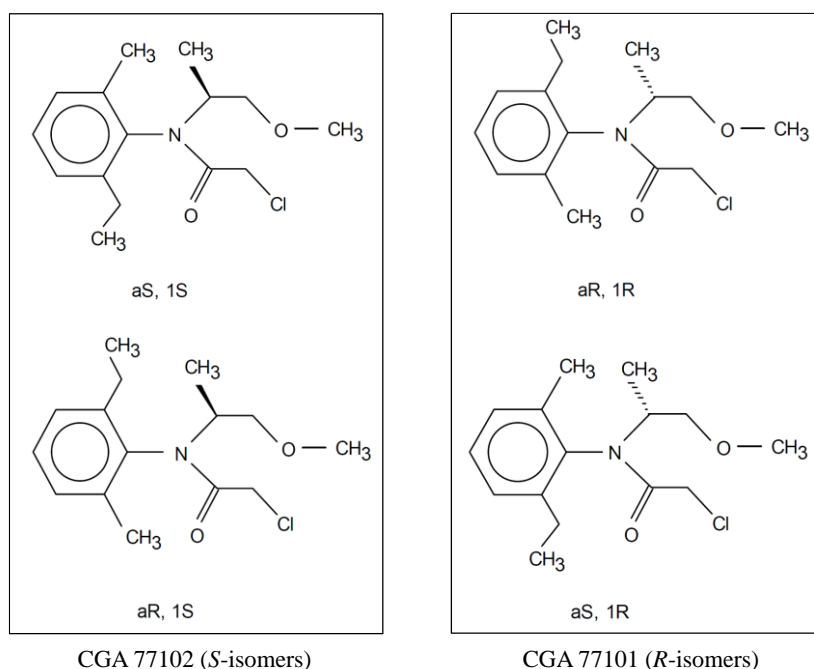
## 3. Le S-métolachlore

### 3.1. Historique

Le métolachlore appartient à la famille chimique des chloroacétanilides ou chloroacétamides. Ce composé a été initialement développé en tant qu'herbicide sous le nom CGA 24705 au début des années 1970 par la firme Ciba-Geigy, devenue depuis Novartis puis Syngenta (Gerber *et al.*, 1974). L'usage de cet herbicide a ensuite considérablement augmenté jusqu'à la fin des années 1990 pour devenir l'une des molécules les plus utilisées dans de nombreux pays, sur plus de 70 types de cultures différentes (O'Connell *et al.*, 1998). Le métolachlore consiste en un mélange racémique des deux isomères *R* et deux isomères *S* (Figure 18), les isomères *S* possédant l'activité herbicide (Moser *et al.*, 1982). Des travaux de recherche ont donc été menés afin d'enrichir le ratio isotopique en isomère *S* lors de la synthèse de cette molécule. La firme Novartis (devenue Syngenta) a mis au point, à la fin des années 1990, une catalyse énantiosélective permettant de synthétiser du métolachlore enrichi à plus de 80% en isomères *S* (Blaser and Spindler, 1997). Ce « *chiral switch* », correspondant à la transition vers l'utilisation de métolachlore enrichi en isomères *S* (*S*-métolachlore), a permis de réduire d'environ 40 % les doses de matière active employées aux champs sans pour autant affecter l'activité herbicide. L'usage du *S*-métolachlore a été autorisé pour la première fois aux Etats-Unis en 1997 dans la formulation commerciale Dual Magnum® en



remplacement de la formulation DUAL<sup>®</sup> contenant le mélange racémique de métolachlore, et en Europe au début des années 2000.



**Figure 18.** Isomères du métolachlore. La molécule comporte deux éléments chiraux : un axe chiral (axe  $C_{Ar}-N$ , dont la rotation est limitée en raison de l'encombrement stérique, définissant les atropoisomères aS et aR) et un stéréocentre (carbone asymétrique, définissant les isomères 1S et 1R).

Remarque :

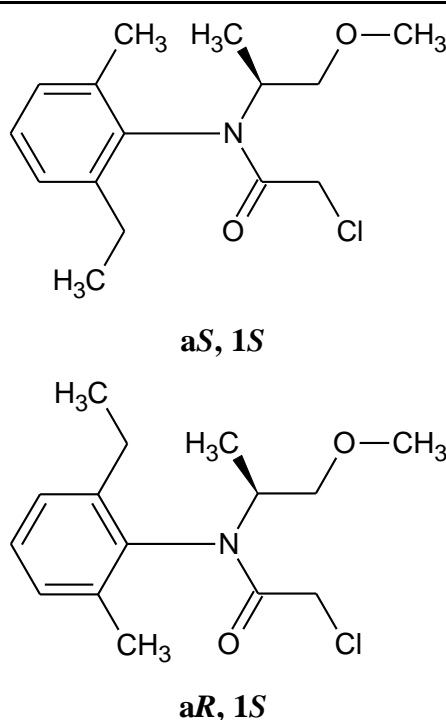
Il n'est pas toujours possible de déterminer quels isomères du métolachlore ont été utilisés dans certaines études, qui parlent de « *metolachlor* », sans précision supplémentaire. C'est pourquoi, dans ce manuscrit, le choix a été fait de distinguer les isomères *S*-métolachlore, des *R*-métolachlore ou du mélange racémique *rac*-métolachlore quand l'information était disponible. Lorsqu'elle ne l'était pas, le terme « métolachlore » a été utilisé.

### 3.2. Propriétés physico-chimiques

Les principales propriétés physico-chimiques du *S*-métolachlore sont décrites dans le Tableau 6. Le *S*-métolachlore (2-chloro-*N*-(2-éthyl-6-méthylphényl)-*N*-[(1*S*)-2-méthoxy-1-méthyléthyl]acétamide) est un herbicide non ionique composé des isomères aRS-1S (80 – 100 %) et aRS-1R (0 – 20 %). Ce composé est relativement soluble dans l'eau (480 mg L<sup>-1</sup> à pH 7,3) et sa volatilisation à la surface du sol est positivement corrélée à la température (dans un

sol humide uniquement) et à l'humidité du sol (Prueger *et al.*, 2005; Gish *et al.*, 2009). L'hydrolyse du *S*-métolachlore dans l'eau est considérée comme négligeable (EFSA, 2004).

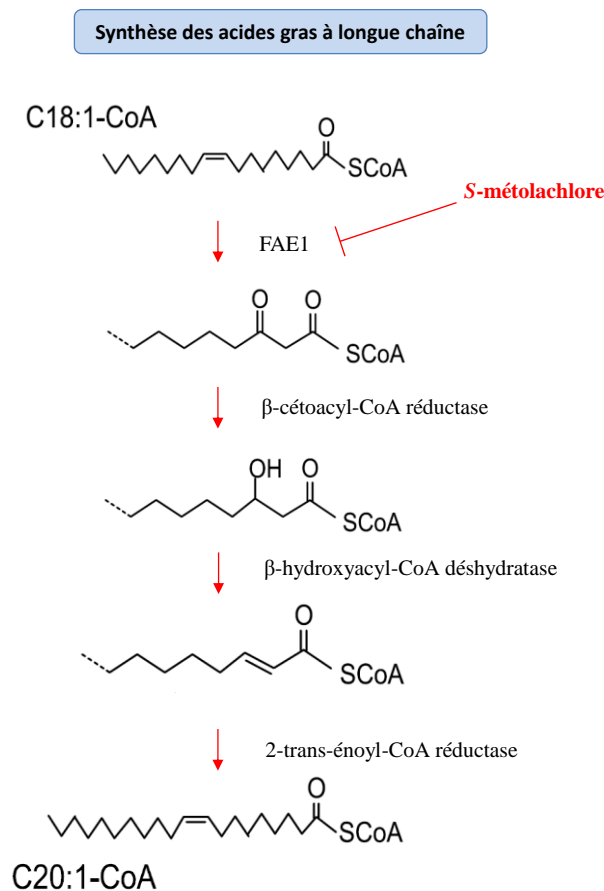
**Tableau 6.** Identité et propriétés physico-chimiques du *S*-métolachlore (EFSA, 2004).

Substance active (s.a.)	<i>S</i> -métolachlore
Activité	Herbicide
Nom complet	2-chloro- <i>N</i> -(2-éthyl-6-méthylphényl)- <i>N</i> -[(1 <i>S</i> )-2-méthoxy-1-méthyléthyl]acétamide
Formule brute	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>2</sub>
Masse molaire	283,8 g mol <sup>-1</sup>
Structure chimique	 <p style="text-align: center;"><b>aS, 1S</b></p> <p style="text-align: center;"><b>aR, 1S</b></p>
Constante de Henry, K <sub>H</sub>	2,2 10 <sup>-3</sup> Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> à 25 °C
Solubilité dans l'eau	480 mg L <sup>-1</sup> (pH 7,3) à 25 °C
-log <sub>10</sub> (constante de dissociation), pKa	Pas de constante de dissociation

### 3.3. Mode d'action

Le *S*-métolachlore est un herbicide systémique qui agit dans le sol, en pénétrant au niveau du coléoptile de la plante, et qui est actif sur les graminées et certaines dicotylédones. Les herbicides de la famille des chloroacétanilides, dont fait partie le *S*-métolachlore, inhibent

spécifiquement la FAE1 synthase, une enzyme clé de la biosynthèse des acides gras à longue chaîne (Gotz and Boger, 2004). Le système d'élongation des acides gras est constitué de 4 enzymes (Figure 19). La première étape correspond à la réaction du C18:1-CoA avec le malonyl-CoA, pour former l'acétoacétyl-CoA, réaction catalysée par la FAE1 synthase (cétoacyle-synthase). A la suite de trois réactions supplémentaires (une réduction de la fonction cétone, une déshydratation et une réduction de la double liaison), un acide gras comportant deux atomes de carbone supplémentaires est synthétisé. L'inhibition de la FAE1 synthase entraîne un arrêt de la division cellulaire et du développement des plantes.



**Figure 19.** Mode d'action du *S*-métolachlore chez les plantes. L'élongation des acides gras se fait en 4 étapes (Gotz and Boger, 2004).

### 3.4. Réglementation – utilisations agronomiques

L'usage du *S*-métolachlore est autorisé dans l'Union Européenne depuis le 1<sup>er</sup> avril 2005 suite à son inscription à l'Annexe I du règlement (CE) n° 1107/2009. Le *S*-métolachlore a remplacé le mélange racémique (*rac*-métolachlore) interdit depuis 2003. C'est un herbicide appliqué en pré ou post-levée sur de nombreuses cultures dont le maïs (dose d'application de

1920 g s.a. ha<sup>-1</sup>). Plusieurs formulations commerciales contenant du *S*-métolachlore sont disponibles sur le marché, telles que le Dual Gold<sup>®</sup> (960 g L<sup>-1</sup> de *S*-métolachlore).

Le *S*-métolachlore est la deuxième molécule la plus utilisée sur les cultures de maïs en région Aquitaine (Figure 8). A titre indicatif, en 2011, 40% des surfaces traitées avec un herbicide ont reçu au moins une fois la substance *S*-métolachlore (AGRESTE, 2013). Au niveau national, les ventes de cette substance en 2014 étaient de 2 031 737 kg, représentant la très grande majorité des ventes d'herbicides de la famille des chloroacétanilides (AGRESTE, 2016).

### 3.5. Devenir dans l'environnement

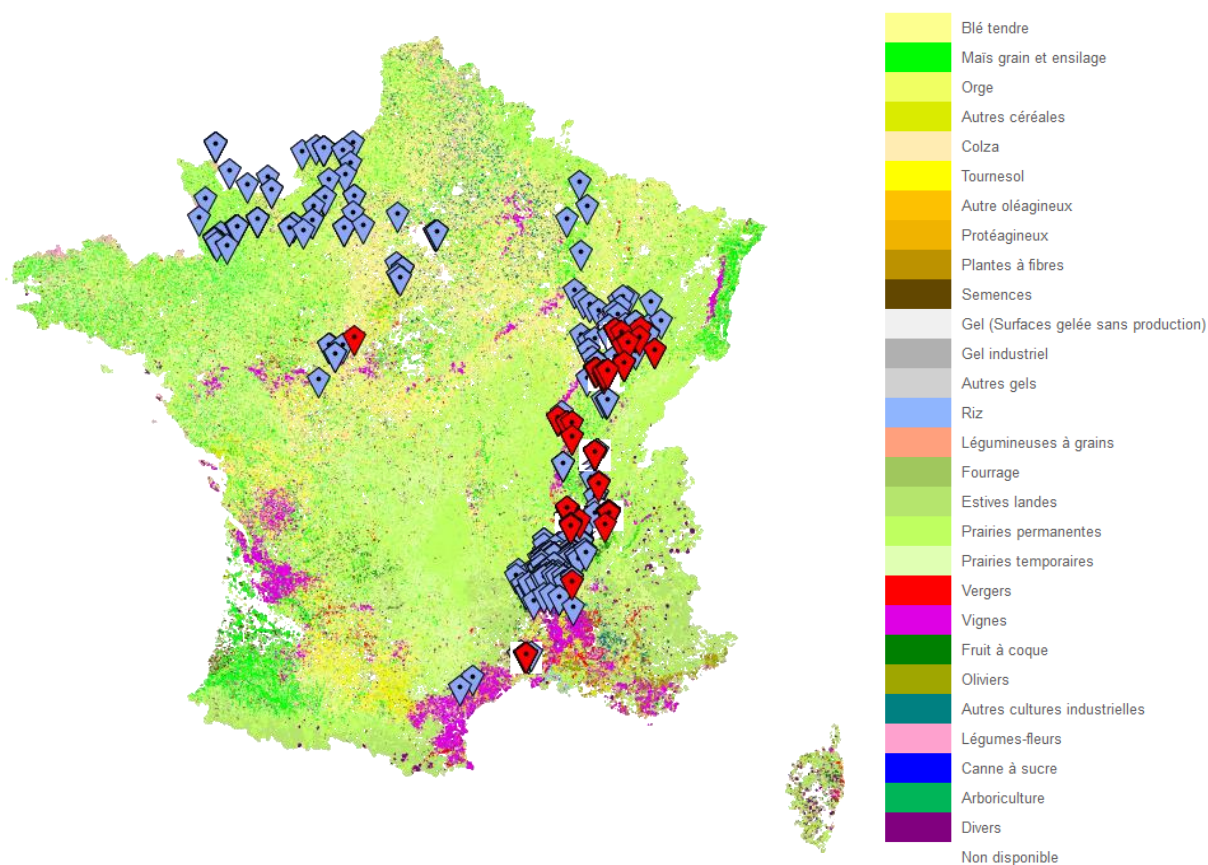
#### 3.5.1. Rétention dans les sols

Les temps de demi-vie du *S*-métolachlore décrits dans la littérature varient de 2,5 à 289 jours suivant les conditions environnementales (Aslam *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015), le type de sol et les pratiques agricoles (Zemolin *et al.*, 2014). Ces facteurs peuvent être dépendants les uns des autres, puisque les propriétés du sol peuvent varier en fonction des pratiques agricoles, et de ce fait influencer la dissipation de la molécule dans le sol. Ainsi, certaines pratiques agricoles limitant le labour tendent à enrichir la couche superficielle de sol en matière organique (Alletto *et al.*, 2011), augmentant ainsi l'adsorption du *S*-métolachlore dans les premiers centimètres de sol (Si *et al.*, 2009). De même, une plus forte adsorption du *S*-métolachlore a été observée dans les couches superficielles de sols Argentins, plus riches en matière organique (Bedmar *et al.*, 2011). En effet, le *S*-métolachlore présente des valeurs de  $K_d$  six fois (Weber *et al.*, 2003) voire neuf fois (Gannon *et al.*, 2013) plus élevées dans des sols plus riches en matière organique, allant de 1,08 à 9,32 L kg<sup>-1</sup>. Une autre étude s'intéressant à des sols possédant différents teneurs en matière organique a également montré une corrélation positive entre l'adsorption du *S*-métolachlore et la quantité de matière organique, avec des valeurs de  $K_d$  allant de 0,8 à 8,7 L kg<sup>-1</sup> (Alletto *et al.*, 2013). Cependant, un contenu riche en matière organique peut favoriser l'activité microbienne, réduisant ainsi les DT<sub>50s</sub> observés du *S*-métolachlore (Rice *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2011).

En plus du contenu en matière organique, les argiles influencent également l'adsorption du *rac*-métolachlore dans les sols (Pusino *et al.*, 1992). La sorption du *S*-métolachlore peut aussi être influencée par la présence de surfactants (Coroi *et al.*, 2011), de fertilisants (Pinna *et al.*,

2014) ou d'amendements tels que la paille de maïs (Aslam *et al.*, 2013), le charbon à usage agricole (Trigo *et al.*, 2016) ou les résidus solides issus de la production d'huile d'olives (Pena *et al.*, 2013). Certaines de ces études ont également montré que la désorption du *S*-métolachlore était inversement corrélée à son adsorption, et qu'elle pouvait être irréversible dans le sol (Pinna *et al.*, 2014) et sur les résidus de paille de maïs (Aslam *et al.*, 2013). Enfin, il a été montré que différentes interactions telles que les liaisons de Van der Waals et les interactions hydrophobes étaient impliquées dans la sorption des herbicides non ioniques, comme le *S*-métolachlore, aux particules du sol (Berry and Boyd, 1985; Dec and Bollag, 1997).

Ces processus d'adsorption réduisent ainsi la biodisponibilité du *S*-métolachlore, et par conséquent, sa biodégradation (Alletto *et al.*, 2013; Long *et al.*, 2014) ; ils peuvent également retarder sa migration vers les eaux souterraines. Cependant, selon les propriétés d'adsorption du sol, le potentiel du *S*-métolachlore à migrer vers les eaux souterraines peut être non négligeable au regard de sa solubilité dans l'eau. En effet, cette molécule possède un potentiel modéré de lixiviation vers les eaux souterraines, comme indiqué par des valeurs de GUS entre 1,9 et 2,8 (Cabrera *et al.*, 2012). Les résultats de l'analyse des eaux souterraines au niveau des zones de captage d'eau potable pour la période 2003-2015 indiquent une fréquence de détection du *S*-métolachlore de 2,7 % (ADES, 2016) (Figure 20). Le métolachlore a également été fréquemment retrouvé dans les eaux de surface (Scribner *et al.*, 2000; Thurman *et al.*, 2000), et la fréquence de détection du *S*-métolachlore en France était de 56,5% en 2013 (SOeS, 2015b).

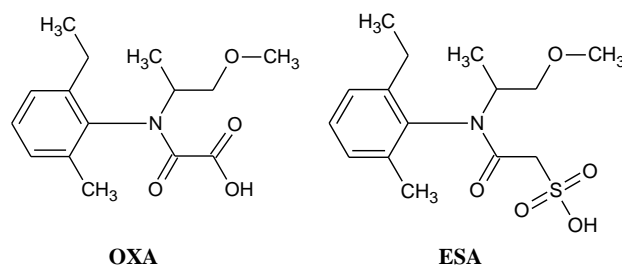


**Figure 20.** Quantification du *S*-métolachlore dans les eaux souterraines au niveau des sites de prélèvements d'eau potable en France métropolitaine pour la période 2003-2015 (ADES, 2016). Localisation des sites de prélèvement pour lesquels le *S*-métolachlore a été quantifié (◇), et où la concentration était supérieure à  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  (◆). La carte indique également les zones de cultures déclarées par les exploitants en 2012 (registre parcellaire graphique (RPG) 2012, Agence de services et de paiement (ASP), Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt).

A partir des années 1980, de très nombreuses études avaient déjà fait état de la présence du *rac*-métolachlore, puis du *S*-métolachlore dans les eaux de surface à travers le monde dans une large gamme de concentrations ( $0,01$  à  $174 \mu\text{g L}^{-1}$ ), comme par exemple aux Etats-Unis (Johnson *et al.*, 2011; Kalkhoff *et al.*, 2012; Ryberg and Gilliom, 2015), au Canada (Byer *et al.*, 2011), en Espagne (Kuster *et al.*, 2008) et en France (Boithias *et al.*, 2011). La présence de cette molécule a aussi été mise en évidence dans les eaux souterraines de nombreux pays, notamment aux Etats-Unis où, durant la période 1993-2011, les concentrations en *rac*-métolachlore n'ont pas significativement évolué dans les aquifères (Toccalino *et al.*, 2014) malgré la réduction de moitié de son usage (en quantité de s.a.) à la fin des années 1990 suite à l'utilisation de la forme enrichie en *S*-métolachlore. Des études placent ainsi cette molécule dans le top 5 des contaminants « à risque » au Canada et aux Etats-Unis (Hull *et al.*, 2015), ainsi qu'en Grèce (Papadakis *et al.*, 2015).

L'utilisation du *S*-métolachlore en remplacement du *rac*-métolachlore a cependant très vite débouché sur un enrichissement en isomère *S* du métolachlore retrouvé dans les eaux de surface (Buser *et al.*, 2000; Poiger *et al.*, 2002). Ainsi, le métolachlore retrouvé dans des échantillons d'eau de rivière au Canada présentait un ratio *S/R* métolachlore dans les échantillons d'eau les plus concentrés similaire à celui de l'herbicide enrichi, tandis que les échantillons présentant les plus faibles concentrations en métolachlore avaient un ratio *S/R* inférieur, indiquant soit des apports conjoints de *S*-métolachlore et de *rac*-métolachlore, soit une dégradation énantiosélective (Kurt-Karakus *et al.*, 2008, 2010).

Il faut également souligner l'importance de prendre en compte les produits de transformation dans les analyses d'eau, puisqu'une étude a montré l'augmentation de la fréquence de détection du métolachlore dans 81 puits de captage d'eau potable aux Etats-Unis en 2001 (de 9,3% à 48,8%) quand les produits de transformation étaient inclus dans les analyses (Kolpin *et al.*, 2004). Ceci peut être en partie expliqué par la différence de comportement des deux principaux métabolites du *S*-métolachlore (l'acide oxalinique (OXA, *oxalinic acid*) et l'acide éthane-sulfonique (ESA, *ethan sulfonic acid*) (Figure 21)), par rapport à la molécule mère (adsorption moins élevée des métabolites), expliquant leur présence dans les eaux souterraines généralement à des concentrations supérieures à celle de la molécule mère (Baran and Gourcy, 2013).



**Figure 21.** Structure chimique des deux métabolites principaux du métolachlore : l'acide oxalinique (OXA, *oxalinic acid*) et l'acide éthane-sulfonique (ESA, *ethan sulfonic acid*).

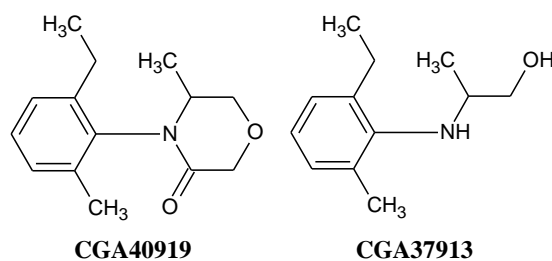
### 3.5.2. Transformation abiotique : photo-transformation

Les transformations abiotiques du *S*-métolachlore dans le sol et l'eau sont principalement régies par le processus de photolyse, l'hydrolyse étant en effet considérée comme négligeable (EFSA, 2004; Zemolin *et al.*, 2014; Gutowski *et al.*, 2015).

Plusieurs études se sont intéressées à la photo-stabilité du métolachlore, puis du *S*-métolachlore. La dégradation du métolachlore dans l'eau de surface de lac est accélérée en

présence de lumière ( $DT_{50s}$  comprises entre 22 et 205 jours suivant la saison), tandis qu'à l'obscurité, cette molécule est relativement stable (< 4% dégradation après 100 jours d'incubation) (Kochany and Maguire, 1994). Par ailleurs, la photo-dégradation du métolachlore dans l'eau est, dans un premier temps, réduite en présence de constituants du sol tels que des minéraux (kaolinite, montmorillonite et goethite) ou des acides fulviques qui protègent de la lumière le métolachlore qui y est adsorbé (Mathew and Khan, 1996). Ensuite, la photo-dégradation des noyaux phénoliques des acides fulviques entraîne un relargage du métolachlore, qui devient alors davantage exposé à la lumière, expliquant les taux de photo-dégradation plus importants en présence d'acides fulviques. La présence de nitrates accélère également la photo-dégradation du métolachlore, en raison de la production de radicaux hydroxyles générés par la photolyse des nitrates (Dimou *et al.*, 2005). Le *S*-métolachlore formulé (Mercantor Gold<sup>®</sup>, 960 g L<sup>-1</sup> de *S*-métolachlore) est aussi plus rapidement photo-dégradé que le *S*-métolachlore pur, certainement en raison de la présence d'acide dodécylbenzènesulfonique dans la formulation, un adjuvant qui solubilise et disperse la substance active, augmentant son exposition à la lumière (Gutowski *et al.*, 2015). Au contraire, en présence de matière organique dissoute, un écran se forme, menant à une diminution de la photo-dégradation du métolachlore (Dimou *et al.*, 2005).

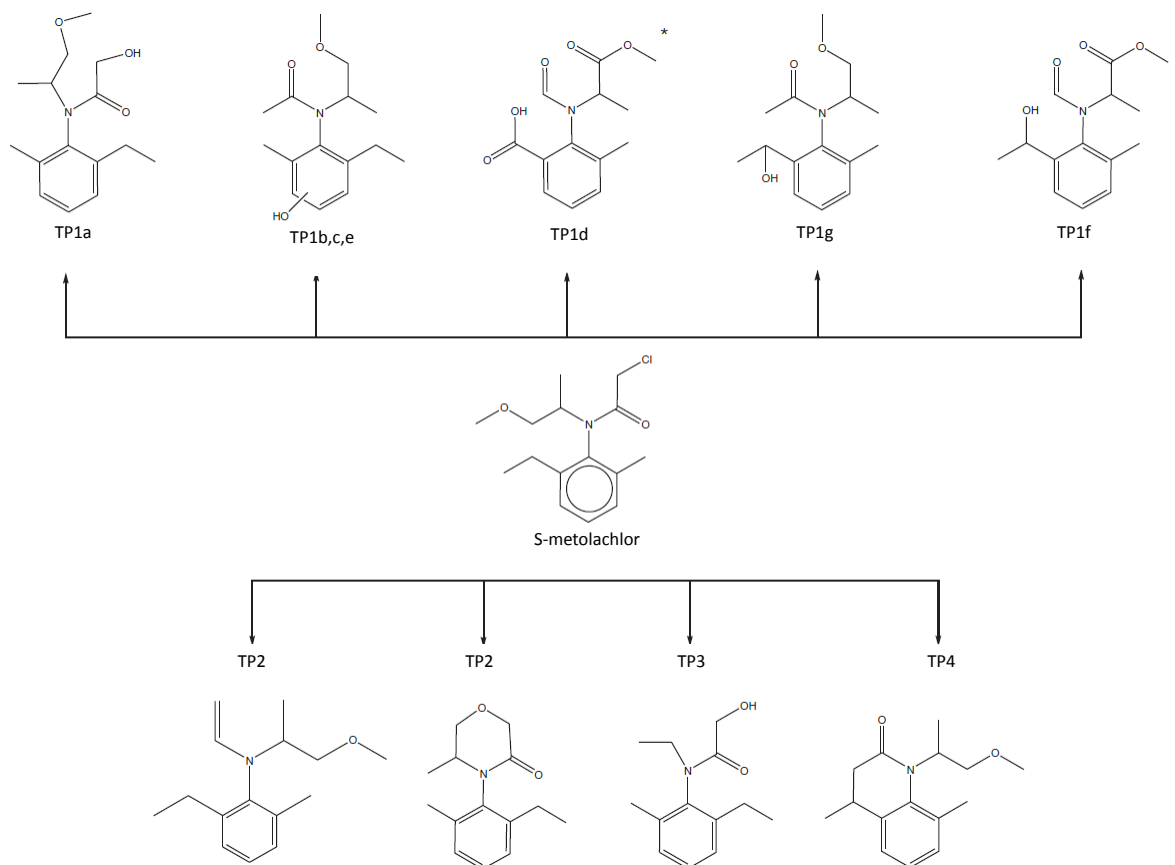
Le CGA40919 (Figure 22) est retrouvé dans la plupart des études de photo-transformation et constitue très souvent le photo-produit majoritaire du métolachlore (Mathew and Khan, 1996; Vialaton *et al.*, 2001; Dimou *et al.*, 2005). Il a également été montré que le métolachlore pouvait être clivé pour produire de l'acide monochloroacétique (MCA) et le composé CGA37913 (Figure 22) (Wilson and Mabury, 2000), le MCA étant également un des produits de transformation d'autres chloroacétanilides.



**Figure 22.** Structure chimique des métabolites CGA40919 et CGA37913 du métolachlore. CGA40919, 4-(2-éthyl-6-méthylphényl)-5-méthylmorpholin-3-one ; CGA37913, 2-((2-éthyl-6-méthylphényl)amino)-1-propanol.







**Figure 24.** Voies de photo-dégradation proposées du S-métolachlore (Gutowski *et al.*, 2015). \* structure prédite par le logiciel MetaPC (MultiCASE Inc., Beachwood, USA)

### 3.5.3. Transformation biotique

#### 3.5.3.1. Etudes *in situ*

Le métolachlore est considéré comme stable dans les environnements aquatiques (Liu *et al.*, 1995), contrairement aux sols où il est transformé majoritairement par voie biologique, notamment en profondeur en l'absence de photolyse (Liu *et al.*, 1988; Singh and Singh, 2016). La biodégradation du métolachlore et du S-métolachlore a été mise en évidence dans les sols agricoles (Konopka, 1994; KotoulaSyka *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1997; Long *et al.*, 2014), où le phénomène de biodégradation accélérée peut survenir suite à une exposition répétée des communautés microbiennes à cet herbicide (Sanyal and Kulshrestha, 1999). D'autres études ont également montré un effet de la température et de la teneur en eau du sol sur la biodégradation du métolachlore (Stamper and Tuovinen, 1998; Dinelli *et al.*, 2000; Rice *et al.*, 2002).

La biodégradation du *rac*-métolachlore dans le sol peut également être énantiosélective (dégradation plus rapide de l'isomère *S* (Buser and Mueller, 1995; Mueller and Buser, 1995; Ma *et al.*, 2006; Elsayed *et al.*, 2015) ou *R* (Maillard *et al.*, 2016)). D'autres études font état d'une biodégradation non énantiosélective du métolachlore dans le sol (Klein *et al.*, 2006) et dans l'eau (Aboul Eish and Wells, 2008).

Les principaux métabolites du métolachlore retrouvés dans l'environnement sont l'acide oxalinique (OXA) et l'acide éthane-sulfonique (ESA) (Figure 21) (Ferrer *et al.*, 1997; Graham *et al.*, 1999; Mersie *et al.*, 2004; Vryzas *et al.*, 2007, 2012; Maillard *et al.*, 2016). Ces deux métabolites sont, la plupart du temps, présents dans les eaux de surface et souterraines, à des concentrations supérieures à celle de la molécule mère (Kalkhoff *et al.*, 1998).

### 3.5.3.2. Etudes *in vitro*

#### 3.5.3.2.1. Diversité des souches dégradantes

Il existe une relative grande diversité de souches microbiennes isolées et décrites comme étant capables de transformer le métolachlore (Tableau 7). Ces souches ont majoritairement été isolées à partir de sols, parmi lesquelles *Candida xestobii*, *Bacillus simplex* (Munoz *et al.*, 2011) et *Paracoccus* sp. FLY-8 (Zhang *et al.*, 2011b), qui ont montré la capacité d'utiliser le métolachlore comme unique source de carbone pour leur croissance et de minéraliser partiellement la molécule. Cependant les voies de biodégradation ne sont pas connues.

Concernant le *S*-métolachlore, seules 3 souches bactériennes isolées du sol ont montré des capacités de transformer cette molécule par co-métabolisme, mais les métabolites n'ont pas été identifiés (Martins *et al.*, 2007).

Tableau 7. Souches pures de microorganismes capables de transformer le métolachlore.

Phylum/Division	Genre/Espèce/Souche	Origine	Isomères transformés	Référence
Actinobacteria	<i>Actinomyces</i>	Sol	métolachlore	(Krause <i>et al.</i> , 1985)
Actinobacteria	<i>Actinomyces</i>	Sol	métolachlore	(Saxena <i>et al.</i> , 1987)
Actinobacteria	<i>Actinomyces</i>	Sol	métolachlore	(Liu <i>et al.</i> , 1990)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	Sol	métolachlore	(Liu <i>et al.</i> , 1990)
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i> sp. PS1/5	Sol	métolachlore	(Shelton <i>et al.</i> , 1996)
Ascomycota	<i>Chaetomium globosum</i>	Sol	métolachlore	(McGahan and Tiedje, 1978)
Ascomycota	<i>Cladosporium herbarum</i>	Sol	métolachlore	(Bailey and Coffey, 1986)
Ascomycota	<i>Fusarium</i> sp.	Sol	métolachlore	(Saxena <i>et al.</i> , 1987)
Ascomycota	<i>Aspergillus flavus</i>	Sol	métolachlore	(Sanyal and Kulshrestha, 2002)
Ascomycota	<i>Aspergillus terricola</i>	Sol	métolachlore	(Sanyal and Kulshrestha, 2002)
Ascomycota	<i>Candida xestobii</i>	Sol	métolachlore	(Munoz <i>et al.</i> , 2011)
Basidiomycota	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Sol	métolachlore	(Liu <i>et al.</i> , 1991)
Basidiomycota	<i>Rhizoctonia praticola</i>	Sol	métolachlore	(Liu <i>et al.</i> , 1991)
Basidiomycota	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 20696	Sol	métolachlore	(Liu <i>et al.</i> , 1995)
Firmicutes	<i>Bacillus circulans</i>	Sol	métolachlore	(Saxena <i>et al.</i> , 1987)
Firmicutes	<i>Bacillus megaterium</i>	Sol	métolachlore	(Saxena <i>et al.</i> , 1987)
Firmicutes	<i>Bacillus megaterium</i>	Sol	métolachlore	(Wang <i>et al.</i> , 2008)
Firmicutes	<i>Bacillus niacini</i>	Sol	métolachlore	(Wang <i>et al.</i> , 2008)
Firmicutes	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Sol	métolachlore	(Wang <i>et al.</i> , 2008)
Firmicutes	<i>Bacillus simplex</i>	Sol	métolachlore	(Munoz <i>et al.</i> , 2011)
Zygomycota	<i>Mucor racemosus</i>	Sol	métolachlore	(Saxena <i>et al.</i> , 1987)
Zygomycota	<i>Rhizopus</i>	Sol	métolachlore	(Liu <i>et al.</i> , 1990)
Zygomycota	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Sol	métolachlore	(Liu <i>et al.</i> , 1991)
Zygomycota	<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112	Sol	métolachlore	(Pothuluri <i>et al.</i> , 1997)
$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Paracoccus</i> sp. FLY-8	Sol	métolachlore	(Zhang <i>et al.</i> , 2011b)
$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	Lac	métolachlore	(Zablotowicz <i>et al.</i> , 2001)
$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Klebsiella pneumoniae</i> GC s.B souches 1 et 2	Sol	S-métolachlore	(Martins <i>et al.</i> , 2007)
$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Sol	S-métolachlore	(Martins <i>et al.</i> , 2007)
$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Enterobacter aerogenes</i> GC s.A	Sol	S-métolachlore	(Martins <i>et al.</i> , 2007)

### 3.5.3.2.2. Description des voies de biotransformation

Les principales voies de biotransformation du métolachlore décrites chez les microorganismes sont caractérisées par des réactions de cyclisation, méthyle-hydroxylation, éthyle-hydroxylation, *O*-déméthylation, *N*-désalkylation, déchloration ou cystéine-conjugaison (Figure 25). La souche pure *Chaetomium globosum* isolée du sol, initialement décrite comme étant capable de dégrader l'alachlore, est également capable de transformer le métolachlore, aboutissant à la production de deux métabolites : le **Met1** (CGA41638) issu d'une *O*-déméthylation et hydroxylation, et le **Met2**, résultant d'une *N*-désalkylation

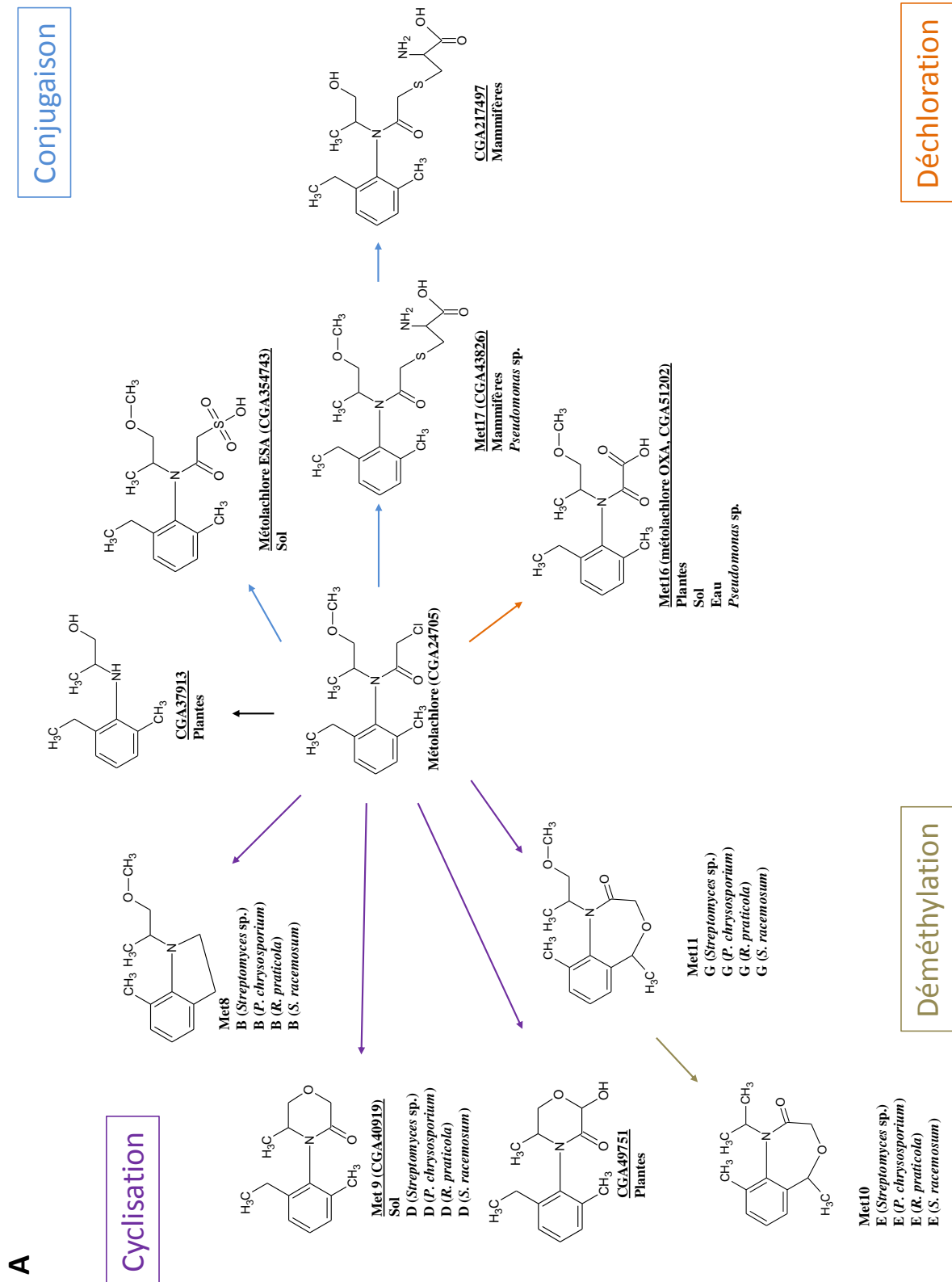
(McGahan and Tiedje, 1978). La déméthylation et/ou l'hydroxylation sont également les deux réactions de transformation du métolachlore par une souche bactérienne d'Actinomycète, aboutissant à la production de 6 métabolites (Krause *et al.*, 1985). Parmi ces métabolites, on retrouve le **Met1**, également produit chez des souches de *Mucor racemosus*, *Bacillus circulans* et *Bacillus megaterium* (Saxena *et al.*, 1987), et le **Met3**, un métabolite issu d'une hydroxylation, également retrouvé chez d'autres souches dont *Mucor racemosus*. La transformation du métolachlore par la souche *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 génère 6 métabolites par *O*-déméthylation suivie ou non d'une hydroxylation (voies majoritaires) et par hydroxylation des groupements éthyle ou méthyle du cycle aromatique (voie minoritaire) (Pothuluri *et al.*, 1997).

Le métolachlore peut également subir une déchloration, comme c'est le cas avec les souches *Streptomyces* sp., *Phanerochaete chrysosporium*, *Rhizoctonia praticola* et *Syncephalastrum racemosum* (Liu *et al.*, 1991). La proportion des métabolites ayant perdu l'atome de chlore par rapport à l'ensemble des métabolites produits est variable suivant la souche considérée, atteignant 41% pour la souche *Streptomyces* sp. dont les métabolites majoritaires sont **Met11** et **Met12**. Ces métabolites sont ensuite transformés par la souche, signe potentiel de minéralisation. La déchloration représente la voie majoritaire de transformation du métolachlore par *Streptomyces* sp., *P. chrysosporium* et *R. praticola* tandis que la voie majoritaire chez *S. racemosum* est une déméthylation suivie d'une hydroxylation du substituant alkyle de l'atome d'azote, pour former le métabolite **Met1**. La déméthylation/hydroxylation est en revanche minoritaire chez les trois autres souches, de même que l'hydroxylation des substituants du cycle aromatique.

Certains des produits de transformation du métolachlore sont issus d'une cyclisation intramoléculaire du groupement acétyle avec le substituant éthyle du cycle aromatique (métabolites **Met8** et **Met11**). La souche *P. chrysosporium* ATCC20696 produit également le métabolite **Met1** par déméthylation, et le **Met3** par hydroxylation, suivie d'une déchloration pour générer un composé intermédiaire (**Met14**), transformé finalement en **Met15** (Liu *et al.*, 1995).

La transformation du métolachlore par plusieurs isolats bactériens affiliés au genre *Pseudomonas*, issus de 3 lacs du delta du Mississippi, s'accompagne de la production de **Met16** (métolachlore OXA), et de dérivés glycyle-cystéine et cystéine (**Met17**, CGA43826) du métolachlore (Zablutowicz *et al.*, 2001). Les champignons *Aspergillus flavus* et *Aspergillus terricola* ont également montré la capacité à transformer le métolachlore en 5

métabolites issus de réactions de déchloration, *N*-désalkylation et clivage de la liaison amide (Sanyal and Kulshrestha, 2002).



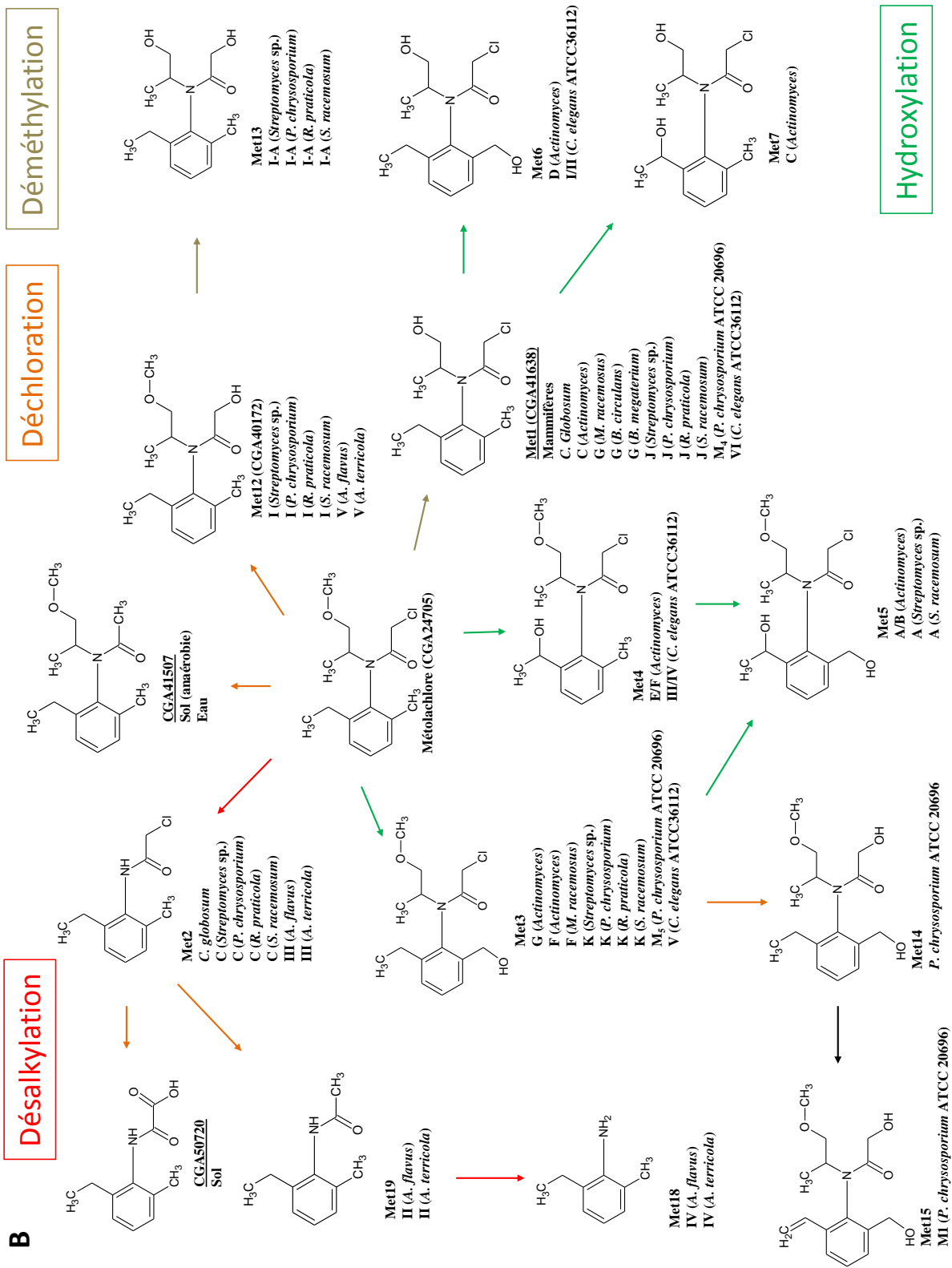


Figure 25. Cf. légende page suivante.

**Figure 25 A et B.** Voies de biotransformation du métolachlore chez différentes souches pures de bactéries et de champignons. Les métabolites classiquement retrouvés dans les fruits (Gaynor *et al.*, 1993), dans les plantes, dans le sol et dans l'eau (EFSA, 2004, 2008) sont également indiqués sur la figure (noms soulignés). Souches pures : *Chaetomium globosum* (McGahan and Tiedje, 1978) ; *Actinomyces* (Krause *et al.*, 1985) ; *Actinomyces*, *Mucor racemosus*, *Bacillus circulans* et *Bacillus megaterium* (Saxena *et al.*, 1987) ; *Streptomyces* sp., *Phanerochaete chrysosporium*, *Rhizoctonia praticola* et *Syncephalastrum racemosum* (Liu *et al.*, 1991) ; *Phanerochaete chrysosporium* ATCC20696 (Liu *et al.*, 1995) ; *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 (Pothuluri *et al.*, 1997) ; *Pseudomonas* sp. (Zablotowicz *et al.*, 2001) ; *Aspergillus flavus* et *Aspergillus terricola* (Sanyal and Kulshrestha, 2002). Métolachlore (CGA24705, 2-chloro-N-(2-éthyl-6-méthylphényl)-N-(2-méthoxy-1-méthyléthyl)-acétamide) ; CGA217497, acide 2-amino-3-({2-[(2-éthyl-6-méthylphényl)(1-hydroxypropan-2-yl)amino]-2-oxoéthyl)sulfanyl}propanoïque) ; acide métolachlore éthane sulfonique (ESA, CGA354743, acide 2-[(2-éthyl-6-méthylphényl)[2-méthoxy-1-méthyléthyl]amino]-2-oxoéthanesulfonique) ; CGA37913, 2-((2-éthyl-6-méthylphényl)amino)-1-propanol ; **Met9** (CGA40919, 4-(2-éthyl-6-méthylphényl)-5-méthylmorpholin-3-one) ; **Met1** (CGA41638, 2-chloro-N-(2-éthyl-6-méthylphényl)-N-(2-hydroxy-1-méthyléthyl)acétamide) ; **Met17** (CGA43826, conjugué cystéine du métolachlore) ; CGA49751, N-(2-éthyl-6-méthylphényl)-2-hydroxy-5-méthyl-3-oxomorpholine ; **Met16** (acide métolachlore oxalinique, OXA, CGA51202, acide {(2-éthyl-6-méthylphényl)[1-méthoxypropane-2-yl]amino}(oxo)acétique) ; **Met2**, 2-chloro-N-(2-éthyl-6-méthylphényl)acétamide ; **Met3**, 2-chloro-N-(2-éthyl-6-hydroxyméthylphényl)-N-(2-méthoxy-1-méthyléthyl)acétamide ; **Met4**, 2-chloro-N-[2-(1-hydroxyméthyl)-6-méthylphényl]-N-(2-méthoxy-1-méthyléthyl)acétamide ; **Met5**, 2-chloro-N-[2-(hydroxyéthyl)-6-hydroxyméthylphényl]-N-(2-méthoxy-1-méthyléthyl)acétamide ; **Met6**, 2-chloro-N-(2-éthyl-6-hydroxyméthylphényl)-N-(2-hydroxy-1-méthyléthyl)acétamide ; **Met7**, 2-chloro-N-[2-(1-hydroxyéthyl)-6-méthylphényl]-N-(2-hydroxy-1-méthyléthyl)acétamide ; **Met8**, 1-(1-méthoxypropane-2-yl)-7-méthyl-2,3-dihydro-1H-indole ; **Met10**, 5,9-diméthyl-1-(propan-2-yl)-1,5-dihydro-4,1-benzoxazépin-2(3H)-one ; **Met11**, 1-(1-méthoxypropane-2-yl)-5,9-diméthyl-1,5-dihydro-4,1-benzoxazépine-2(3H)-one ; **Met12** (CGA40172, 2-hydroxy-N-(2-éthyl-6-méthylphényl)-N-(2-méthoxy-1-méthyléthyl)-acétamide) ; **Met13**, 2-hydroxy-N-(2-éthyl-6-méthylphényl)-N-(2-hydroxy-1-méthyléthyl)-acétamide ; **Met14**, 2-hydroxy-N-(2-éthyl-6-hydroxyméthylphényl)-N-(2-méthoxy-1-méthyléthyl)acétamide ; **Met15**, 2-hydroxy-N-(2-méthyl-6-vinylphényl)-N-(2-méthoxy-1-méthyléthyl)acétamide ; **Met18**, 6-méthyl 2-éthyl aniline ; **Met19**, 6-méthyl 2-éthyl acétanilide.

### 3.5.3.2.3. *Enzymes potentiellement impliquées dans la biotransformation du S-métolachlore*

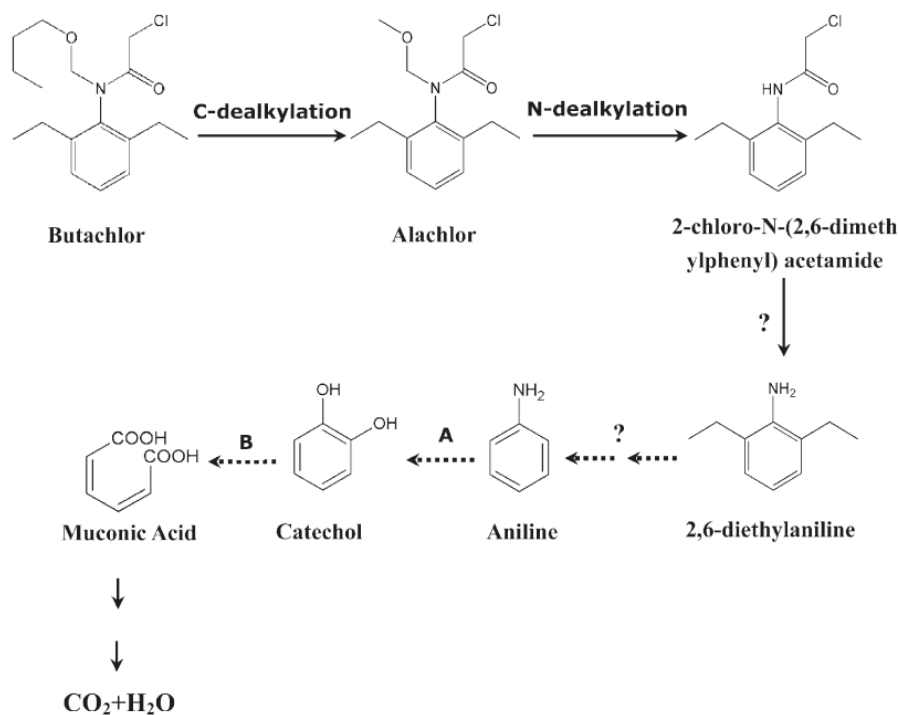
Les processus enzymatiques microbiens impliqués dans la biotransformation du S-métolachlore ne sont pas connus à ce jour. La présence du métabolite ESA dans les eaux pourrait indiquer le rôle de la glutathion S-transférase (GST, E.C. 2.5.1.18) dans la déchloration de la molécule (Morton *et al.*, 1997; Zablotowicz *et al.*, 2001).

La transformation du métolachlore par l'extrait protéique intracellulaire total de *A. flavus*, menant à la formation de **Met2**, **Met19** et **Met18** par la succession de réactions de N-désalkylation, déchloration et clivage de liaison amide, ainsi qu'à **Met12** par déchloration, pourrait également suggérer la nature intracellulaire des enzymes responsables de ces biotransformations (Sanyal and Kulshrestha, 2004). Les substituants alkyles ainsi clivés pourraient entrer dans le métabolisme central de la cellule, mais cette hypothèse n'a pas été vérifiée à ce jour.

Un indice sur la nature des enzymes impliquées dans la biotransformation du métolachlore peut venir du butachlore, transformé par la souche *Paracoccus* sp. FLY-8 enalachlore, un autre chloroacétanilide ayant une structure relativement proche du métolachlore (Zhang *et al.*, 2011b) (Figure 26). La dégradation de l'alachlore débute, comme dans certains cas pour le métolachlore, par une N-désalkylation, suivie d'un clivage de la liaison amide, produisant la



2,6-diéthylaniline. Après perte des groupements éthyles, l'aniline peut ensuite être transformée successivement en catéchol (par une aniline dioxygénase), et en acide muconique (par une catéchol 1,2-dioxygénase), qui rentre ensuite dans le métabolisme central de la cellule (Zhang *et al.*, 2011b) (Figure 26). Des mécanismes similaires peuvent être envisagés pour le *S*-métolachlore, mais là encore, rien n'a été décrit jusqu'à présent.



**Figure 26.** Voie métabolique proposée du butachlore par la souche *Paracoccus* sp. FLY-8. A, aniline dioxygénase ; B, catéchol 1,2-dioxygénase (Zhang *et al.*, 2011b).

### 3.6. Impact environnemental et toxicité

Les pesticides chiraux, dont le métolachlore, font partie des nombreuses molécules utilisées de nos jours en agriculture. D'un point de vue agronomique, l'intérêt de ces molécules est de n'épandre au champ que l'énantiomère ayant l'effet souhaité. C'est ce qui a mené à la réduction des doses agronomiques du métolachlore suite au « *chiral switch* » et à l'enrichissement en isomères *S* de cette molécule. Cependant, d'un point de vue environnemental, la réduction des doses n'est pas nécessairement synonyme de réduction des risques, puisque les formes ayant une activité herbicide plus grande peuvent de ce fait présenter également un impact plus important sur un certain nombre d'espèces non cibles (Ye *et al.*, 2010). La fréquence de détection et les concentrations en métolachlore dans les eaux étant relativement élevées, ce composé fait partie des pesticides pour lesquels davantage

d'études de risques sont nécessaires (Hull *et al.*, 2015). Des valeurs seuils d'écotoxicité peuvent ainsi être obtenues en analysant la distribution de sensibilité des espèces (*Species Sensitivity Distribution*, SSD). Cette technique a été utilisée pour déterminer l'impact du métolachlore sur les écosystèmes d'eau douce tropicaux et a révélé un faible nombre d'espèces potentiellement impactées par cette molécule dans les cours d'eau étudiés, sans exclure pour autant un risque potentiel associé aux mélanges de pesticides (Pathiratne and Kroon, 2016).

### 3.6.1. Impact sur les microorganismes

#### 3.6.1.1. Milieu aquatique

La présence de métolachlore, puis de *S*-métolachlore, dans de nombreux cours d'eau a incité à rechercher un éventuel impact de cette molécule sur les microorganismes vivants dans ces milieux. Une approche *in situ* a permis de mettre en évidence une baisse de la respiration des communautés exposées à de fortes concentrations de métolachlore ( $274 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Day, 1993). Le risque potentiel de cette molécule, aux concentrations environnementales, pour 11 espèces aquatiques non cibles d'algues, de cyanobactéries et de plantes aquatiques a été déterminé comme étant faible à modéré (Peterson *et al.*, 1994). En revanche, un impact du *S*-métolachlore a pu être observé *in situ* sur la concentration en chlorophylle et la viabilité de diatomées exposées à des concentrations allant de 5 à  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ , avec des sensibilités variables selon les espèces (Debenest *et al.*, 2009). Des effets ont également été mis en évidence sur les flux de phosphore (stimulation) et d'azote (inhibition) contrôlés principalement par des activités microbiennes au niveau des sédiments d'eau douce (Elias and Bernot, 2014).

#### 3.6.1.2. Milieu terrestre

##### 3.6.1.2.1. Impact sur l'abondance des microorganismes

Une seule étude s'est intéressée à l'impact du *S*-métolachlore sur l'abondance des microorganismes édaphiques. Ces travaux ont mis en évidence que le *S*-métolachlore formulé (Dual Gold Safeneur<sup>®</sup>,  $960 \text{ g L}^{-1}$  de *S*-métolachlore), appliqué à la dose agronomique,

diminuait l'abondance des microorganismes phototrophes de deux sols différents, en termes de pH et de teneurs en matière organique et argiles, sans qu'aucun signe de résilience n'ait pu être observé durant les 3 mois de suivi de l'expérience (Joly *et al.*, 2014).

#### 3.6.1.2.2. *Impact sur l'activité des microorganismes*

L'exposition des communautés microbiennes du sol à des concentrations de substance active relativement élevées par rapport à la dose agronomique recommandée peut engendrer une inhibition transitoire de la fixation de l'azote (400-500  $\mu\text{g s.a. g}^{-1}$  de sol) (Martinez-Toledo and Gonzalez-Lopez, 1989), une inhibition de l'oxydation de l'ammonium (5-100  $\mu\text{g s.a. kg}^{-1}$  de sol) (Saltzman and Brates, 1990) et des activités phosphatase et uréase ( $> 10 \mu\text{g s.a. kg}^{-1}$  de sol) (Ismail *et al.*, 1996), catalase (5-100  $\mu\text{g s.a. kg}^{-1}$  de sol) (Zhou *et al.*, 2005), cellulolytique (Sahid and Yap, 1994) ainsi que de la respiration, avec des réponses quantitativement différentes pour le métolachlore et le *S*-métolachlore formulé (Dual Gold<sup>®</sup>) (Zhou *et al.*, 2006). Dans d'autres cas, le métolachlore n'a pas montré d'effet significatif sur les flux de CO<sub>2</sub>, de N<sub>2</sub>O et de CH<sub>4</sub> dans le sol (Kinney *et al.*, 2004).

Après exposition des communautés microbiennes à la dose agronomique recommandée de *S*-métolachlore, une inhibition transitoire de certaines activités du sol telles que la nitrification, l'oxydation du soufre et l'activité phosphatase (Tu, 1992) ou une stimulation de l'activité déshydrogénase (Fernandez *et al.*, 2009) a été observée. Un effet transitoire, caractérisé par une stimulation de l'ammonification et une inhibition de la nitrification dans le sol, a également été mis en évidence après application du *S*-métolachlore en mélange avec la mésotrione et le nicosulfuron, mais le rôle de chacune de ces molécules n'a pas été élucidé (Joly *et al.*, 2015).

#### 3.6.1.2.3. *Impact sur la structure des communautés microbiennes*

Une baisse de la diversité bactérienne et des modifications de structure des communautés phototrophes ont été mises en évidence dans des microcosmes de sol traités avec la formulation commerciale du *S*-métolachlore (Dual Gold Safeneur<sup>®</sup>) appliquée à la dose agronomique recommandée (Joly *et al.*, 2012, 2014). Cependant, aucun effet significatif n'a été observé sur la structure des communautés microbiennes associées à la rhizosphère de maïs

suite à l'application du double traitement composé de mésotrione et de *S*-métolachlore (Valverde *et al.*, 2014).

Les résultats des études d'impacts *in situ* du métolachlore sur les microorganismes sont relativement différents selon le type de sol, les communautés microbiennes considérées, et la molécule en elle-même (molécule pure / formulation et *rac*-métolachlore / *S*-métolachlore). L'étude de l'impact de cette molécule sur des microorganismes isolés peut donc contribuer à identifier les mécanismes à l'origine de cette grande variabilité de réponses, et à déterminer plus finement le risque potentiel de son utilisation pour les communautés microbiennes et les fonctions qu'elles assurent au sein des écosystèmes.

#### 3.6.1.3. Impact sur souches isolées – Bio-essais

L'exposition des souches bactériennes *Enterobacter asburiae* SD1, *Enterobacter amnigenus* KD et *Enterobacter amnigenus* K9, isolées à partir de sol, à 9,6 mg s.a. L<sup>-1</sup> de métolachlore engendre une diminution de la peroxydation des lipides chez les souches SD1 et KD (signe de leur adaptation à une augmentation en espèces réactives de l'oxygène) et une augmentation de l'activité catalase totale (Martins *et al.*, 2011). Deux glutathion réductases de la souche SD1 sont surexprimées en présence de métolachlore, et pourraient être impliquées dans les mécanismes de tolérance mis en place par les bactéries exposées à cette molécule, tels que le contrôle de la production d'espèces réactives de l'oxygène. Il a également été montré que le métolachlore pouvait inhiber la croissance et la respiration de la bactérie *Bacillus stearothermophilus* à de fortes concentrations (113,5 et 141,9 mg L<sup>-1</sup>) (Pereira *et al.*, 2009).

Les résultats d'études d'impact du métolachlore sur des bactéries fixatrices d'azotes sont contrastés, avec un effet transitoire sur l'activité nitrogénase de *Azospirillum brasilense* (Salmeron *et al.*, 1991) ou un effet sur la production de lysine par *Azotobacter chroococcum* (Gonzalez-Lopez *et al.*, 1999) pour de fortes concentrations de métolachlore (100-500 mg s.a. L<sup>-1</sup>). Cependant, le métolachlore et le *S*-métolachlore n'ont aucun effet sur la croissance de *Azospirillum brasilense* (Salmeron *et al.*, 1991; Procopio *et al.*, 2011).

Au contraire, le métolachlore peut affecter la croissance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (144-360 mg s.a. L<sup>-1</sup>) (Echeverrigaray *et al.*, 1999) ou de champignons entomopathogènes (dose agronomique) (Poprawski and Majchrowicz, 1995).

La sensibilité des microalgues vis-à-vis du *S*-métolachlore est, quant à elle, variable en fonction des espèces (Juneau *et al.*, 2001; Larras *et al.*, 2012, 2013) et peut être augmentée en cas de pré-exposition à cette molécule (Copin *et al.*, 2016). Le *S*-métolachlore peut engendrer une inhibition de leur taux de croissance ou de leur concentration en chlorophylle (Vallotton *et al.*, 2008; Ebenezer and Ki, 2013; Thakkar *et al.*, 2013). Les métabolites OXA et ESA produits après transformation du *S*-métolachlore dans le sol ont également été suspectés de présenter une toxicité pour la microalgue *Pseudokirchneriella subcapitata* (Viegas *et al.*, 2012). Certaines microalgues marines sont, au contraire, résistantes au métolachlore (Robert *et al.*, 2007), et les métabolites ESA et OXA n'ont pas montré de toxicité vis-à-vis de la microalgue *Nitzschia nana*, contrairement à la molécule mère (Roubeix *et al.*, 2011).

Plusieurs études ont évalué la toxicité du métolachlore à l'aide du test standardisé Microtox<sup>®</sup>. La toxicité du métolachlore dans l'eau de rivière uniquement ( $EC_{50} = 24,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) est 30 fois supérieure à celle observée en présence de sédiments, probablement en raison d'une biodisponibilité moins élevée de la molécule due à la présence de matière organique et d'argiles (Karuppiah *et al.*, 1997). La toxicité du métolachlore est également réduite ou augmentée au cours de sa photo-transformation dans différentes eaux de surface (rivière, lac, mer) (Lin *et al.*, 1999; Dimou *et al.*, 2005), ce qui peut s'expliquer par la production de photo-produits plus ou moins toxiques que la molécule mère. La détermination quantitative de la relation structure-activité (*Quantitative Structure Activity Relationship*, QSAR) prédit d'ailleurs une toxicité supérieure de la majorité des photo-produits du *S*-métolachlore par rapport à la molécule mère (Gutowski *et al.*, 2015), ce qui a été confirmé expérimentalement à l'aide du test Microtox<sup>®</sup> pour le métabolite **Met18** (2-éthyl-6-méthylaniline) avec une  $CE_{50}$  de  $119,7 \text{ } \mu\text{M}$  en comparaison de la  $CE_{50}$  du métolachlore de  $757,6 \text{ } \mu\text{M}$  (Osano *et al.*, 2002a).

Enfin, il a été mis en évidence une toxicité énantiosélective du métolachlore, avec une toxicité 2 fois supérieure du *S*-métolachlore par rapport à celle du *rac*-métolachlore pour les microalgues *Chlorella pyrenoidosa* (Liu and Xiong, 2009), *Scenedesmus obliquus* (Liu *et al.*, 2012) et *Chlorella vulgaris* (Cai *et al.*, 2012), et une plus forte interaction du *S*-métolachlore avec la phosphatase de *Penicillium expansum* par rapport au métolachlore (Wen *et al.*, 2010).

### 3.6.2. Impact sur des organismes supérieurs

Certaines études se sont intéressées à la toxicité du *S*-métolachlore pour les invertébrés aquatiques et terrestres. Ainsi, l'exposition de l'écrevisse *Orconectes rusticus* à des doses environnementales de métolachlore (25-75 µg s.a. L<sup>-1</sup>) peut engendrer des perturbations de sa perception de signaux olfactifs (Wolf and Moore, 2002; Cook and Moore, 2008). Le *S*-métolachlore et sa formulation commerciale (Primextra® Gold TZ, 312,5 g L<sup>-1</sup> de *S*-métolachlore) peuvent aussi impacter la survie et la reproduction de *Daphnia longispina*, avec une toxicité supérieure de la formulation par rapport à la substance active en exposition chronique (Neves *et al.*, 2015). Le *S*-métolachlore pur présente également une embryotoxicité et une génotoxicité pour les larves de l'huitre du Pacifique à des doses environnementales (0,1 µg L<sup>-1</sup>) (Mai *et al.*, 2012) inférieures aux concentrations de ses principaux métabolites, OXA (0,1 µg L<sup>-1</sup>) et ESA (1 µg L<sup>-1</sup>), induisant un effet (Mai *et al.*, 2014).

Un autre exemple d'énantiosélectivité vient de la toxicité aiguë du *S*-métolachlore pour *Daphnia magna*, qui est supérieure à celle du *rac*-métolachlore (DL<sub>50</sub> = 51,2 et 69,4 mg L<sup>-1</sup>, respectivement), tandis que la toxicité chronique est supérieure dans le cas du mélange racémique par rapport à l'énantiomère actif (Liu *et al.*, 2006). Ce dernier point est également vérifié dans le cas de la toxicité aiguë pour les larves de ver à soie *Bombyx mori* L. (Zhan *et al.*, 2006) et pour le ver de terre *Eisenia foetida* (Xu *et al.*, 2010), avec des modifications plus importantes de plusieurs activités enzymatiques (c.-à-d. cellulase et catalase) en présence de *rac*-métolachlore par rapport au *S*-métolachlore. Enfin, contrairement à ce qui a été observé avec le test Microtox®, il a été mis en évidence une toxicité supérieure du métolachlore par rapport à son métabolite **Met18** (2-éthyl-6-méthylaniline) pour les larves de l'insecte *Chironomus riparius* (Osano *et al.*, 2002a).

Concernant les amphibiens, une étude a mis en évidence une moins grande embryotoxicité du métabolite **Met18** que la molécule mère, mais une plus grande tératogénicité pour les embryons de la grenouille *Xenopus laevis* (Osano *et al.*, 2002b).

Il a également été montré une forte toxicité du métolachlore pour la petite lentille d'eau *Lemna minor* (Fairchild *et al.*, 1997).

Chez les mammifères, le *S*-métolachlore est rapidement excrété par les urines et les fèces, ou métabolisé soit par conjugaison (intervention de la GST), soit par des réactions d'oxydation (EFSA, 2004). Cependant, une différence de toxicité peut être observée selon le sexe, la DL<sub>50</sub> (orale) pour le rat étant de 3267 (mâle) et 2577 mg kg<sup>-1</sup> (femelle). Le

métabolisme du métolachlore au niveau des microsomes hépatiques chez l'Homme et le rat est caractérisé par l'intervention successive de 3 enzymes : un cytochrome P450 (métolachlore transformé en métabolite **Met2**), une arylamidase (**Met2** transformé en **Met18**) et de nouveau un cytochrome P450 (*para*-hydroxylation de **Met18**) (Coleman *et al.*, 2000). Des études *in vitro* ont montré l'induction de l'activité de CYP2B1/2 hépatique (Dalton *et al.*, 2003) et l'inhibition de la respiration mitochondriale (Pereira *et al.*, 2009) chez le rat, ainsi que l'augmentation de l'apoptose chez les embryons de souris exposés à de faibles doses de métolachlore (Greenlee *et al.*, 2004). L'exposition au *S*-métolachlore peut également induire des changements dans l'équilibre hormonal de la reproduction chez le rat (Mathias *et al.*, 2012). Il faut aussi noter une toxicité supérieure, par rapport à la molécule mère, de la plupart des photo-produits du *S*-métolachlore pour le rat, comme l'indique une approche QSAR (Nicol *et al.*, 2015).

De plus, le *S*-métolachlore présente une affinité plus élevée que celle du *rac*-métolachlore pour certaines protéines, comme la BSA (Bovine Serum Albumine), et reconnaît des sites de fixation différents, indiquant là aussi une énantiosélectivité (Ni *et al.*, 2012).

#### Conclusions :

Bien que l'utilisation du *S*-métolachlore à la place du *rac*-métolachlore ait permis de réduire les doses appliquées au champ, cela ne s'accompagne pas nécessairement d'une baisse de l'impact potentiel de cet herbicide dans l'environnement. En effet, certaines études ont fait état de la plus grande toxicité de l'énantiomère actif par rapport au mélange racémique (notamment pour les microalgues) tandis que l'effet inverse est observé pour d'autres organismes (ex. ver de terre). Il n'est donc pas possible de faire une conclusion générale sur le « *chiral switch* » en termes d'impact environnemental puisque les effets sont variables selon les organismes.

Il faut également noter la très grande diversité de métabolites décrits pour le métolachlore, sans compter la possible variabilité supplémentaire issue de la chiralité de la molécule. Il n'est donc pas évident d'en évaluer précisément le devenir et l'impact.

## **Partie II. Objectifs de l'étude et hypothèses**





D'une manière générale, plusieurs manques scientifiques peuvent être mis en évidence après analyse de la bibliographie sur les mélanges de pesticides.

1. D'une part, il faut noter la très grande diversité des effets des mélanges de pesticides, que ce soit sur le comportement, la mobilité, la photo- et bio-dégradation/transformation de chacune des molécules du mélange individuellement. La majorité des études citées a été réalisée dans le sol, et il y a très peu d'informations disponibles quant à la nature des processus qui permettent à une substance active d'influencer la mobilité, la persistance et la biodisponibilité d'une autre substance active.
2. D'autre part, le manque d'informations sur le devenir et l'impact des produits de transformation des pesticides dans l'environnement est flagrant. La prise en compte des produits de transformation dans les études des effets de mélanges de pesticides est cependant nécessaire pour évaluer au mieux le risque environnemental global de leur utilisation.
3. Les données sur les molécules en mélange doivent donc également être complétées par la caractérisation des voies de dégradation de chaque pesticide, d'abord seul puis en mélange, incluant l'identification des métabolites produits ou des enzymes impliquées dans la formation de ces produits de transformation.
4. Enfin, il est devenu nécessaire de s'intéresser, non plus à la toxicité de chacune des molécules considérée individuellement, comme cela a longtemps été le cas, mais à l'impact des mélanges de substances actives, des mélanges de métabolites, et des mélanges de substances actives et de métabolites sur les organismes vivants. Ces données permettront de déterminer les interactions potentielles qui peuvent exister entre les différentes molécules et d'améliorer l'évaluation du risque environnemental.

Ainsi, fort de ce constat, mes travaux de thèse ont consisté à étudier, en conditions de laboratoire, le devenir d'un mélange d'herbicides utilisés sur les cultures de maïs et faisant partie des molécules les plus fréquemment détectées dans les eaux : la mésotrione, le nicosulfuron et le *S*-métolachlore et à caractériser leurs voies de biodégradation. Ces molécules sont utilisées en épandage séquentiel, le *S*-métolachlore étant employé préférentiellement en pré-émergence du maïs, alors que la mésotrione et le nicosulfuron sont employés environ 15 jours plus tard, préférentiellement en post-émergence. Elles remplacent l'atrazine, interdite depuis 2003 dans l'Union Européenne et depuis 2012 en Suisse (l'usage de l'atrazine est cependant encore autorisé dans de nombreux autres pays dont les Etats-Unis).

Pour mener à bien mon projet, j'ai tout d'abord orienté mes recherches sur l'isolement de souches / consortia microbiens capables de dégrader les trois herbicides du mélange (**objectif 1**). Pour ce faire, différentes techniques d'enrichissement ont été mises en place (colonne de sol et milieu liquide).

Les souches isolées ont ensuite été étudiées pour caractériser les voies de biotransformation des molécules étudiées, qu'elles soient seules ou en mélange (**objectif 2**). Pour atteindre cet objectif, une approche chimique, consistant à identifier et caractériser l'ensemble des métabolites produits par différentes techniques analytiques (MS et RMN), et une approche biologique, consistant à identifier les enzymes impliquées dans ces transformations, ont été menées en parallèle.

Pour chacune des molécules mères et des produits de transformation identifiés (et commercialisés), seuls ou en mélange, j'ai ensuite mené des tests de mesure de toxicité à l'aide d'un bio-essai standardisé (Microtox<sup>®</sup>) (**objectif 3**).

Comme le montrent les données de la littérature, les techniques d'épandage de pesticides actuellement utilisées en agriculture mènent à une pollution plus ou moins importante des sols et des écosystèmes avoisinants. Dans ce contexte, il m'est donc apparu important de m'interroger sur la nécessité de développer de nouvelles pratiques agricoles permettant de limiter ces pollutions. Ainsi, j'ai développé et mis en place une technique innovante de bioremédiation préventive (**objectif 4**). Cette approche a été réalisée en microcosmes de sol.

Ces différents objectifs ont été ciblés pour compléter ou apporter des éléments de réponse aux données de la littérature et essayer de répondre à plusieurs questionnements ayant pour trame de fond l'amélioration de l'évaluation du risque environnemental lié à l'utilisation de pesticides en mélange :

- Quel peut être l'impact d'un pesticide (dans notre cas, la mésotrione, le nicosulfuron et le S-métolachlore) sur le comportement d'un autre pesticide épandu simultanément ou de manière séquentielle ?
- Quels sont les métabolites produits après transformation d'une molécule donnée et sont-ils quantitativement et qualitativement les mêmes en présence d'autres molécules ? Sont-ils produits avec une cinétique similaire ?
- Pouvons-nous limiter les études de toxicité à la seule mesure de la toxicité des molécules mères et de seulement quelques-uns de leurs métabolites, analysés individuellement, pour évaluer le risque (éco)toxicologique ?

L'ensemble de mes travaux de thèse menés pour répondre à ces objectifs est présenté dans la partie suivante. Ils sont organisés sous forme de chapitres, correspondant selon les cas, à des résultats non publiés, des articles en préparation, soumis ou acceptés.



## **Partie III. Résultats et discussion**



# Chapitre 1. Isolement de souches capables de dégrader la mésotrione et/ou le nicosulfuron et/ou le S-métolachlore

A mon arrivée au laboratoire, la souche *Bacillus megaterium* Mes11 capable de transformer la mésotrione (Batisson *et al.*, 2009) avait déjà été isolée. En revanche, nous ne disposons pas de souches capables de dégrader les autres molécules du mélange étudié. Nous avons alors réalisé des cultures d'enrichissement, afin d'obtenir des souches capables de dégrader le nicosulfuron et le S-métolachlore, voire d'isoler de nouvelles souches capables de dégrader la mésotrione.

## **1. Cultures d'enrichissement à l'aide de la méthode de perfusion en colonne sol-charbon**

### **1.1. Introduction**

La méthode de perfusion en colonne sol-charbon (*soil-charcoal perfusion method*) a été décrite pour la première fois en 1946 (Audus, 1946) et utilisée depuis pour l'isolement de microorganismes capables de dégrader les herbicides simazine (Iwasaki *et al.*, 2007) et simétryne (Fujii *et al.*, 2007), l'hexachlorobenzène (Takagi *et al.*, 2009) et la mélamine (Takagi *et al.*, 2012). Le principe consiste à faire percoler une solution contenant le composé à dégrader au travers d'une colonne de sol dans lequel ont été ajoutées des billes de charbon ; le composé à dégrader s'adsorbe sur les billes de charbon, créant ainsi, en théorie, un microenvironnement favorable pour la colonisation par des microorganismes capables de tolérer et/ou dégrader le composé adsorbé. Les billes de charbon sont ensuite extraites du sol et mises en culture d'enrichissement afin de faciliter l'isolement de souches dégradantes.

J'ai donc choisi d'utiliser cette technique au cours de mes travaux de thèse dans le but d'isoler des microorganismes capables de dégrader un ou plusieurs herbicides du mélange étudié. Afin d'augmenter les chances d'y parvenir, le sol à partir duquel les enrichissements ont été réalisés a été prélevé dans une parcelle agricole (culture de maïs) préalablement traitée avec les trois herbicides étudiés, la pré-exposition des communautés microbiennes à ce



mélange augmentant ainsi la probabilité d'y retrouver des microorganismes capables de dégrader chacune des molécules.

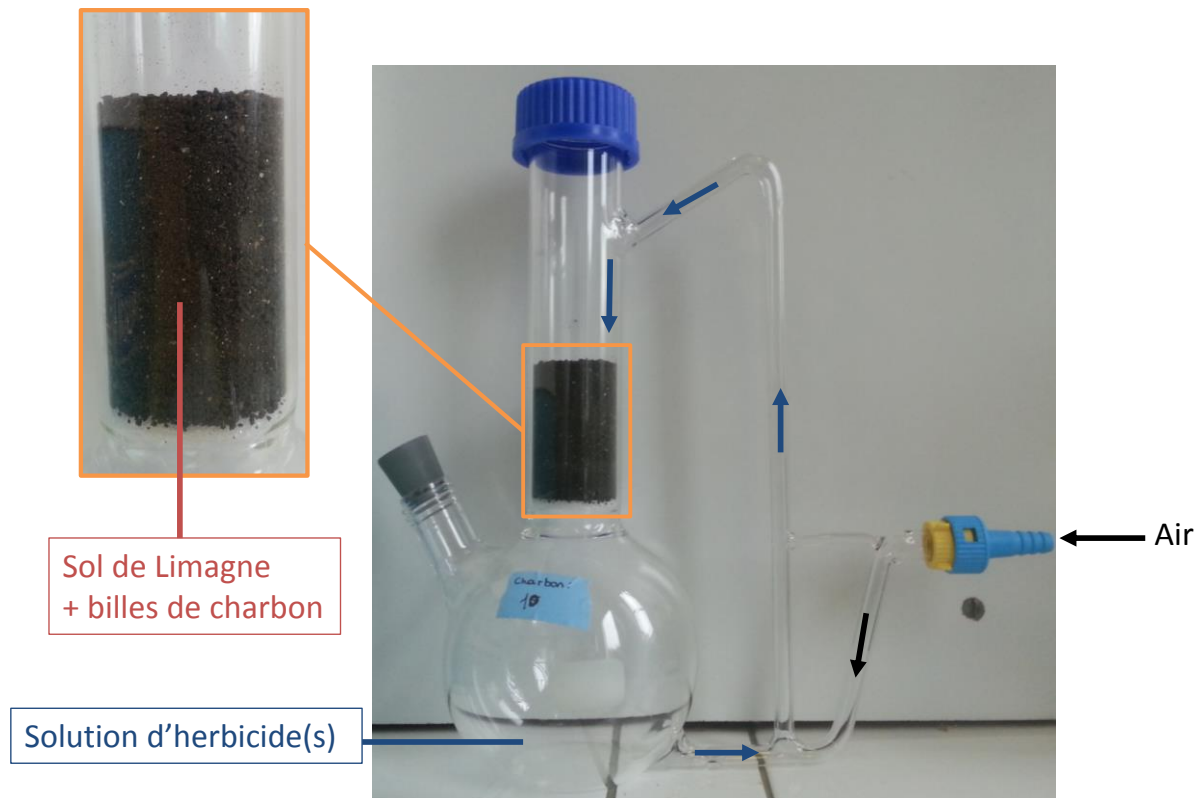
## 1.2. Matériel et méthodes

### 1.2.1. Produits chimiques et milieux de cultures

Le nicosulfuron (Pestanal, pureté 99,6%), la mésotrione (Pestanal, pureté 99,9%) et le *S*-métolachlore (Pestanal, pureté 98,4%) ont été achetés chez Sigma Aldrich (France). Le milieu minimum (MM, pH 7) était composé pour 1 L de : 1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g KNO<sub>3</sub>, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g NaCl, 20 mg CaCl<sub>2</sub>, 5 mg FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1 mL d'une solution stock d'oligo-éléments et 1 mL d'une solution stock de vitamines. La solution stock d'oligoéléments contenait pour 1 L : 20 g acide borique, 18 g MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 2 g ZnSO<sub>4</sub>, 1 g CuSO<sub>4</sub>, 2,5 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> et 10 mg Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. La solution stock de vitamines contenait pour 1 L : 2 mg de biotine et 5 mg de thiamine-HCl. Le MM gélosé a été préparé en ajoutant 1,5% (m/v) d'agar au milieu liquide.

### 1.2.2. Méthode de perfusion en colonne sol-charbon

Le sol a été prélevé à la surface (0-5 cm) d'un champ agricole de la plaine de Limagne (Puy-de-Dôme, France) dédié à la culture de maïs et préalablement traité avec les trois herbicides (mésotrione, nicosulfuron, *S*-métolachlore) à la dose agronomique. Le sol a été séché à l'air, homogénéisé et tamisé ( $\varnothing = 2$  mm). Deux grammes de charbon A100 (taille des billes 5-10 mm, surface spécifique 100 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, pH 7,8) ont été mélangés à 75 grammes de sol et l'ensemble a été placé dans chaque dispositif en verre, gracieusement prêté par Fabrice Martin-Laurent (INRA, Dijon, France) (Figure 27). La première étape d'enrichissement a été réalisée avec 300 mL de MM additionné ou non (témoin sans herbicide) de 25 mg L<sup>-1</sup> de mésotrione, nicosulfuron ou *S*-métolachlore, soit seuls ou en mélange ternaire (5 conditions). Les solutions étaient continuellement recircularisées *via* un flux d'air et ont été incubées à 18°C à l'obscurité. Les prélèvements ont été effectués aux jours 0 ; 5 ; 12 ; 13 ; 19 ; 28 ; 40 et 47. Les solutions ont été renouvelées au bout de 12 et 28 jours.



**Figure 27.** Dispositif expérimental de perfusion en colonne sol-charbon utilisé dans cette étude. Le flux d'air (→) entraîne une recirculation de la solution d'herbicide(s) (→) et son passage en continu au travers de la colonne de sol.

### 1.2.3. Culture d'enrichissement dite « classique »

Après 55 jours d'incubation, le sol (10% poids sec) et les billes de charbon de chaque dispositif ont été placés séparément dans des erlenmeyers de 1 L contenant chacun 450 mL de MM additionné des herbicides souhaités (5 conditions « sol », 5 conditions « charbon » et 5 conditions « abiotique » correspondant aux solutions stériles d'herbicides). Les cultures ont été incubées sous agitation (150 rpm) à 18°C et à l'obscurité. Des repiquages successifs des cultures à 5% (v/v) ont ensuite été réalisés au bout de 24 et 48 jours dans des solutions d'herbicides à 25 mg L<sup>-1</sup>. Des étalements sur milieu gélosé additionné des herbicides correspondants ont été réalisés avant chaque repiquage : MM pour l'isolement de bactéries ; MM + chloramphénicol et milieu Sabouraud + chloramphénicol pour l'isolement de champignons. Les isolats ont ensuite été testés en milieu liquide (MM + herbicide) pour leur capacité à dégrader le ou les herbicides du milieu à partir duquel ils ont été isolés. La capacité de dégradation des microorganismes a été évaluée en croissance ou en resting cells (culot correspondant à 50 mL de culture, repris dans 10 mL de MM + herbicide après lavage avec 30 mL de NaCl 8 g L<sup>-1</sup>). Les dosages des herbicides ont été réalisés par HPLC pour les différentes étapes d'enrichissement et les tests de dégradation par les isolats.

### 1.2.4. Suivi des cinétiques de dissipation des herbicides par HPLC

Les analyses par HPLC ont été réalisées sur une chaîne Agilent 1100 munie d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD) et d'un détecteur à fluorescence, pilotée par le logiciel Chemstation. Les analyses ont été effectuées en mode gradient (linéaire) sur une colonne C-18 Zorbax Eclipse Plus (Agilent), 75 mm × 4,6 mm, 3,5 μm, thermostatée à 22°C. L'éluant est composé d'un mélange d'eau acidifiée A = H<sub>2</sub>O + 0,01 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 2,6) et d'acétonitrile (B), débit de 1 mL min<sup>-1</sup>, volume d'injection de 5 μL (Tableau 8). Les échantillons, après décongélation, sont systématiquement centrifugés à 10000 g pendant 3 min avant injection.

**Tableau 8.** Conditions d'analyse des cinétiques de biodégradation des herbicides étudiés par HPLC. (Les pourcentages indiqués correspondent au pourcentage d'acétonitrile dans l'éluant).

	Mésotrione	Nicosulfuron	S-Métolachlore	Mélange
<b>Eluant</b>	0-1 min: 2% 1-8 min: 2-70% 8-9 min: 70-100% 9-9.3 min: 100-2% 9.3-10.3 min: 2%	0-1 min: 2% 1-10 min: 2-70% 10-13 min: 70-100% 13-13.3 min: 100-2% 13.3-15 min: 2%	0-1 min: 2% 1-17 min: 2-70% 17-22 min: 70-100% 22-22.3 min: 100-2% 22.3-25 min: 2 %	0-5 min: 5% 5-30 min: 5-70% 30-32 min: 70-100% 32-33 min: 100-5% 33-35 min : 2%
<b>λ (DAD)</b>	254 nm	254 nm	220 nm	220 nm 254 nm
<b>λ<sub>ex</sub> et λ<sub>em</sub> (FLD)</b>	λ <sub>ex</sub> = 220 nm λ <sub>em</sub> = 430 nm	λ <sub>ex</sub> = 220 nm λ <sub>em</sub> = 430 nm	λ <sub>ex</sub> = 220 nm λ <sub>em</sub> = 430 nm	λ <sub>ex</sub> = 220 nm λ <sub>em</sub> = 430 nm

## 1.3. Résultats et discussion

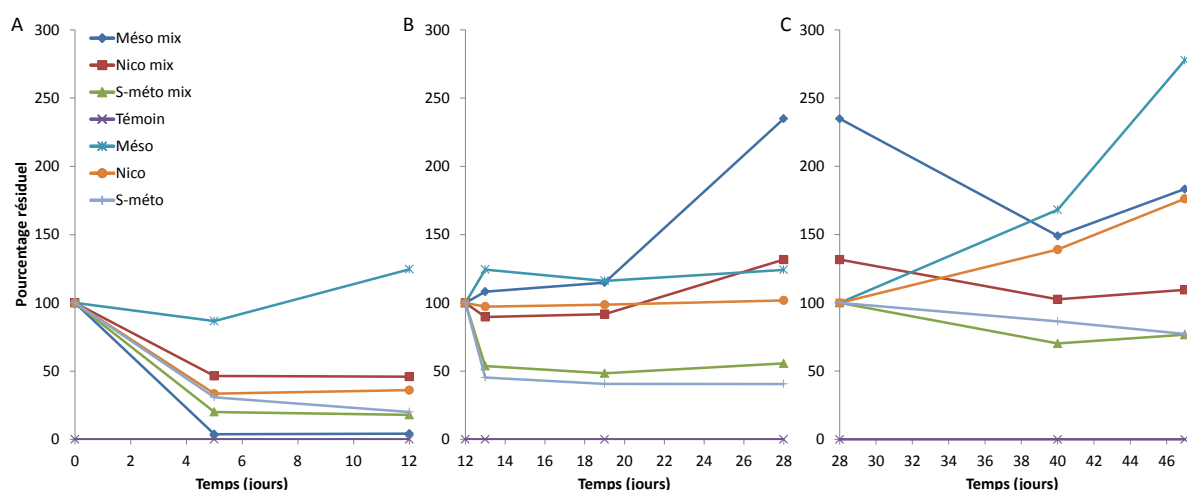
### 1.3.1. Enrichissement à l'aide du système de perfusion sol-charbon

Une dissipation importante (> 50%) des trois herbicides, seuls ou en mélange, a été observée durant la première étape d'enrichissement, mis à part pour la mésotrione seule (Figure 28A). La présence des deux autres molécules (nicosulfuron et S-métolachlore) semble donc favoriser la dissipation de la mésotrione. Cependant, aucun produit de transformation n'a pu être mis en évidence, suggérant que la dissipation observée pour chaque molécule était probablement due à leur adsorption sur les particules de sol et/ou sur les billes de charbon.

Suite au premier renouvellement des solutions à t 12 j (Figure 28B), la dissipation n'a plus été observée que pour le *S*-métolachlore, qu'il soit seul ou en mélange (environ 50% après 13 j d'incubation). Cette tendance a également été confirmée après le deuxième renouvellement des solutions, avec environ 25 % de dissipation de cette molécule, quelle que soit sa condition d'incubation (Figure 28C).

Des valeurs anormales de pourcentages résiduels (supérieures à celles attendues théoriquement) ont par ailleurs pu être observées, notamment dans le cas de la mésotrione, pouvant s'expliquer par l'évaporation d'une partie de l'eau au cours de la recircularisation, entraînant ainsi la concentration des herbicides dans les solutions.

Malgré ces résultats en demi-teinte, des cultures d'enrichissement dites « classiques » (en milieu liquide) ont été réalisées, d'une part, à partir du sol et, d'autre part, à partir des billes de charbon extraites du sol.



**Figure 28.** Evolution du pourcentage résiduel de mésotrione (Mésotri), nicosulfuron (Nico) et *S*-métolachlore (*S*-méto), seuls ou en mélange (mix) dans la solution du système de perfusion sol-charbon. Pourcentage résiduel par rapport à la concentration initiale dans la solution à t = 0 (A) ou immédiatement après le renouvellement des solutions à t = 12 j (B) et à t = 28 j (C). Concentration nominale initiale : 25 mg L<sup>-1</sup>. Renouvellement de toutes les solutions à t = 12 jours et des solutions des conditions mix et *S*-métolachlore seul à t = 28j.

### 1.3.2. Enrichissement en milieu liquide

Des pourcentages variables de dissipation ont été observés au cours des repiquages successifs pour les trois molécules étudiées (Tableau 9). Cependant, d'une manière générale, ces taux de dissipation n'ont pas dépassé 20-25%, et étaient légèrement supérieurs dans les milieux ensemencés avec les billes de charbon. Les taux de dissipation les plus forts ont été observés avec le *S*-métolachlore (seul ou en mélange) et le nicosulfuron seul. Cependant, ces

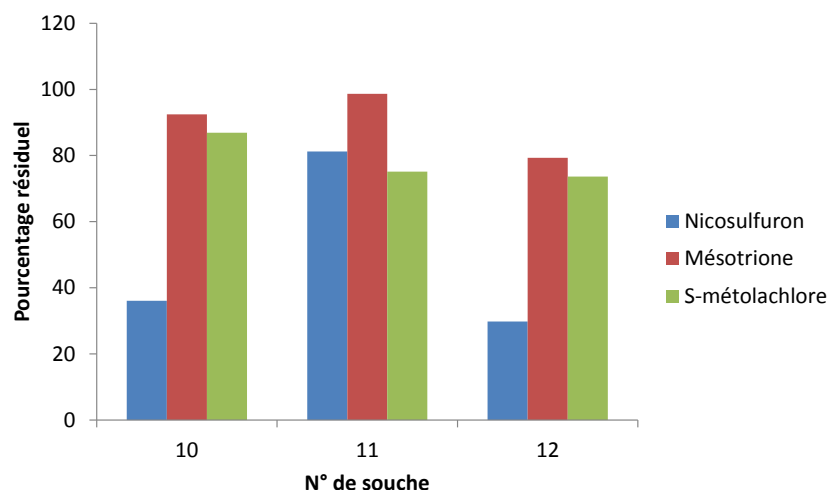
taux de dissipation étant relativement faibles, nous n'avons pas envisagé de procéder à des repiquages dans un milieu avec une concentration en herbicide plus élevée. Des tentatives d'isolement de souches dégradantes ont tout de même été réalisées à partir des milieux ensemencés avec le sol ou le charbon.

**Tableau 9.** Evolution du pourcentage résiduel de mésotrione (Méso), nicosulfuron (Nico) et S-métolachlore (S-méto), seuls ou en mélange (mix), dans les cultures d'enrichissement ensemencées avec le sol ou les billes de charbon. Concentration nominale initiale : 25 mg L<sup>-1</sup> (T0 = 100). Repiquages N° 1 (R1) et 2 (R2) après 24 et 48 jours, respectivement.

		T = 24 j		T = 21 j après R1		T = 10 j après R2	
		Sol	Charbon	Sol	Charbon	Sol	Charbon
Mix	Méso	108,1	82,3	99,8	91,1	152,7	113,2
	Nico	106,5	82,7	107,0	94,4	139,9	103,9
	S-méto	85,5	77,0	84,3	81,1	103,3	101,0
Molécules seules	Méso	111,2	107,9	113,8	95,5	98,3	79,6
	Nico	120,5	106,9	81,9	74,4	93,2	86,6
	S-méto	76,8	85,1	83,0	79,1	117,8	81,3

### 1.3.3. Isolements et tests de biodégradation

Des étalements sur milieu gélosé ont été réalisés à chaque étape de l'enrichissement, et les colonies isolées ont été purifiées et testées pour leurs activités de biodégradation en milieu liquide. Aucun des isolats bactériens testé n'a montré de capacité à dissiper les herbicides étudiés. En revanche, en condition de resting cells, 3 souches fongiques pures ont permis de dissiper une partie de la mésotrione, du nicosulfuron et du S-métolachlore (Figure 29). Cette capacité de dissipation n'a cependant pas été conservée au fil des repiquages des souches isolées, ne permettant pas d'investiguer davantage ce potentiel de biotransformation.



**Figure 29.** Pourcentage résiduel de nicosulfuron, méso-trione et S-métolachlore dans l'eau de Volvic® additionnée de 25 mg L<sup>-1</sup> de chaque molécule, après 13 j d'incubation en présence de souches fongiques (resting cells) isolées à partir du repiquage N°2 (25 mg L<sup>-1</sup>) de l'enrichissement en milieu liquide.

#### 1.4. Conclusions

Malgré l'utilisation d'une technique d'enrichissement originale (*soil-charcoal perfusion method*), il ne nous a pas été possible d'obtenir de souches pures de microorganismes capables de dégrader une ou plusieurs molécules du mélange d'herbicides étudié. Nous avons donc abandonné cette stratégie au profit d'une approche de culture d'enrichissement moins drastique, réalisée en présence d'une source de carbone facilement assimilable en complément des molécules herbicides. En effet, certaines souches ne sont capables de transformer les pesticides que par un processus de co-métabolisme, comme c'est le cas pour toutes les souches capables de transformer le nicosulfuron (Lu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2015a; Wang *et al.*, 2016b) et le S-métolachlore (Martins *et al.*, 2007) décrites jusqu'à présent.

## 2. Cultures d'enrichissement par la méthode dite « classique »

Nous avons donc réalisé dans un second temps, toujours à partir d'un sol agricole de Limagne, des cultures d'enrichissements « classiques » et des isolements en milieu minimum (cf. Partie III, Chapitre 1, 1.2.1) avec ou sans glucose, et en présence de nicosulfuron ou de S-métolachlore (les deux molécules pour lesquelles nous ne disposons pas de souches dégradantes). Aucune des souches testées n'a montré d'activité de transformation du S-métolachlore. En revanche, ces enrichissements ont permis d'isoler la souche *Pseudomonas*

*fluorescens* SG-1 capable de transformer le nicosulfuron par co-métabolisme (cf. Partie III, Chapitre 2, 2).

Les deux approches de culture d'enrichissement décrites ci-dessus ne nous ont pas permis d'isoler de microorganismes capables de dégrader le *S*-métolachlore à partir de ce sol agricole. Nous avons donc contacté Marcos Pileggi (Université de Ponta Grossa, Brésil), qui a accepté de nous fournir les souches *Klebsiella pneumoniae* GC s.B1, *Klebsiella pneumoniae* GC s.B2 et *Enterobacter aerogenes* GC s.A ayant montré la capacité de biotransformer le *S*-métolachlore par un processus de co-métabolisme (Martins *et al.*, 2007). Les tests de biotransformation du *S*-métolachlore que nous avons réalisés avec ces souches, dans les conditions décrites dans l'article, ne nous ont pas permis de reproduire les résultats obtenus par les auteurs.

Nous avons eu ensuite l'occasion, dans le cadre d'une collaboration avec Joan Artigas (LMGE), de tester la capacité des communautés microbiennes de rivière associées à la litière de feuilles à dégrader chacun des trois herbicides étudiés, seuls ou en mélange. Ces communautés sont principalement constituées de champignons hyphomycètes qui produisent des enzymes extracellulaires capables de dégrader des xénobiotiques (Mayer and Staples, 2002; Davila-Vazquez *et al.*, 2005; Baldrian, 2006). Les communautés microbiennes ont été prélevées dans la rivière Auzon (Auvergne) sur deux sites différents en termes de contamination, notamment par les pesticides : un site amont (faiblement contaminé) et un site aval (fortement contaminé). La méthode d'enrichissement en milieu liquide dite « classique » que nous avons utilisée ne nous a pas permis d'isoler de souches capables de dégrader la mésotrione et le *S*-métolachlore. En revanche, la dégradation du nicosulfuron a pu être observée au cours de l'enrichissement, indiquant un rôle potentiel des hyphomycètes dans ce processus. La description de ce potentiel de dégradation est détaillée dans l'article présenté en Annexe I.

Principales conclusions de l'étude :

Les communautés microbiennes d'eau de rivière associées à la litière de feuille n'ont pas la capacité à dégrader la mésotrione et le *S*-métolachlore, mais sont capables de transformer le nicosulfuron.

Les communautés issues du site aval présentent les plus forts taux de transformation du nicosulfuron, en comparaison des communautés issues du site amont, suggérant une pré-adaptation de ces communautés à la pollution.

L'impact du nicosulfuron sur la structure de ces communautés varie en fonction du mode d'exposition (nicosulfuron seul ou nicosulfuron + mésotrione + *S*-métolachlore).

A la suite de ces travaux, des tentatives d'isolement de souches fongiques capables de dégrader le nicosulfuron ont été réalisées. Il était en effet intéressant d'obtenir un isolat issu d'un environnement aquatique naturel pour étudier les voies de biotransformation de cette molécule, qui ne sont décrites jusqu'à présent que pour des microorganismes issus de sol ou de bassins d'aération de station d'épuration (Lu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2015a; Wang *et al.*, 2016b). Les résultats préliminaires des tests de dégradation ont montré la capacité d'une souche isolée de *Plectosphaerella cucumerina* (Ascomycète) à dissiper 100% du nicosulfuron (25 mg L<sup>-1</sup>) en solution dans un milieu minimum (cf. Partie III, Chapitre 1, 1.2.1) additionné de glucose (10 g L<sup>-1</sup>), après 21 jours d'incubation à 28°C et à l'obscurité. La biotransformation du nicosulfuron par cette souche fongique n'a pas encore été étudiée en détail, mais sera investiguée prochainement.

A ce stade des travaux, j'avais donc à ma disposition la souche *Bacillus megaterium* Mes11 capable de transformer la mésotrione, qui était déjà disponible au laboratoire (Batisson *et al.*, 2009), et la souche *Pseudomonas fluorescens* SG-1 capable de transformer le nicosulfuron que j'ai pu isoler au cours de mon travail de thèse. Je pouvais donc m'intéresser à la caractérisation, d'un point de vue chimique et biologique, des voies de biodégradation de ces deux herbicides.





## Chapitre 2. Caractérisation des voies de dégradation de la mésotrione et du nicosulfuron

### 1. Caractérisation des voies de dégradation de la mésotrione

L'identification de l'ensemble des métabolites produits et la description des voies de biodégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus megaterium* Mes11 avaient déjà été réalisées avant mon arrivée au laboratoire (Batisson *et al.*, 2009). Ces voies étant relativement bien conservées chez plusieurs genres bactériens (*Bacillus*, *Pantoea*, *Escherichia*), la souche Mes11 a alors été choisie comme modèle pour explorer plus en détails les mécanismes mis en jeu lors de la biotransformation de la mésotrione et identifier les gènes/enzymes impliqués dans chacune des étapes.

#### 1.1. Réponse du métabolisme global de la souche *Bacillus megaterium* Mes11 en présence de mésotrione

Une méthode classiquement employée pour identifier les gènes responsables d'une fonction (ici la dégradation d'un herbicide) est la création d'une banque de mutants. Cette technique nécessite cependant par la suite de disposer d'un crible facile pour analyser les mutants. Dans notre étude, nous ne disposions pas de ce crible (ex. activité de dégradation de la mésotrione), puisque la seule solution était de réaliser des tests de dégradation de la mésotrione en milieu liquide suivis de dosages HPLC, et ceci, pour chaque mutant, ce qui n'était pas envisageable.

Devant cette limite méthodologique, nous avons fait le choix de nous intéresser aux protéines différenciellement exprimées en présence ou en absence de mésotrione, en utilisant une technique peu utilisée dans le domaine environnemental : la 2D-DIGE (*two-dimensional differential in-gel electrophoresis*). La première partie des travaux, initiée avant le début de ma thèse, devait ainsi permettre de décrire la réponse adaptative du métabolisme de la souche en présence de mésotrione, voire d'identifier des enzymes impliquées dans la dégradation de cet herbicide. J'ai participé à l'analyse et à l'interprétation des résultats, qui ont fait l'objet d'un article, présenté en Annexe II (Bardot *et al.*, 2015).

### Principales conclusions de l'étude :

L'exposition du protéome intracellulaire de *B. megaterium* Mes11 à la mésotrione a induit la variation de l'intensité de 32 spots protéiques.

Parmi ces spots, 17 protéines ont pu être identifiées, principalement des protéines de stress, de stockage et des enzymes impliquées dans le métabolisme du carbone, du soufre ou de l'azote.

Certaines des protéines différentiellement exprimées en présence de mésotrione ont des liens étroits avec plusieurs nitroréductases, connues pour être impliquées dans la dégradation de composés nitro-aromatiques.

Aucune enzyme bactérienne n'avait à ce jour été décrite comme intervenant directement dans une des étapes de la biotransformation de la mésotrione. L'étude du protéome intracellulaire total de *B. megaterium* Mes11 ne nous a pas permis de révéler les protéines directement impliquées dans la dégradation de la mésotrione. Cependant, au regard de la structure chimique de la mésotrione et de ses métabolites, d'une part, et des réseaux de protéines révélés dans cette étude, montrant des liens étroits entre les protéines impliquées dans la réponse au stress mésotrione avec plusieurs nitroréductases (Bardot *et al.*, 2015) d'autre part, nous avons donc émis l'hypothèse que ces enzymes participaient à la transformation de la mésotrione.

### 1.2. Implication des nitroréductases dans la dégradation de la mésotrione par *Bacillus megaterium* Mes11 ?

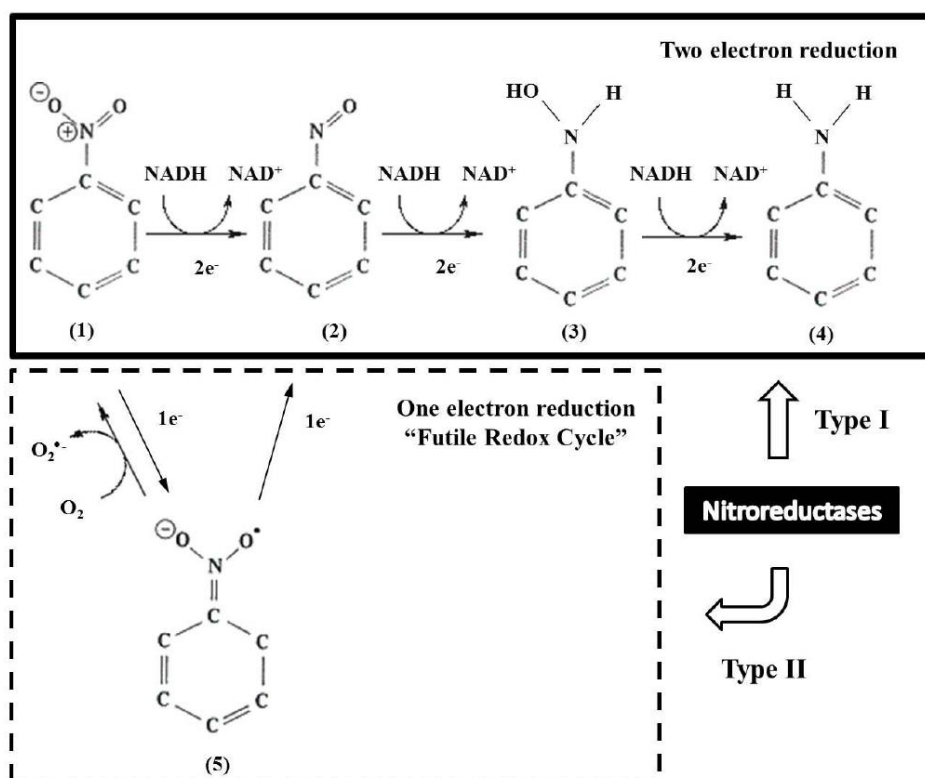
La mésotrione et un de ses métabolites classiquement retrouvés dans l'environnement (le MNBA) sont des dérivés nitro-aromatiques. Une des voies classiques de transformation de ce type de composés est la réduction du groupement -NO<sub>2</sub> par des nitroréductases.

Les nitroréductases bactériennes (E.C. 1.5.1.X) constituent une famille d'oxydoréductases catalysant la réduction de composés nitro-substitués à l'aide de flavine mononucléotide (FMN) ou flavine adénine dinucléotide (FAD) comme groupement prosthétique, et de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et/ou nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) comme cofacteur et donneur d'électrons (Bryant *et al.*, 1981; Muller, 1991). La plupart des nitroréductases bactériennes ont des caractéristiques biochimiques

similaires. Ce sont des protéines assemblées en homo-dimères d'environ 30 kDa, actives sous cette forme dimérique, ayant un spectre de substrats relativement large.

### 1.2.1. Mécanisme réactionnel des nitroréductases bactériennes

Au sein du groupement  $-NO_2$ , la liaison chimique entre l'atome d'oxygène et l'atome d'azote est une liaison polaire car l'atome d'oxygène est plus électronégatif que l'atome d'azote. Le pôle positif a donc tendance à attirer les électrons, et est par conséquent facilement réduit (Spain, 1995). Les nitroréductases ont ainsi été classées en deux groupes selon leurs capacités à réduire les groupements  $-NO_2$  *via* des transferts mono ou bi-électroniques, et en absence ou en présence d'oxygène, respectivement (Figure 30).

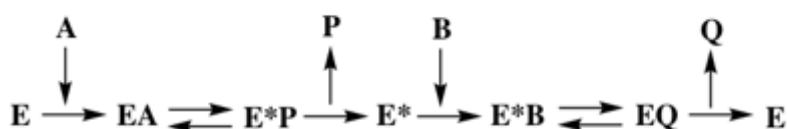


**Figure 30.** Mécanisme réactionnel des nitroréductases de type I et II (De Oliveira *et al.*, 2010). Composé nitro-aromatique (1), intermédiaire nitroso (2) hydroxylamino (3), composé amino-substitué (4), radical anion nitro (5).

#### 1.2.1.1. Les nitroréductases de type I (insensibles à l'oxygène)

Les nitroréductases de type I catalysent le transfert séquentiel de deux électrons du NAD(P)H vers le groupement  $-NO_2$  du dérivé nitro-substitué. Cette réaction peut se faire en

présence ou en absence d'oxygène, et mène à la production d'intermédiaires nitroso (-N=O), hydroxylamino (-NHOH) et finalement à l'amine primaire (NH<sub>2</sub>) (Figure 30). Le mécanisme réactionnel des nitroréductases de type I est le mécanisme ordonné Bi-Bi ping-pong caractérisé par la succession d'étapes suivantes : fixation du NAD(P)H, transfert des électrons au groupement prosthétique de l'enzyme (réduction du FMN en FMNH<sub>2</sub>), relargage du NAD(P)<sup>+</sup>, fixation du composé nitro-aromatique, transfert des électrons au groupement nitro (réduction du NO<sub>2</sub> en N=O), relargage du composé nitroso, etc. (Bryant *et al.*, 1981; Muller, 1991) (Figure 31). L'intermédiaire hydroxylamine est souvent identifié lors des études sur la réduction du groupement -NO<sub>2</sub>, et il peut être, dans certains cas, le produit majoritaire de la nitro-réduction. En revanche, l'intermédiaire nitroso n'est que rarement observé en raison de sa très forte réactivité et de la vitesse de réaction du second transfert bi-électronique très supérieure à celle du premier transfert.



**Figure 31.** Mécanisme réactionnel de type ordonné Bi-Bi ping pong des nitroréductases de type I : A = NAD(P)H, P = NAD(P)<sup>+</sup>, B = dérivé nitro-, nitroso- ou hydroxylamino-, Q = dérivé nitroso-, hydroxylamino- ou amino-, E = enzyme-FMN et E\* = enzyme-FMNH<sub>2</sub>.

#### 1.2.1.2. Les nitroréductases de type II (sensibles à l'oxygène)

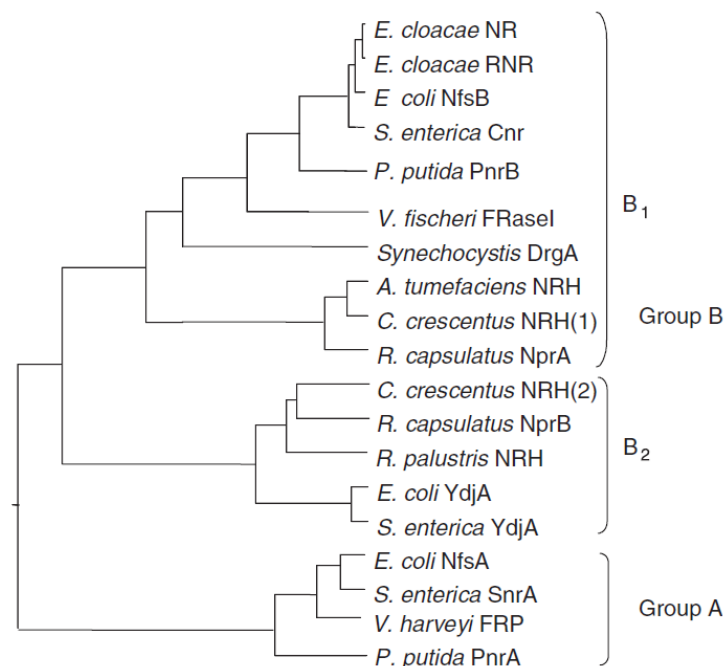
Les nitroréductases de type II catalysent le transfert d'un électron au niveau du groupement -NO<sub>2</sub> produisant un radical anion nitro qui réagit avec l'oxygène dissous pour former un radical superoxyde et régénérer le composé nitro-aromatique initial (Figure 30). Ce « cycle redox futile » peut être la cause d'un stress oxydant en raison de la grande quantité de radicaux superoxydes générés. La nitroréduction initiée par les nitroréductases de type II ne peut ainsi être réalisée qu'en absence d'oxygène (Peterson *et al.*, 1979).

#### 1.2.2. Diversité des nitroréductases bactériennes de type I

Les nitroréductases sont retrouvées chez de nombreux genres bactériens. Les nitroréductases de type I participent à la réduction de nombreux dérivés nitro-aromatiques tels que les nitrofuranes, le nitrobenzène, le nitrobenzoate, les nitrotoluènes (dont le

trinitrotoluène, TNT) ou encore les nitroimidazoles (Race *et al.*, 2005; Olekhnovich *et al.*, 2009). Beaucoup d'entre elles, issues de souches bactériennes variées, ont été caractérisées structurellement et fonctionnellement (De Oliveira *et al.*, 2010).

Elles sont classées en deux grands groupes selon leur similarité avec les nitroréductases NfsA (Groupe A) et NfsB (Groupe B) de *Escherichia coli* (Bryant *et al.*, 1981) (Figure 32). La nitroréductase NfsA est la nitroréductase majeure chez *E. coli* et elle est capable d'utiliser le NADPH comme donneur d'électrons, tandis que la nitroréductase NfsB est capable d'utiliser soit le NADPH, soit le NADH comme donneur d'électrons.



**Figure 32.** Arbre phylogénétique des nitroréductases de type I (Roldán *et al.*, 2008). Le groupe A inclut la nitroréductase majeure de *E. coli* (Zenno *et al.*, 1996a) et les protéines homologues SnrA de *Salmonella typhimurium* (Nokhbeh *et al.*, 2002), PnrA de *Pseudomonas putida* JLR11 (Caballero *et al.*, 2005) et FRP de *Vibrio harveyi* (Lei *et al.*, 1994). Le groupe B inclut deux sous-groupes. Le sous-groupe B<sub>1</sub> inclut la nitroréductase mineure de *E. coli* NfsB (Zenno *et al.*, 1996b), les protéines NR et RNR de *Enterobacter cloacae* (Bryant and Deluca, 1991; Koder *et al.*, 2001), la nitroréductase Cnr de *Salmonella typhimurium* (Watanabe *et al.*, 1990), la nitroréductase PnrB de *P. putida* JLR11 (Caballero *et al.*, 2005), l'oxydo-réductase FRaseI de *Vibrio fischeri* (Zenno *et al.*, 1994), la quinone réductase DrgA de *Synechocystis* (Matsuo *et al.*, 1998) et la nitroréductase majeure NprA de *Rhodobacter capsulatus* (Perez-Reinado *et al.*, 2005). Le sous-groupe B<sub>2</sub> inclut la nitroréductase mineure NprB de *R. capsulatus* (Perez-Reinado *et al.*, 2005) et d'autres nitroréductases de *E. coli* et de *Salmonella* (YdjA).

### 1.2.3. Rôle physiologique des nitroréductases bactériennes

Les fonctions biologiques des nitroréductases sont assez peu décrites dans la littérature. Des études ont suggéré leur rôle dans la réponse au stress oxydatif (Hassan and Fridovich, 1978; Liochev *et al.*, 1999; Lightfoot *et al.*, 2000). C'est notamment le cas pour les nitroréductases de *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, dont l'expression est induite en présence d'oxydants connus pour perturber la balance redox thiol-disulfure intracellulaire

(Streker *et al.*, 2005). Ce stress disulfure peut être considéré comme une sous-catégorie du stress oxydatif, caractérisé par la formation de ponts disulfures anormalement présents sur les protéines, et pouvant altérer la fonction des protéines suite à l'oxydation de groupements thiols. Les nitroréductases interviendraient donc en réduisant les oxydants responsables de ce stress. De plus, le gène *nfsA* chez *E. coli*, codant la nitroréductase NfsA, fait partie du système de régulation *SoxRS* activé en présence de paraquat, un composé connu pour générer des radicaux superoxydes (Hassan and Fridovich, 1978; Liochev *et al.*, 1999). De même, les gènes *snrA* de *Salmonella typhimurium* et *nprA* de *Rhodobacter capsulatus* sont également induits en présence de paraquat (Zenno *et al.*, 1994; Nixon *et al.*, 2002). Ainsi, ces nitroréductases joueraient aussi un rôle dans le système de défense antioxydant chez les bactéries.

Certaines nitroréductases, telles que la nitroréductase BluB décrite chez *Selenomonas ruminantium*, *Sinorhizobium meliloti* et *Rhodobacter capsulatus*, sont impliquées dans la biosynthèse de cobalamine (vitamine B<sub>12</sub>). Ce composé est un cofacteur pour de nombreuses enzymes intervenant dans la biosynthèse des acides gras, de la méthionine et des désoxynucléotides (Campbell *et al.*, 2006). Les protéines DrgA de la cyanobactérie *Synechocystis* sp. et NfsB de *E. coli* ayant montré des capacités de réduction du fer(III) sont décrites comme potentiellement impliquées dans le métabolisme de ce métal (Takeda *et al.*, 2007). La nitroréductase FRaseI de *Aliivibrio fischeri* est, quant à elle, impliquée dans la bioluminescence en catalysant la réduction du FMN en FMNH<sub>2</sub>, nécessaire à la luciférase (Zenno *et al.*, 1994, 1996a; b).

Enfin, les nitroréductases peuvent conférer un avantage évolutif aux microorganismes qui les possèdent. Une hypothèse est que le rôle primitif des nitroréductases a été détourné au cours de l'évolution afin de permettre la réduction de composés nitro-aromatiques toxiques en des formes moins toxiques. Ainsi, les bactéries possédant des nitroréductases sont capables de vivre dans des environnements pollués par des composés nitro-aromatiques (Roldán *et al.*, 2008).

Ces différents points viennent conforter notre hypothèse sur le rôle des nitroréductases dans la transformation de la mésotrione chez les souches bactériennes capables de transformer cet herbicide. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé la souche *Bacillus megaterium* Mes11 comme modèle.

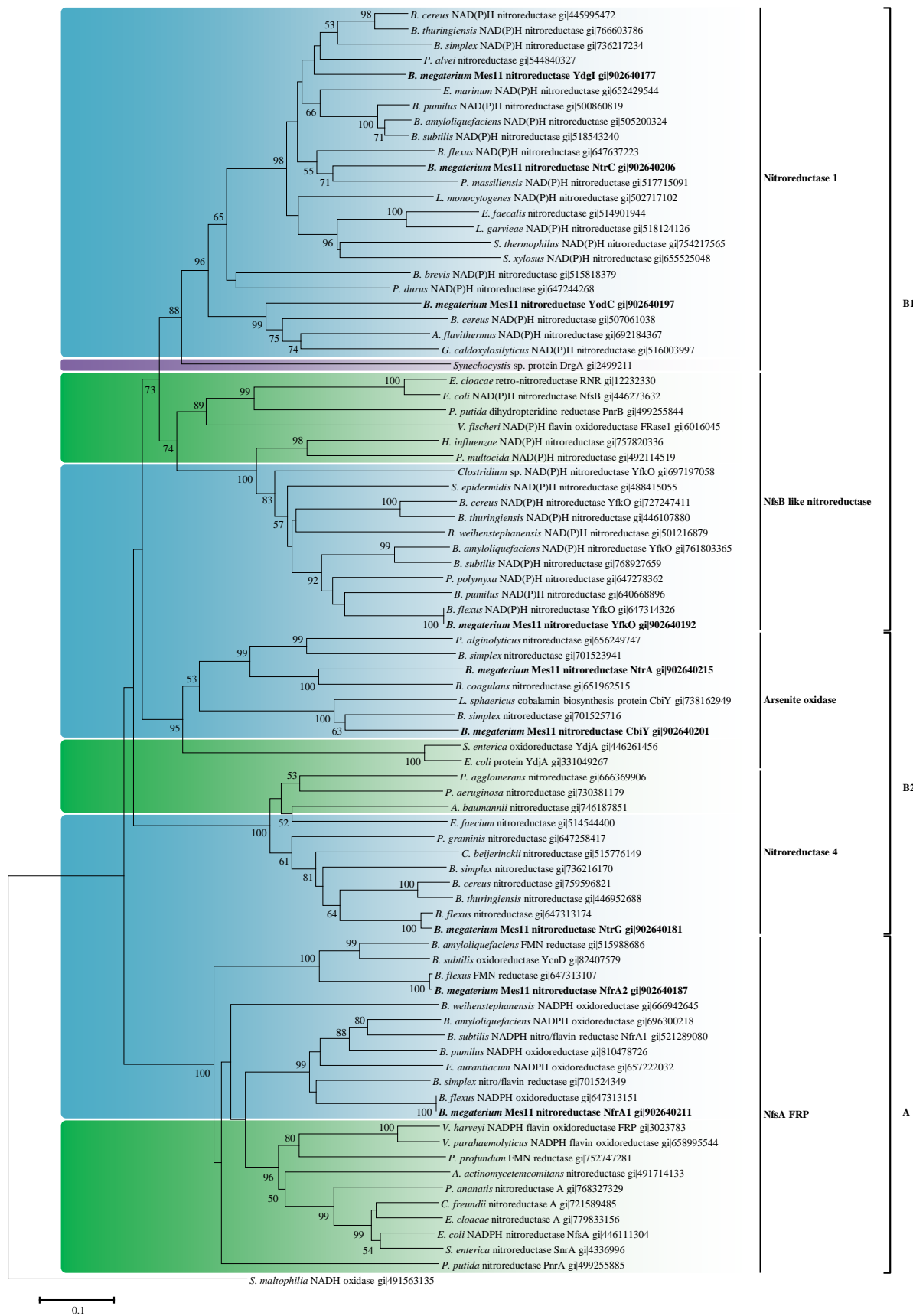
Un moyen de confirmer cette hypothèse était d'inactiver les gènes codant les nitroréductases chez Mes11 par mutagénèse dirigée. Cette technique nécessite de pouvoir transformer la souche avec un plasmide porteur d'un transposon (ex. tn5). Cependant, aucune

des techniques de transformation testées (choc thermique, électroporation, protoplaste, conjugaison) n'a fonctionné sur la souche Mes11. Ces résultats n'étaient pas surprenants car les membres appartenant à l'espèce *Bacillus megaterium* sont connus pour être difficilement transformables (Brown and Carlton, 1980).

Nous avons donc opté pour une autre approche, qui consiste à réaliser un criblage des nitroréductases de la souche Mes11 pour leur activité sur la mésotrione (et le MNBA). Dans un premier temps, ne disposant pas encore du génome séquencé de cette souche, nous avons procédé à la recherche de séquences de gènes de nitroréductases chez *Bacillus megaterium* en nous appuyant sur les séquences du génome de 3 souches de *B. megaterium* disponibles dans la base de données UniProtKB. Neuf gènes codant des nitroréductases ont été révélés. Ces 9 gènes ont été amplifiés par PCR avec succès à partir de l'ADN génomique de la souche Mes11. Après clonage et séquençage, nous avons mis en évidence que les 9 nitroréductases de la souche Mes11 sont affiliées aux nitroréductases de type I, et plus précisément aux sous familles Nitroréductase 1, NfsB like nitroréductase, Arsenite oxydase, Nitroréductase 4 et Nfsa-FRP de la famille Nitro-FMN réductase (Figure 33).

Il faut noter ici la présence d'un nombre de nitroréductases relativement important dans le génome de la souche Mes11, appartenant à 5 sous-familles différentes. Nous avons donc testé par la suite l'activité nitroréductase de chacune de ces enzymes pour identifier la(les)quelle(s) étai(en)t capable(s) de transformer la mésotrione et le MNBA.





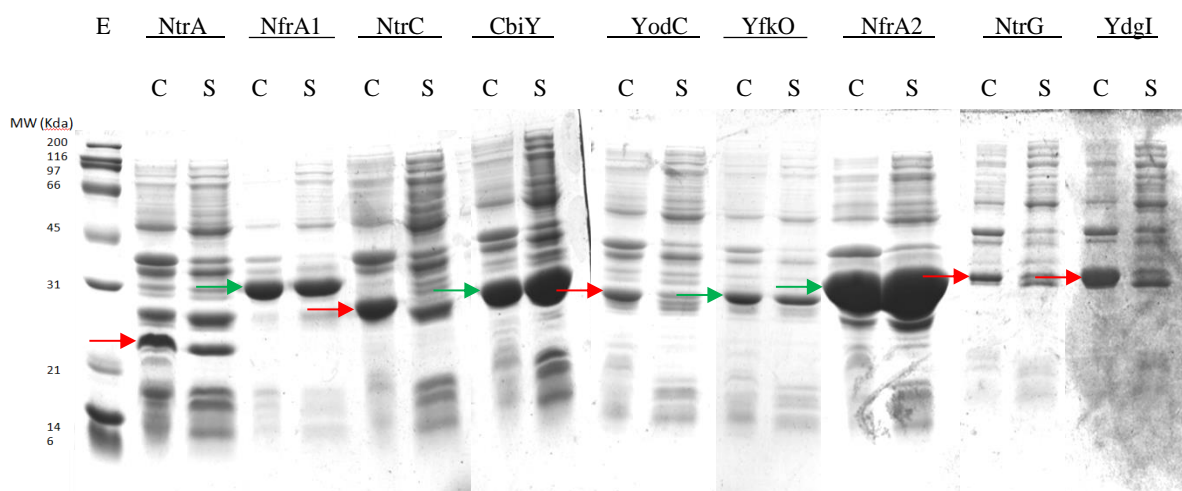
**Figure 33.** Relations phylogénétiques des nitroréductases de *B. megaterium* Mes11 avec leurs homologues respectifs, sur la base des séquences en acides aminés. Les sous-familles de Nitro-FMN réductases et les sous-groupes des nitroréductases de type I (Roldán *et al.*, 2008) sont également indiqués à droite de l'arbre. Barre d'échelle = 0,1 différence d'acide aminé par site. Embranchement ou classe : Firmicutes (■),  $\gamma$ -Proteobacteria (■) et Cyanobacteria (■).

Chacun des 9 gènes codant les nitroréductases de Mes11 ont ensuite été clonés dans un vecteur d'expression.

Au cours de cette étape d'expression des protéines, j'ai été confronté à plusieurs difficultés concernant :

- la solubilité des protéines recombinantes

Chacune des 9 enzymes a été produite avec succès à l'aide du vecteur d'expression pEXP5-CT/TOPO (Invitrogen). Après 6 h d'induction avec 1 mM d'IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) à 37°C dans les cellules *Escherichia coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) pLysS, seules 4 nitroréductases (NfrA1, CbiY, YfkO et NfrA2) sur 9 étaient solubles, les autres étant présentes en très grande majorité dans le culot (Figure 34). Ce phénomène est caractéristique de la formation de corps d'inclusion constitués d'agrégats de protéines.



**Figure 34.** Analyse SDS-PAGE du culot (C) et du surnageant (S) suite à la centrifugation du lysat des bactéries hébergeant les vecteurs recombinants codant chacune des 9 nitroréductases de la souche Mes11, après 6 h d'induction. E = échelle de poids moléculaire. Les flèches indiquent les bandes correspondant à la taille attendue de la protéine recombinante (flèche rouge quand la bande est présente majoritairement ou uniquement dans le culot et flèche verte quand la bande est présente dans le culot et le surnageant).

A ce stade des travaux, il n'était donc pas possible de purifier les 5 nitroréductases non solubles. J'ai donc testé d'autres conditions d'expression et d'induction pour tenter d'augmenter la fraction soluble de ces 5 enzymes. La formation des corps d'inclusion dépend des propriétés de chaque protéine, et peut être évitée notamment en diminuant la concentration en protéine recombinante produite (afin d'éviter l'agrégation), ou en ralentissant l'induction de l'expression. Ainsi, des tests ont été effectués en réalisant l'induction avec des concentrations plus faibles d'IPTG (gamme testée : de 1 mM à 0,05

mM), sans pour autant parvenir à produire les enzymes sous forme soluble. J'ai alors tenté de faire exprimer les 5 enzymes non solubles dans d'autres souches bactériennes (BL21 (DE3) pLysS, *E. coli* Rosetta-Gammi 2 (DE3) pLysS-RARE et *E. coli* Rosetta-Gammi B (DE3) pLysS-RARE, ces dernières étant connues pour avoir un taux de croissance plus lent), sans succès. Enfin, j'ai modifié la température et la durée d'induction de l'expression. Ainsi, en induisant l'expression des protéines à 4 °C pendant 3 jours, j'ai pu obtenir deux protéines solubles supplémentaires (NtrA et NtrG). Concernant les trois dernières enzymes (NtrC, YodC et YdgI), elles ont finalement pu être obtenues en réalisant les expressions en conditions standard d'induction (1 mM d'IPTG, 37°C, *Escherichia coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) pLysS ; Figure 34) mais dans de grands volumes de culture (2 L), afin d'obtenir suffisamment de protéines dans le lysat bactérien pour réaliser les tests d'activité.

- La mesure d'activité

La caractérisation fonctionnelle des nitroréductases a nécessité une mise au point importante de la méthode de mesure d'activité enzymatique. Cette mise au point a tout d'abord concerné la détermination des optima de température et de pH de chaque enzyme. Ensuite, la détermination des paramètres cinétiques des enzymes (la constante de Michaelis-Menten  $K_M$  et la vitesse initiale maximale  $v_{max}$ ) devant être réalisée dans les conditions initiales saturantes en substrats, il n'était pas possible de suivre la concentration en substrat nitro-aromatique par dosage en HPLC. Une mesure indirecte a donc été réalisée par mesure spectrophotométrique (absorbance à  $\lambda = 340$  nm) afin de suivre en continu l'oxydation du NAD(P)H, cofacteur des nitroréductases, donneur d'électrons permettant la réduction du groupement  $-NO_2$  du substrat nitro-aromatique.

Une fois les mises au point terminées, l'activité des protéines recombinantes purifiées a alors pu être testée. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet de l'article ci-après (Carles *et al.*, 2016).

## Functional and structural characterization of two *Bacillus megaterium* nitroreductases biotransforming the herbicide mesotrione

Louis Carles\*†, Pascale Besse-Hoggan‡§, Muriel Joly\*†, Armelle Vigouroux||, Solange Moréra|| and Isabelle Batisson\*†<sup>1</sup>

\*Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement (LMGE), F-63000 Clermont-Ferrand, France

†Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 6023, LMGE, TSA 60026, CS 60026, 63178 Aubière Cedex, France

‡Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), F-63000 Clermont-Ferrand, France

§CNRS, UMR 6296, ICCF, TSA 60026, CS 60026, 63178 Aubière Cedex, France

||Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CNRS, Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-91198, Gif-sur-Yvette, France

Mesotrione is a selective herbicide belonging to the triketone family, commonly used on maize cultures since 2003. A mesotrione-transforming *Bacillus megaterium* Mes11 strain isolated from an agricultural soil was used as a model to identify the key enzymes initiating the biotransformation of this herbicide. Two enzymes (called NfrA1 and NfrA2/YcnD) were identified, and functionally and structurally characterized. Both belong to the NfsA FRP family of the nitro-FMN reductase superfamily (type I oxygen-insensitive nitroreductase) and show optimal pH and temperature of 6–6.5 and 23–25 °C, respectively. Both undergo a Ping Pong Bi Bi mechanism, with NADPH and NADPH/NADH as cofactors for NfrA1 and NfrA2/YcnD,

respectively. It is interesting that both can also reduce various nitro compounds including pesticides, antibiotics, one prodrug and 4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoic acid, one of the mesotrione metabolites retrieved from the environment. The present study constitutes the first identification of mesotrione-transforming enzymes. These enzymes (or their corresponding genes) could be used as biomarkers to predict the capacity of ecosystems to transform mesotrione and assess their contamination by both the parent molecule and/or the metabolites.

**Key words:** *Bacillus megaterium*, biotransformation, mesotrione herbicide, nitroreductase enzyme.

### INTRODUCTION

A new generation of herbicides, both more specific and used on crops at lower doses, has recently appeared on the market [1,2]. However, the reduction in agronomic doses is not necessarily linked to a decrease in leaching, contamination and potential (eco)toxicity because novel molecules and their transformation products can be more toxic than those previously used [3]. We focused our study on the  $\beta$ -triketone herbicide mesotrione, commonly used to treat maize culture since the prohibition of the use of atrazine in 2003 in the European Union. Mesotrione's fate has already been well studied in crops, soil and water [4]. Its water solubility and sorption coefficient values make this compound relatively mobile and bioavailable in soils, allowing biotransformation processes [5,6]. The main metabolites found in mesotrione-contaminated environments are 4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoic acid (MNBA) and 2-amino-4-methylsulfonyl benzoic acid (AMBA) [7].

The mesotrione biotransformation pathways are well conserved among several bacterial mesotrione-transforming strains isolated from various environments such as *Bacillus* sp. 3B6 [8] and *Pantoea* sp. 5B12 [9], isolated from cloud water, *Bacillus pumilus* HZ-2 isolated from an anaerobic wastewater treatment plant [10], *Bacillus megaterium* Mes11 [11] and *Bradyrhizobium* sp. SR1 [12], isolated from an agricultural soil or a laboratory strain of *Escherichia coli* (ATCC 11303) [9]. Two pathways have been described, each one being major or minor according to the strain:

the first involves reduction of the nitro group of mesotrione into free or cyclized hydroxylamino intermediates and hydrolysis of the  $\beta$ -diketone bond, leading to the final accumulation of AMBA; the second involves an oxidative cleavage of the mesotrione and a reduction of the nitro group, leading to the MNBA intermediate, and finally transformation into AMBA [13]. Although mesotrione transformation pathways have been well studied, no genes and/or enzymes involved in its biotransformation have been described so far. A recent proteomic study of *B. megaterium* Mes11 revealed a network of mesotrione-adaptative proteins directly linked to nitroreductase (NR) enzymes, possibly involved in its biotransformation into AMBA [14]. This result agreed with the chemical structures of the observed intermediate metabolites, corresponding to the reduction of the mesotrione nitro group into an amino moiety.

NR enzymes are known for their ability to reduce nitroaromatic compounds *via* one- or two-electron transfer by type II and type I NRs, respectively [15,16]. The type II NRs contain FMN or FAD as cofactor and their activity is oxygen-sensitive. They catalyse the one-electron reduction of a nitro compound, forming a nitro anion radical. In the presence of oxygen, this radical undergoes futile cycling, resulting in the production of superoxide anions and regeneration of the parent nitro compound [17]. The type I NRs (oxygen-insensitive NRs) are NAD(P)H-dependent, FMN-binding proteins. They catalyse the sequential two-electron reduction of the nitro group into a nitroso intermediate which rapidly undergoes reduction to

Abbreviations: AMBA, 2-amino-4-methylsulfonyl benzoic acid; DAD, diode array detector; FLD, fluorescence detector; MNBA, 4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoic acid; MPD, (4S)-2-methyl-2,4-pentanediol; NPB, native purification buffer; NR, nitroreductase; qPCR, quantitative PCR.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (email [isabelle.batisson@univ-bpclermont.fr](mailto:isabelle.batisson@univ-bpclermont.fr)).

**Table 1** Name and sequence of primers used in this study

The *B. megaterium*-targeted gene names are indicated, as well as the family and superfamily of their corresponding protein.

PCR primer name	Gene name	Protein family	Protein superfamily	Nucleotide sequence (5'–3')	Annealing temperature (°C)	Amplicon size (bp)	Reference or source
A Forward	<i>ntrA</i>	Arsenite oxidase	Nitro-FMN reductase	ATGAGCGTATTAGATATTATAAAGCC	55	558	The present study
A Reverse				YTAACGATACCAAATCGTTTTATCTTG			
B Forward	<i>nfrA1</i>	NfsA FRP	Nitro-FMN reductase	ATGAAGTCAGTATTGAAACGATTTTA	55	747	The present study
B Reverse				TTAATTCCTTRTTAAATCCTTGCTTTTC			
C Forward	<i>ntrC</i>	Nitroreductase 1	Nitro-FMN reductase	ATGACTATAAAGACTTTAACGAAATTG	55	624	The present study
C Reverse				TTATTTCCAAGTCGTAACCGTATTG			
C1 Forward	<i>cbiY</i>	Arsenite oxidase	Nitro-FMN reductase	ATGACGATTATYTCACAGYTAAG	55	567	The present study
C1 Reverse				TTACAGCCATGTTGTTTTCTGTAAAC			
D Forward	<i>yodC</i>	Nitroreductase 1	Nitro-FMN reductase	ATGACAAAAGATTTTTGATGTGGTAA	55	609	The present study
D Reverse				TTAAATCCAAGTTGTAACCTGATCYAATG			
E Forward	<i>yfkO</i>	NfsB-like nitroreductase	Nitro-FMN reductase	ATGAACMATAAGATAAARAACAAGAA	55	666	The present study
E Reverse				YTATTTTAYCCACTGTACAACCTGATC			
F Forward	<i>nfrA2 (ycnD)</i>	NfsA FRP	Nitro-FMN reductase	ATGAATGAAGCAATTCGTACAATTC	55	735	The present study
F Reverse				TTATTCGAATTTAAATCCTGTTTTCAAG			
G Forward	<i>ntrG</i>	Nitroreductase 4	Nitro-FMN reductase	ATGGGTTTTYAGATAAATTTTGATAAATC	55	642	The present study
G Reverse				TTATTTAAATCTTTTACAGCTTCASTTAG			
H Forward	<i>ydgl</i>	Nitroreductase 1	Nitro-FMN reductase	ATGACACMAACAAAACACTAAAC	55	639	The present study
H Reverse				TTATCTAAATTTGAGCTACTTTTTCGATTG			
T7 Forward	b	b	b	TAATACGACTCACTATAGGG	51	Insert dependent	pEXP5-CT/TOPO TA
T7 Term Reverse				ATCCGGATATAGTTCCTCCTTTC			Expression Kit (Invitrogen)
NfrA1 Forward <sup>a</sup>	<i>nfrA1</i>	b	b	CCGAATGATGAGCAGACGAA	57	94	The present study
NfrA1 Reverse <sup>a</sup>				GTGTCTGGCGTTTGCCATT			
NfrA2 Forward <sup>a</sup>	<i>nfrA2 (ycnD)</i>	b	b	CAACAGTTGCAGCAGAATCAC	57	96	The present study
NfrA2 Reverse <sup>a</sup>				CCGGTAAATCGAGCAGTTCA			
BAC338 Forward <sup>a</sup>	16S rRNA	b	b	ACTCCTACGGGAGGCAG	57	180	[18]
515 Reverse <sup>a</sup>				ATTACCGCGGCTGCTGGCA			

<sup>a</sup>qPCR primers.

<sup>b</sup>Not applicable.

hydroxylamino and amino intermediates from electron pairs of NAD(P)H [15,16].

The aim of the present study was to identify and functionally and structurally characterize the initial mesotriene-transforming enzymes. As the mesotriene transformation by *B. megaterium* Mes11 strain was observed in aerobic conditions, with the formation of hydroxylamino intermediates and AMBA, we hypothesize that type I NR activity could be responsible for the first step of mesotriene biotransformation. We have thus identified the type I Mes11 NR enzymes and tested their ability to transform mesotriene.

## EXPERIMENTAL

### Bacterial strains and chemicals

The mesotriene-transforming strain *B. megaterium* Mes11 was isolated from an agricultural soil as previously described [11]. *E. coli* BL21(DE3) (pLys) cells were purchased from Thermo Scientific. Mesotriene, dinoseb, imidacloprid (Pestanal, purity 99.9%), MNBA (purity >99%), parathion (Pestanal, purity 99.0%), parathion-methyl (Pestanal, purity 99.8%), fluazinam (Pestanal, purity 98.5%), nitrofurazone (Fluka), chloramphenicol, 5-(1-aziridinyl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954) (purity >98%), thiamethoxam (Pestanal, purity 99.7%) and metronidazole (Fluka, purity >98%) were purchased from Sigma–Aldrich.

### PCR amplification of the NR-coding genes

The extraction of genomic DNA from *B. megaterium* Mes11 was performed using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. Primers for PCR amplification of NR-coding genes were designed using primer basic local alignment search tool (BLAST) (Table 1) and obtained from Eurofins. The PCRs were performed in a total volume of 50  $\mu$ l, containing 200  $\mu$ M of each dNTP, 0.2  $\mu$ M of each primer, and 1 $\times$  PCR buffer containing 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 unit of Taq polymerase (Eurobio) and 50 ng of genomic DNA. The PCRs were performed in a Mastercycler (Eppendorf) as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing at 55 °C for 1 min and elongation at 72 °C for 1 min, and a final extension step at 72 °C for 10 min.

Complete nucleotide sequences of the NR genes *ydgl*, *ntrG*, *nfrA2/ycnD*, *yfkO*, *yodC*, *cbiY*, *ntrC*, *nfrA1* and *ntrA* of *B. megaterium* Mes11 were deposited in GenBank under accession numbers KT008914–KT008922, respectively.

### Expression and purification of NRs in *E. coli*

The amplification products were cloned into the expression vector pEXP5-CT/TOPO. The expression of the recombinant NRs was performed in *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS cells as described by Bers et al. [19], with some modifications. The expression was realized by induction with 1 mM IPTG and incubation at 37 °C for 5 h for all NRs, except NtrA and NtrG, which

**Table 2** Crystallographic data and refinement parameters

Values for the highest resolution shell are in parentheses.

Protein (PDB code)	<i>B. megaterium</i> NfrA1 (5HDJ)	<i>B. megaterium</i> NfrA2/YcnD (5HEI)
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_1$
Cell parameters ( $\text{\AA}$ , $^\circ$ )	$a = 56.9, b = 87.2, c = 93.6$	$a = 64.4, b = 158.2, c = 103.9, \beta = 102.2$
Number of dimers in the asymmetrical unit	1	4
Resolution ( $\text{\AA}$ )	48–1.89 (2.01–1.89)	50–2.84 (3.01–2.84)
Number of observed reflections	255507 (33513)	129776 (19322)
Number of unique reflections	36741 (5655)	44446 (6781)
$R_{\text{sym}}$ (%)	21.8 (101.7)	24.5 (103.1)
Completeness (%)	99.4 (96.4)	97.3 (92.6)
$I/\sigma I$	7.52 (1.65)	4.88 (1.3)
$CC_{1/2}$ <sup>a</sup>	99.1 (65.8)	97 (59)
$R_{\text{cryst}}$ (%)	17.43	20.3
$R_{\text{free}}$ (%) <sup>b</sup>	20.6	24.7
RMSD bond ( $\text{\AA}$ )	0.01	0.008
RMSD angle ( $^\circ$ )	1.03	1.05
Average $B$ ( $\text{\AA}^2$ ) protein, FMN cofactor, solvent	26.9, 15, 32.4	60.5, 54.4, 43.2

<sup>a</sup> $CC_{1/2}$  = percentage of correlation between intensities from a random half-dataset [21].<sup>b</sup>Of the data 5% were set aside for free calculation of the  $R$  factor.

were induced at 4°C for 72 h. The size of the recombinant proteins was checked using the SDS/PAGE molecular mass standards, broad range (Bio-Rad Laboratories). The recombinant *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS (pEX-CT\_NR) strains were cultured in 1 litre of LB overnight at 37°C under agitation (200 rev./min). After centrifugation of the culture (15 min at 3400  $g$ ), the pellet was resuspended in either 5 ml of native equilibration buffer (Thermo Fisher Scientific) for kinetic studies or 50 mM Tris/HCl, pH 8, 20 mM imidazole and 500 mM NaCl for structural studies. The concentrated cell suspension was lysed twice in a One Shot Cell disrupter (Constants Systems) under 2.6 kbar (1 kbar = 100 000 kPa) pressure. Cell debris were eliminated by centrifugation (20000  $g$  for 1 h at 4°C) and the supernatant was loaded on a HisPur Ni<sup>2+</sup>-nitrilotriacetate (Ni-NTA) Superflow agarose column for protein purification (Thermo Fisher Scientific), as recommended by the manufacturer. For structural studies, enzyme elution was performed using 50 mM Tris/HCl, pH 8, 300 mM imidazole and 500 mM NaCl. The fractions containing the enzyme were loaded on a gel-filtration column (HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade, GE Healthcare) equilibrated with 50 mM Tris/HCl, pH 8, and 150 mM NaCl. NfrA1 and NfrA2/YcnD enzymes were concentrated at 7.3 and 9.4 mg/ml, respectively, and stored at –80°C.

### Crystallization and structure determination

Crystallization conditions (Qiagen kits) were screened in sitting-drop vapour-diffusion experiments using a nanodrop cartesian robot (proteomic solutions) at 293 K. Crystals were obtained in 15% (w/v) PEG 4000 and 0.1 M Mes, pH 6.5, for NfrA1 and in 3.5 M ammonium sulfate, 5% (4S)-2-methyl-2,4-pentanediol (MPD) and 0.1 M Mes, pH 6.5, for NfrA2/YcnD. They were transferred into the mother solution supplemented with 25% (w/v) PEG 400 and 30% glucose, respectively, before being flash-frozen in liquid nitrogen. Diffraction data for NfrA1 and NfrA2/YcnD crystals were collected at 100 K on the PROXIMA 1 beamline (Synchrotron SOLEIL). Intensities were integrated using an XDS program [20] and data quality was assessed using the correlation coefficient  $CC_{1/2}$  (Table 2).

Solvent content analysis using CCP4 indicated the presence of one dimer or four dimers in the asymmetrical unit of *B.*

*megaterium* NfrA1 or NfrA2/YcnD crystals, respectively. The structural determination was performed by molecular replacement with Phaser [22], using the co-ordinates of the *B. subtilis* NfrA1 dimer (PDB code 3N2S [23]) and the *B. subtilis* YcnD (also named NfrA2) dimer (PDB code 1ZCH [24]) as a search model for *B. megaterium* NfrA1 and NfrA2/YcnD structures, respectively. Both enzyme models were refined using non-crystallographic symmetry (NCS) restraints and total least squares (TLS) using Buster [25]. Electron density maps were evaluated using the Crystallographic Object-Oriented Toolkit (COOT) [26].

The atomic co-ordinates and structure factors of NfrA1 and NfrA2/YcnD Mes11 have been deposited in the PDB (<http://www.rcsb.org>) under accession codes 5HDJ and 5HEI.

### NR enzyme assays

The reduction activity for the nitro group of each of the nine NRs was first checked in the presence of 100  $\mu\text{M}$  mesotriene or MNBA prepared in native purification buffer (NPB), pH 7.5 (5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 500 mM NaCl), 400  $\mu\text{M}$  NAD(P)H and 1.8  $\mu\text{M}$  enzyme at 28°C. The reaction was stopped after 1 h by the addition of HCl (final concentration 6%, v/v). The concentration of remaining mesotriene or MNBA was then determined using HPLC.

The optimal pH and temperature for activity of mesotriene-reducing enzymes were determined as described above for pH varying from 2.9 to 8.2 (fixed temperature: 25°C) and for temperatures varying from 22.5°C to 47.7°C (fixed pH: 6).

The reaction mechanism and kinetic constants were determined by monitoring the NAD(P)H oxidation rate at 340 nm [ $\text{NAD(P)H}$  molar absorption coefficient  $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ] at the optimal pH and temperature of enzymes with a Cary 300 UV-Vis spectrophotometer (Agilent). The reactions were carried out in NPB with fixed concentrations of substrates (0, 50, 100 and 400  $\mu\text{M}$  mesotriene or MNBA) adding different concentrations of cofactor [0, 100, 200, 300 and 400  $\mu\text{M}$  NAD(P)H] and 0.43  $\mu\text{M}$  NfrA1 or 1.78  $\mu\text{M}$  NfrA2/YcnD. The innate levels of NAD(P)H oxidase activity of both enzymes were determined using enzymatic assays without substrate for each incubation condition. The stability of NAD(P)H was checked using assays without enzymes. The initial velocity was determined in the linear

phase when <10% of the substrate has depleted (i.e. <2 min in our assays). The double-reciprocal plots of the initial velocity of both enzymes with each substrate and cofactor were realized and a re-plot (secondary plot) of the y-axis intercepts against MNBA concentrations or cofactor (NADPH and NADH) concentrations was used to estimate the kinetic parameters (see Table 4). The reaction mechanism was determined using Lineweaver–Burk plots that resulted from assays with MNBA as substrate and NADPH and NADH as cofactor for NfrA1 and NfrA2/YcnD, respectively (see Supplementary Figure S2).

The quantitative time-course transformation of mesotrione and MNBA and mass balance calculation were carried out at the optimal pH and temperature as described above, in the presence of 2.4  $\mu$ M NfrA1 and NfrA2/YcnD. The capacity of Mes11 NfrA1 and NfrA2/YcnD to reduce various nitro substrates [used as soluble: 400  $\mu$ M of substrate except for dinoseb and parathion-methyl (200  $\mu$ M), parathion (80  $\mu$ M) and fluazinam (5  $\mu$ M)] was tested as described above at the optimal pH and temperature, in the presence of 1.8  $\mu$ M NfrA1 and NfrA2/YcnD. The reaction was monitored using HPLC after 1 h of incubation.

#### NfrA1 and nfrA2/ycnD gene expression levels in *B. megaterium* Mes11

The Mes11 cultures (20 ml) were produced at 25°C under agitation (150 rev./min) in Tryptone soya (TS) medium supplemented or not with 0.15 mM mesotrione (in triplicate). The mesotrione concentrations were measured using HPLC as described below. Cultures (1 ml) were sampled and DNA/RNA extraction was carried out as described by Dugat-Bony et al. [27]. The DNase treatments (twice) and reverse transcription were performed using the DNaseI kit (Invitrogen) and the SuperScript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) with Random Primers (Invitrogen), respectively. The quantitative PCRs (qPCRs) were performed in a total reaction volume of 15  $\mu$ l containing 7.5  $\mu$ l of MasterMix, 0.3  $\mu$ M of each primer (see Table 1) and 1  $\mu$ l of ten-fold diluted cDNA. The qPCR was carried out in white qPCR 96-well plates (Eurogentec) using the MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay Low ROXkit (Eurogentec), in a Realplex<sup>2</sup> egradient S Mastercycler (Eppendorf) as follows: initial denaturation at 95°C for 5 min, 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, primer annealing at 57°C for 15 s and elongation at 72°C for 20 s. The 16S rRNA gene was used to normalize the results using primers described by Borrel et al. [18].

#### Analyses of the nitro compounds tested and their metabolites

The analyses of the nitro compounds were monitored by HPLC on an Agilent Series 1100 chromatograph, equipped with diode array detector (DAD) and fluorescence detectors (FLDs) and a reverse-phase column (Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>, 3.5  $\mu$ m, 75 mm  $\times$  4.6 mm). The mobile phase was composed of acetonitrile (solvent A) and water or acidified water (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01, % v/v, pH 2.9) (solvent B) in various gradients according to the compound tested (Table 3). Each sample was analysed twice.

<sup>1</sup>H NMR analyses were performed at 25°C at 500.134 MHz on an Avance 500 Bruker spectrometer (Bruker Biospin) equipped with a triple-resonance (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N) inverse probe with tubes of 5-mm diameter containing 600  $\mu$ l of sample (540  $\mu$ l of sample with 60  $\mu$ l of 5 mM tetradeuterated sodium trimethylsilylpropionate); water was suppressed by a classic two-phase-shifted pulse-saturation sequence (double-pulsed field gradient echo sequence WATERGATE) according to Durand et al. [13].

LC–ESI–MS analyses were performed according to previously described conditions [28] on a Waters/Micromass LC–quadrupole (Q)–TOF (Micromass), equipped with an orthogonal geometry Z-spray ion source. The crude supernatants were harvested (5 min at 13 000 g) before LC–MS analyses and directly injected into the LC–MS system, with no further treatment. The analyses were carried out in positive mode for mesotrione samples and negative mode for MNBA ones.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Identification of NR mesotrione-transforming candidates in the *B. megaterium* Mes11 strain

The first step of the project was to screen the NR-coding genes in available genomes of *B. megaterium* for subsequent identification of homologue candidates in the *B. megaterium* Mes11 strain. The UniProt Knowledge Base/SwissProt databases (online version, 28 November 2013) were used to collect NR nucleic acid sequences in the three *B. megaterium* genomes available (GenBank accession numbers CP003017, CP001982 and CP001983), revealing a total of nine genes, all of which coded for oxygen-insensitive type I NRs. Several of these type I NRs were shown to reduce nitro-aromatic compounds [29], suggesting a potential involvement of some of them in the transformation of mesotrione. The NR homologous genes of these three strains were aligned and a set of degenerated primers was designed for each gene (see Table 1). These primer pairs allowed us to successfully amplify the nine homologous NR-coding genes from the genomic DNA of *B. megaterium* Mes11.

To test the Mes11 NRs' activity against mesotrione, the corresponding genes were cloned into a pEXP5-CT/TOPO expression vector and the subsequent His-tagged enzymes were purified. The SDS/PAGE analysis revealed monomer sizes of NRs ranging from 21.9 kDa to 29.3 kDa, which is consistent with their theoretical molecular mass (see Supplementary Figure S1). Of the nine Mes11 NRs tested, only two were capable of reducing the nitro group of mesotrione: NfrA1 (EC 1.5.1.38) and NfrA2/YcnD (EC 1.5.1.39). It is interesting that these two enzymes were also the only ones able to accept MNBA, a metabolite formed as traces (~60  $\mu$ M, monitored by <sup>1</sup>H NMR) by the second and minor pathway previously described [13,28], during mesotrione (10 mM) biotransformation by Mes11.

### Characterization of NfrA1 and NfrA2/YcnD from *B. megaterium* Mes11

#### Structural analysis

The NfrA1 and NfrA2/YcnD Mes11 enzymes belong to the NfsA FRP family of the oxygen-insensitive type I NR, as well as their closest homologues, *B. subtilis* NfrA1 (PDB code 3N2S) and YcnD/NfrA2 (PDB code 1ZCH), sharing 59.44% and 68.16% of amino acid sequence identity, respectively. Mes11 NfrA1 and NfrA2/YcnD both exhibit 40.82% of amino acid sequence identity. The protein structures of NfrA1 and NfrA2/YcnD Mes11 (Figures 1A and 1B), determined by X-ray crystallography at 1.89 Å and 2.84 Å (1 Å = 0.1 nm) resolution adopt the same topology as that of these family members for the monomeric and dimeric forms, which is the active form in solution in accordance with results from gel-filtration chromatography (molecular mass estimates at 58.6 and 56.1 kDa, respectively). Each monomer of 249 amino acids for NfrA1 and 246 residues for NfrA2/YcnD binds an FMN cofactor in the crevice at the dimer interface, and exhibits a three-layer  $\alpha\beta\alpha$ -sandwich central domain and an

Table 3 HPLC conditions for the nitro-compound analyses

Nitro compounds	Solvent	Gradient	Wavelengths	Flow (ml/min)
Mesotriene, MNBA	A: acidified water (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 0.01 % v/v; pH 2.9) B: acetonitrile	0–1 min 2 % B, 1–8 min 2–70 % B linear, 8–9 min 70–100 % B, 9–9.3 min 100–2 % B, 9.3–10.3 min 2 % B	$\lambda = 254$ nm (DAD) $\lambda_{\text{ex}} = 220$ nm $\lambda_{\text{em}} = 430$ nm (FLD)	1
Mesotriene, MNBA	A: acidified water (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 0.01 % v/v; pH 2.9) B: acetonitrile	Longer gradient for metabolite identification 0–5 min 5 % B, 5–30 min 5–70 % B linear, 30–32 min 70–100 % B, 32–33 min 100–5 % B, 33–35 min 5 % B	$\lambda = 254$ nm (DAD) $\lambda_{\text{ex}} = 220$ nm $\lambda_{\text{em}} = 430$ nm (FLD)	1
Parathion-methyl, parathion, dinoseb	A: acidified water (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 0.01 % v/v; pH 2.9) B: acetonitrile	0–1 min 2 % B, 1–8 min 2–100 % B linear, 8–10 min 100 % B, 10–11 min 100–2 % B, 11–12 min 2 % B	$\lambda = 270$ nm (DAD)	1
Chloramphenicol, thiamethoxam, imidaclopride	A: acidified water (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 0.01 % v/v; pH 2.9) B: acetonitrile	0–1 min 2 % B, 1–10 min 2–50 % B linear, 10–11 min 50–100 % B, 11–12 min 100–2 % B	$\lambda = 254$ and 270 nm (DAD)	1
CB1954	A: acidified water (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 0.01 % v/v; pH 2.9) B: acetonitrile	0–1 min 10 % B, 1–19 min 10–30 % B linear, 19–20 min 30–100 % B, 20–20.3 min 100–10 % B	$\lambda = 330$ nm (DAD)	1
Metronidazole	A: acidified water (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 0.01 % v/v; pH 2.9) B: acetonitrile	0–1 min 3 % B, 3–10 min 3–90 % B linear, 10–11 min 90 % B, 11–11.3 min 90–3 % B, 11.3–12 min 3 % B	$\lambda = 230$ nm (DAD)	0.8 (35 °C)
Nitrofurazone	A: water B: acetonitrile	0–1 min 2 % B, 1–10 min 2–50 % B linear, 10–11 min 50–100 % B, 11–12 min 100–2 % B	$\lambda = 375$ nm (DAD)	1
Fluazinam	A: water B: acetonitrile	0–1 min 2 % B, 1–8 min 2–70 % B linear, 8–9 min 70–100 % B, 9–9.3 min 100–2 % B, 9.3–10.3 min 2 % B	$\lambda = 270$ nm (DAD)	0.8

excursion domain. Structural comparison of the four dimers of *B. megaterium* and *B. subtilis* NfrA1 and NfrA2/YcnD leads to RMSDs of between 1 Å and 1.28 Å over 244 C $\alpha$  atoms per monomer, and reveals a very similar FMN-binding pocket, in which the FMN was superimposed with its *re* face accessible to the substrate. Of the 13 residues of *B. megaterium* NfrA1 involved in FMN binding *via* polar or hydrophobic contacts up to 3.7 Å, nine are conserved (Figure 1C). Despite several attempts, we did not obtain crystal structures of each enzyme as a complex with a NAD(P)H cofactor or with the substrates used in the present study.

#### Determination of the optimal pH and temperature for mesotriene transformation by NfrA1 and NfrA2/YcnD

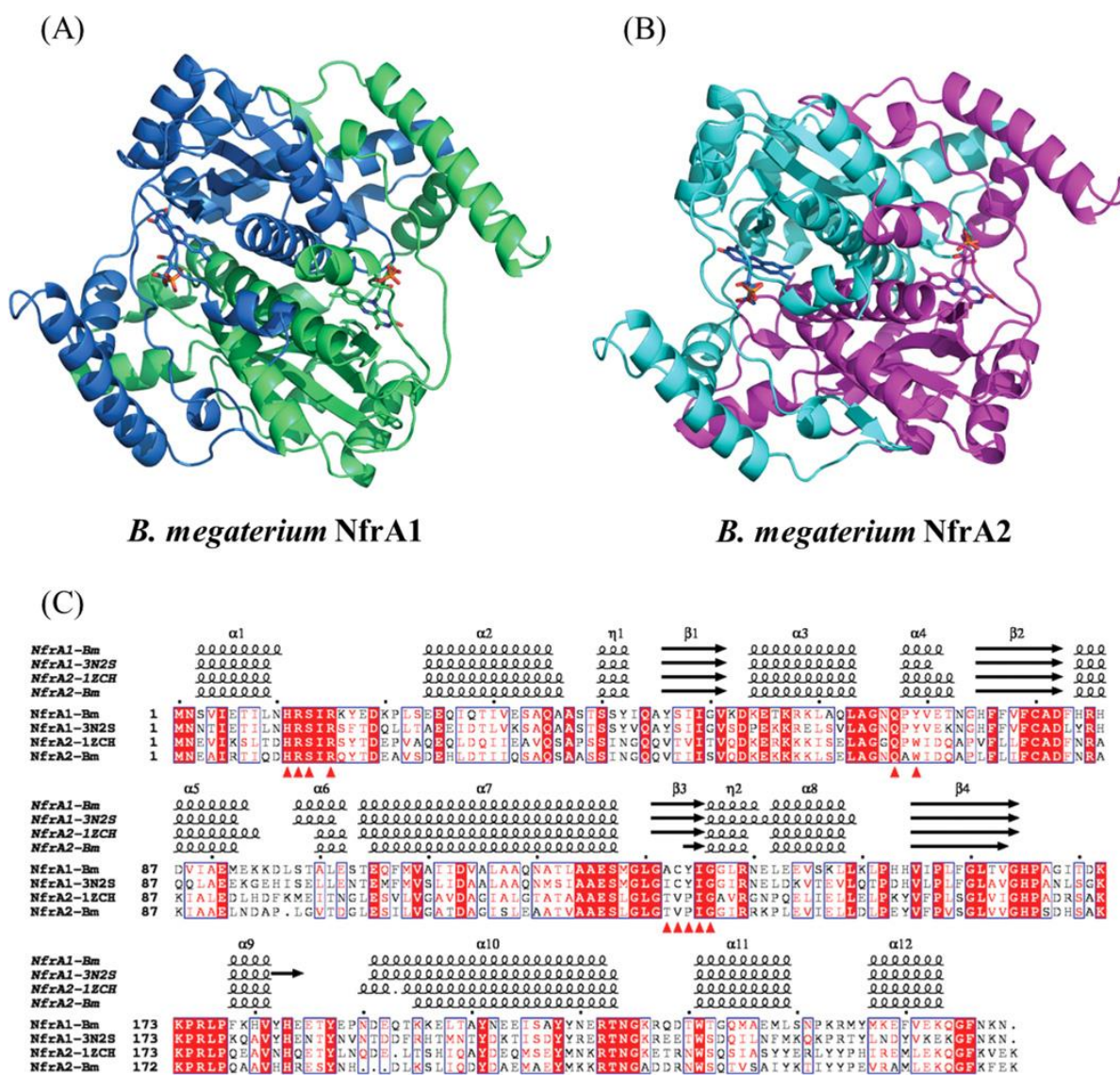
The optimal mesotriene transformation activity of the two enzymes was observed at pH 6–6.5 (Figure 2A). It was below the optimal pH observed for the *B. subtilis* homologues NfrA1 and YcnD/NfrA2, which were pH 7 and 8, respectively [24,31]. It is interesting that both Mes11 enzymes conserved at least 60–80 % of their activities at pH values between 5 and 7.5. This is a relatively broad range of pH compared with other NRs, for which activity often sharply declines above or below the optimal pH [32,33]. The maximum mesotriene transformation activity of NfrA1 and NfrA2/YcnD occurred at around 23–25 °C (Figure 2B), which is similar to NfrA1 and YcnD/NfrA2 of *B. subtilis* [24,31]. Both Mes11 NRs conserved at least 60 % of their maximal activity between 4 and 42 °C, NfrA2/YcnD having almost maximal activity on a broad range of temperatures (4–35 °C). These results could make this enzyme suitable for biotechnological applications requiring catalytic activity

at low temperature or medicinal applications at human body temperature, such as activation of bioreductive prodrugs or antibiotics [34].

#### Reaction mechanism, kinetic parameters and substrate specificity of NfrA1 and NfrA2/YcnD

The mesotriene-transformation activity tests showed that NfrA1 uses NADPH as a cofactor. It is interesting that NfrA2/YcnD uses either NADPH or NADH, although the preference for NADPH over NADH is commonly described for the other NfsA FRP family members. The determination of the reaction mechanism and kinetic parameters of Mes11 NfrA1 and NfrA2/YcnD was carried out with mesotriene and MNBA by following the NAD(P)H oxidation rate at 340 nm. The innate levels of NAD(P)H oxidase activity revealed by enzymatic assays without substrate were checked and, under our conditions (short time), did not interfere with the determination of kinetic parameters. The correlation between the concentrations of NAD(P)H oxidized and each substrate reduced was checked for both enzymes. Spearman's correlation coefficients (*r*) were as follows: (i) NfrA1: NADPH and mesotriene (*r* = 0.9976, *P* < 0.001), NADPH and MNBA (*r* = 0.9980, *P* < 0.001); (ii) NfrA2/YcnD: NADH and mesotriene (*r* = 0.9678, *P* < 0.001), NADH and MNBA (*r* = 0.9946, *P* < 0.001). The analysis of the Lineweaver–Burk plots allowed us to identify a Ping Pong Bi Bi mechanism for NfrA1 and NfrA2/YcnD with MNBA substrate (see Supplementary Figure S2). Similar results were obtained with mesotriene as the electron acceptor (not shown). This mechanism is commonly evidenced for other nitro-FMN reductase superfamily members, including *B. subtilis* NfrA1 and



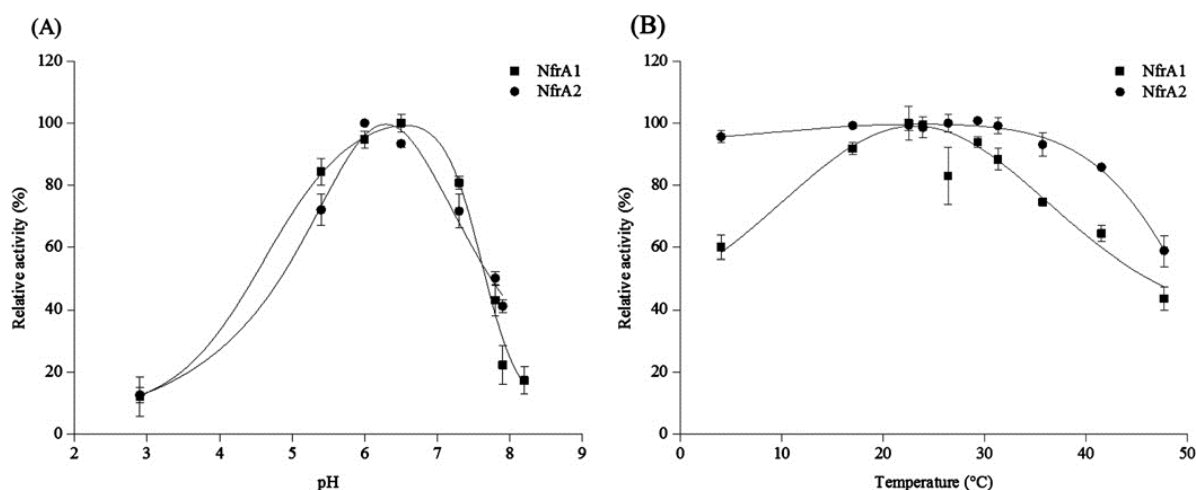


**Figure 1** Representations of the *B. megaterium* dimers

Ribbon representation of (A) NfrA1 and (B) NfrA2/YcnD. FMN cofactors are shown as sticks. (C) Structure-based sequence alignment of *B. megaterium* NfrA1 and NfrA2/YcnD with *B. subtilis* NfrA1 (PDB code 3N2S) and NfrA2 (PDB code 1ZCH). Secondary structure elements are labelled and indicated by coils for  $\alpha$ -helices, arrow for  $\beta$ -strands and h for short  $3_{10}$  helices. Similar residues are in red and identical residues are shown as white letters on a red background. The positions of *B. megaterium* NfrA1 residues involved in FMN binding are indicated by red triangles. The figure was created using ESPript [30].

YcnD/NfrA2, and *E. coli* NfsA (homologue of Mes11 NfrA1) [24,31,35]. Such a mechanism involves entry of NAD(P)H into the active site, reduction of the tightly bound FMN in FMNH<sub>2</sub>, dissociation of NAD(P)<sup>+</sup> and subsequent reduction of the nitro-aromatic compound by FMNH<sub>2</sub>. This mechanism was also confirmed by enzyme assays in the presence of free FMN (results not shown). In this case, the nitro-reduction activities were not observed with mesotriene or MNBA as the electron acceptor, suggesting a competitive inhibitory effect of free FMN against nitro compounds. The secondary plots obtained from the Lineweaver–Burk plot data led us to determine kinetic parameters

of NfrA1 and NfrA2/YcnD (Table 4). The Michaelis–Menten constant,  $K_m$ , of NADPH for NfrA1 and NfrA2/YcnD, and of NADH for NfrA2/YcnD, are about 7, 10 and 28-fold higher than those obtained for their *B. subtilis* homologues NfrA1 and YcnD/NfrA2, respectively [24,31]. The MNBA turnover rate ( $k_{cat}$ ) was higher for NfrA1 than for NfrA2/YcnD, whereas NfrA2/YcnD showed a 4-fold higher mesotriene turnover rate than NfrA1. The  $k_{cat}/K_m$  values for Mes11 NRs indicate less efficiency of NfrA2/YcnD compared with NfrA1 for the reduction of mesotriene or MNBA in the presence of NADPH as the electron donor. In contrast, NfrA2/YcnD showed better efficiency than



**Figure 2** The pH and temperature profiles of mesotrione-transformation activity

The (A) pH and (B) temperature profiles of mesotrione-transformation activity for NfrA1 and NfrA2/YcnD, determined after 1 h of incubation. Relative activity was determined using HPLC analysis as the decrease in the mesotrione chromatogram peak area. Results are reported as means  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Curves of NfrA1 (pH), NfrA2/YcnD (pH), NfrA1 (temperature) and NfrA2/YcnD (temperature) were fitted using OriginPro 8 software (OriginLab) with asymmetrical double sigmoidal function (Asym2Sig,  $R^2=0.9793$ ), Lorentz's function ( $R^2=0.9878$ ), Gauss's function ( $R^2=0.9696$ ) and the Chesler-Cram peak function (CCE,  $R^2=0.9553$ ), respectively.

**Table 4** Kinetic parameters for *B. megaterium* Mes11 NfrA1 and NfrA2/YcnD nitroreductases

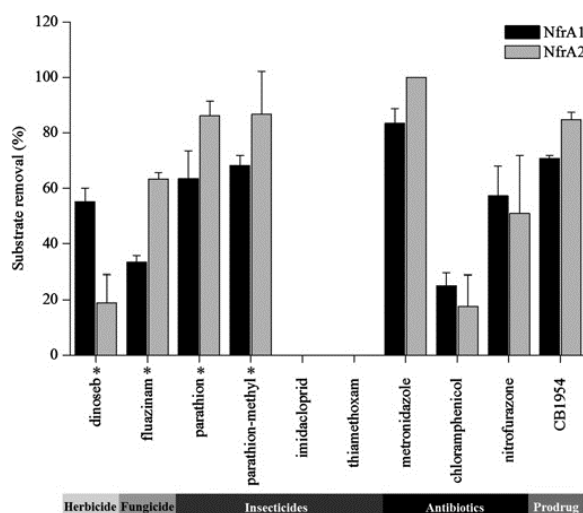
The NAD(P)H constants were estimated with MNBA as electron acceptor. The NfrA1 and NfrA2/YcnD constants for mesotrione and MNBA were estimated with  $^3\text{NADPH}$  or  $^3\text{NADH}$  as the electron donor. The results are reported as the means  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ).

	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	$k_{\text{cat}}$ (/min)	$k_{\text{cat}}/K_m$ (/ $\mu\text{M}$ per min)
<b>NfrA1</b>				
NADPH	$28.49 \pm 0.31$	$24.45 \pm 1.83$	$57.32 \pm 4.28$	$1.92 \pm 0.03$
Mesotrione <sup>a</sup>	$24.57 \pm 3.78$	$11.28 \pm 0.42$	$6.61 \pm 0.25$	$0.27 \pm 0.04$
MNBA <sup>a</sup>	$217.87 \pm 32.10$	$25.45 \pm 1.92$	$59.66 \pm 4.51$	$0.28 \pm 0.02$
<b>NfrA2/YcnD</b>				
NADPH	$42.60 \pm 23.76$	$28.52 \pm 5.04$	$9.74 \pm 1.72$	$0.38 \pm 0.06$
Mesotrione <sup>a</sup>	$327.65 \pm 64.42$	$65.55 \pm 15.06$	$22.38 \pm 5.14$	$0.07 \pm 0.01$
MNBA <sup>a</sup>	$101.10 \pm 17.82$	$26.98 \pm 2.86$	$9.21 \pm 0.98$	$0.09 \pm 0.03$
NADH	$176.31 \pm 8.70$	$23.67 \pm 2.66$	$13.28 \pm 1.50$	$0.07 \pm 0.01$
Mesotrione <sup>b</sup>	$67.99 \pm 6.81$	$44.33 \pm 4.87$	$24.87 \pm 2.73$	$0.37 \pm 0.01$
MNBA <sup>b</sup>	$37.45 \pm 6.23$	$23.79 \pm 2.54$	$13.35 \pm 1.43$	$0.36 \pm 0.02$

NfrA1 for nitro reduction of both substrates when NADH was used as the electron donor.

The type I NRs previously described possess a broad substrate specificity [36]. It is interesting that both NfrA1 and NfrA2/YcnD could also transform various nitro compounds, indicating that they do not present substrate specificity (Figure 3 and see Supplementary Figure S3). The only exceptions were two neonicotinoid insecticides (imidacloprid and thiamethoxam) for which the nitro group is not aromatic.

Surprisingly, they were able to reduce nitro groups of the herbicide dinoseb and the fungicide fluazinam, even if, until now, these biotransformations have been described only in anaerobic conditions [37–40]. NfrA1 and NfrA2/YcnD of *B. megaterium* could also reduce the nitro group of the parathion-methyl and

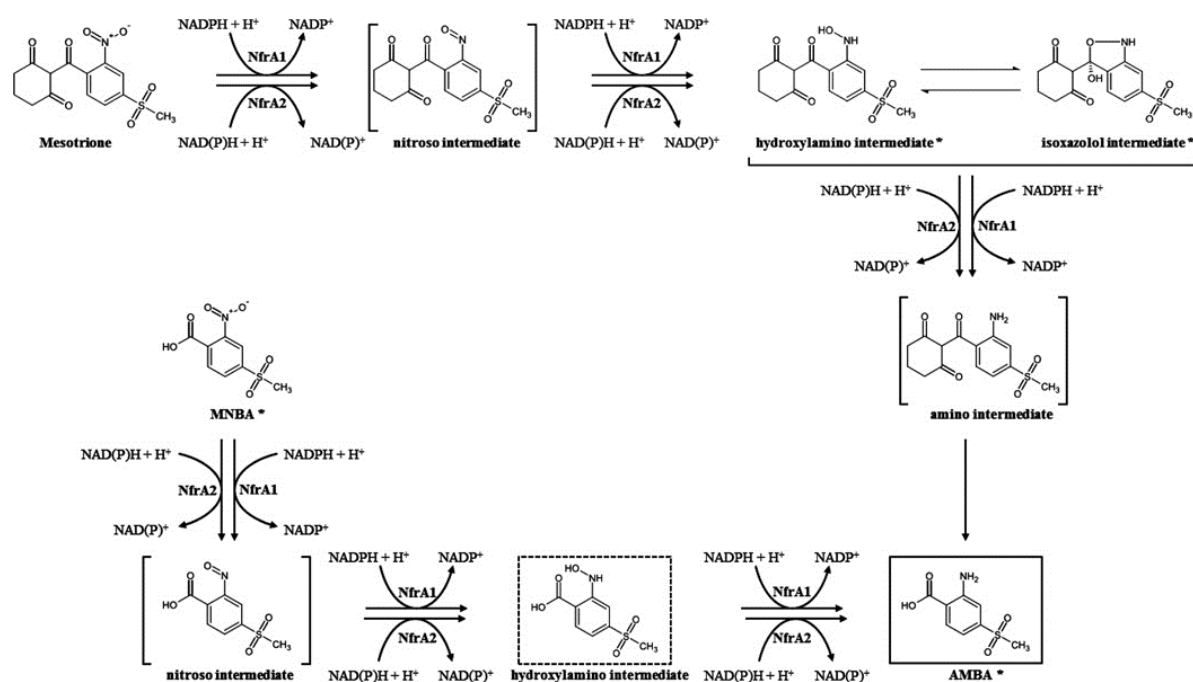


**Figure 3** Mes11 NfrA1 and NfrA2/YcnD NR activities on various nitro compounds determined by HPLC

The incubations were carried out for 1 h at the optimal pH (6) and temperature (25°C) in NPB with 1.8  $\mu\text{M}$  NfrA1 or NfrA2/YcnD and 400  $\mu\text{M}$  substrate except in the case of (\*) dinoseb and methyl-parathion (200  $\mu\text{M}$ ), parathion (80  $\mu\text{M}$ ) and fluazinam (5  $\mu\text{M}$ ) due to their lower solubilities. The results are reported as means  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ).

parathion insecticides in high proportions (Figure 3), although only hydrolase and esterase activities have been described for the first transformation step of these molecules [41–44].

The bacterial NRs have already been described as being involved in the modulation of antibiotic resistance, mainly against metronidazole [36]. It is interesting that antibiotics such as metronidazole, chloramphenicol and nitrofurazone can also be substrates for Mes11 NfrA1 and NfrA2/YcnD (Figure 3).



**Figure 4** Proposed scheme of mesotriprone and MNBA biotransformation by NfrA1 and NfrA2/YcnD

The brackets indicate the undetected intermediates during enzymatic assays. The major end-product of mesotriprone (square box) and MNBA (dotted box) are indicated. \*Mesotriprone transformation products also detected in *B. megaterium* Mes11 resting cell experiments [11] (the present study).

Metronidazole and nitrofurazone are activated when their nitro group is reduced whereas chloramphenicol is more active than its hydroxylamino and amino derivatives [36,45]. The high metronidazole and nitrofurazone, and low chloramphenicol, transformation rates by Mes11 NRs (Figure 3) could thus explain the sensitivity of the Mes11 strain to these three molecules (results not shown).

Furthermore, the two Mes11 NRs could also reduce the prodrug CB1954, suggesting that they could be used as prodrug activators (Figure 3). Indeed, the NRs have already been used in cancer therapy to activate a nitro-substituted prodrug into a cytotoxic hydroxylamino derivative by reduction of the nitro group [36,46].

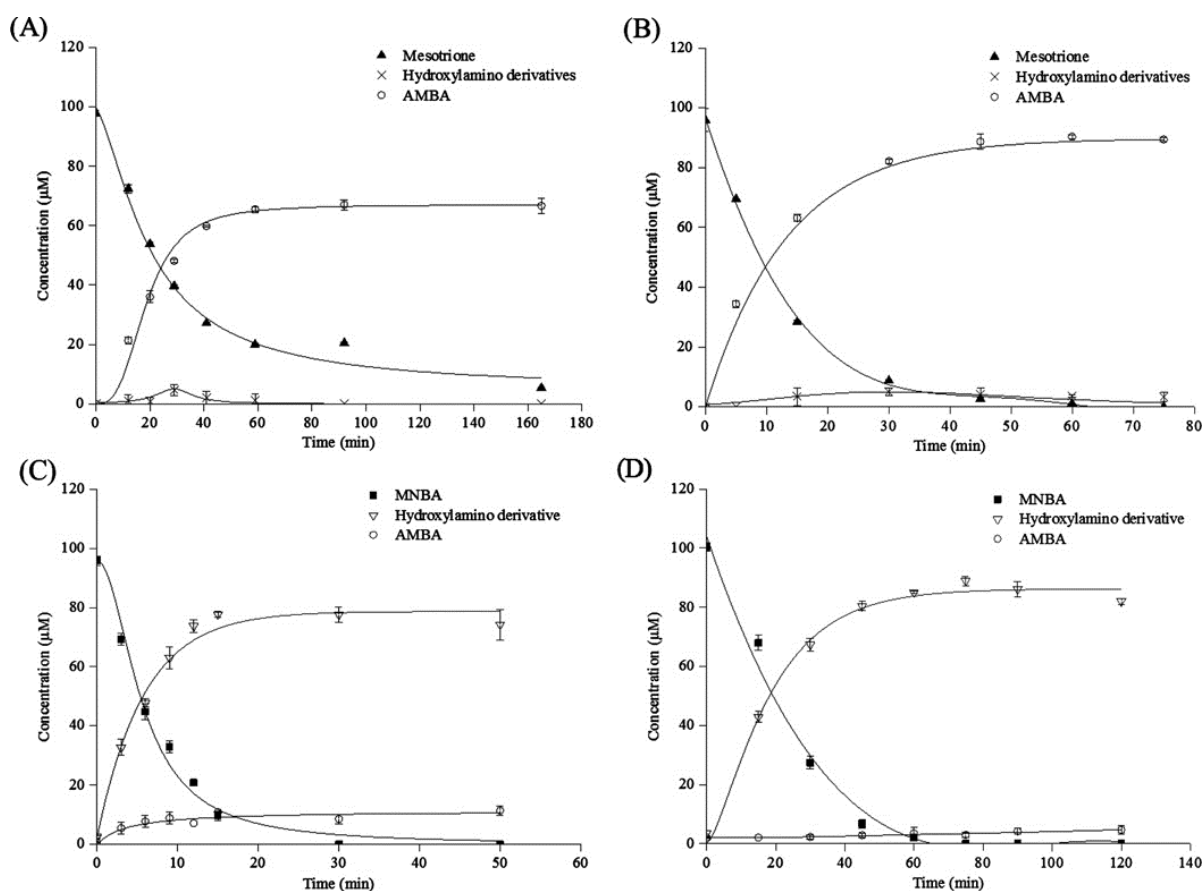
#### Biotransformation of mesotriprone and MNBA by NfrA1 and NfrA2/YcnD

The biotransformation of mesotriprone and MNBA by NfrA1 and NfrA2/YcnD was investigated in more detail, showing the formation of nitro-reduced products previously described with the *B. megaterium* Mes11 strain [11] (Figure 4).

The reduction of the nitro group of mesotriprone by Mes11 NfrA1 and NfrA2/YcnD required three molecules of NAD(P)H cofactor, which is consistent with the stoichiometry of the reduction of nitro compounds [29]. Three mesotriprone nitro-reduced products were detected and identified by UV, <sup>1</sup>H NMR and LC-MS as previously described [13]: the hydroxylamino derivative in equilibrium with the cyclized isoxazolol intermediate and AMBA, the final and accumulating metabolite also observed with the Mes11 strain (Figures 4 and 5). The nitroso intermediate was not detected, probably due to the higher reaction rate of the second two-electron transfer compared with the first one. This

phenomenon has already been described with other NRs [47,48]. The amino intermediate, theoretically formed as the NR end-product of the complete reduction of the mesotriprone nitro group, was not identified in our experiments, probably due to its spontaneous hydrolysis leading to the formation of AMBA under the slightly acidic conditions used in the enzymatic assay (pH 6). It could be explained by replacing the deactivating mesomeric effect of the nitro group by the activating one of the amino group. Moreover, the involvement of two enzymes to transform mesotriprone into AMBA has been previously hypothesized in a resting cell experiment [11], one enzyme being responsible for the nitro reduction and another for the oxidative cleavage of the molecule. However, our *in vitro* enzymatic assays with only Mes11 NR lead to the end-product AMBA, suggesting that the second step is probably an abiotic one and that mesotriprone could be completely transformed to the final metabolite by only one type of enzyme in Mes11 culture experiments. The quantitative time-course transformation of the mesotriprone and mass balance calculation (Figures 5A and 5C) correlate with the data previously observed in *B. megaterium* Mes11 resting cell experiments [11].

Similar results were obtained with MNBA as the electron acceptor, with no detection of a nitroso intermediate. Two MNBA nitro-reduction products were detected: the hydroxylamino derivative (major proportion) identified by UV (specific band at 355 nm [49,50] and LC-(−)ESI-MS (high-resolution MS) (*m/z* = 230.0118, C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>5</sub>S<sup>−</sup> with a mass error of 0.5 mDa), and AMBA (minor proportion), identified by comparison of the different spectroscopic data with a standard; this showed the capacity of NfrA1 and NfrA2/YcnD to reduce the nitro groups *via* the common mechanism of type I NRs (Figures 4 and 5).



**Figure 5** Quantification of mesotrione and MNBA

(A and B) Quantification of mesotrione and (C and D) MNBA during incubation with (A and C) NfrA1 and (B and D) NfrA2/YcnD. The incubations were carried out in NPB at optimal pH (6) and temperature (25 °C), with 2.4  $\mu\text{M}$  NfrA1 or NfrA2/YcnD, 100  $\mu\text{M}$  mesotrione or MNBA, and 400  $\mu\text{M}$  NADPH. The final concentrations ( $\mu\text{M}$ ) were: (A) mesotrione  $3.8 \pm 0.1$ , hydroxylamino derivatives  $5.9 \pm 3.8$  and AMBA  $67.7 \pm 1.3$ ; (B) mesotrione  $0.0 \pm 0.0$ , hydroxylamino derivatives  $3.3 \pm 1.7$  and AMBA  $89.4 \pm 0.7$ ; (C) MNBA  $0.0 \pm 0.0$ , hydroxylamino derivative  $83.9 \pm 2.7$  and AMBA  $10.6 \pm 1.5$ ; and (D) MNBA  $0.0 \pm 0.0$ , hydroxylamino derivative  $76.1 \pm 1.5$  and AMBA  $8.6 \pm 1.5$ . The results are reported as means  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

The quantitative time-course transformation of the MNBA and mass balance calculation are shown in Figures 5(B) and 5(D). The presence of an MNBA hydroxylamino intermediate was not reported in experiments with Mes11 resting cell cultures, probably due to its rapid transformation into AMBA under *in situ* conditions.

#### Influence of mesotrione on *nfrA1* and *nfrA2/ycnD* gene expression levels in *B. megaterium* Mes11

We investigated the *nfrA1* and *nfrA2/ycnD* gene expression levels in the presence of mesotrione to gain insight into the possible role of these enzymes in Mes11 resting cell experiments. A similar growth of Mes11 was observed in tryptone soya medium supplemented or not with mesotrione. The disappearance of mesotrione ( $52.7 \pm 2.6\%$  in 15 h) was measured, together with the up-regulation of *nfrA1* ( $2 \pm 0.5$ -fold) and *nfrA2/ycnD* ( $5.5 \pm 1$ -fold) genes, suggesting that both genes are mesotrione-inducible. These results suggest that NfrA1 and NfrA2/YcnD could be involved in mesotrione biotransformation in *B. megaterium* Mes11 cells. However, the physiological involvement of these two enzymes in mesotrione

and MNBA transformation could not be proved because all of the transformation methods used ( $\text{CaCl}_2$  transformation, electroporation, protoplast transformation, conjugation) to obtain NfrA mutants failed, thus preventing us from ascertaining their role in *B. megaterium* Mes11.

#### Conclusions

The identification of NfsA FRP enzymes in three genera (*Bacillus*, *Pantoea* and *Escherichia*) containing strains able to biotransform mesotrione into hydroxylamino intermediates and AMBA [9] strongly suggests that there could be a common mesotrione-biotransformation process involving this enzyme family, allowing the development of a specific biomarker of mesotrione biotransformation in various ecosystems.

The broad activity spectrum of both Mes11 NRs on various nitro compounds such as antibiotics, pesticides and prodrugs could lead to their potential use in biotechnology, as already described for other NRs, to develop, for example, *in situ* electrochemical biosensors for the detection of nitro-aromatic compounds, bioremediation processes or enzyme prodrug therapy applications. Such investigations are in progress in our laboratory.

## AUTHOR CONTRIBUTION

Isabelle Batisson carried out the screening of genes and primer design. Louis Carles, Muriel Joly and Isabelle Batisson carried out the design of experiments, protein expression and purification for kinetic assays, the screening of protein activities and functional analyses, as well as interpretation of the results. Louis Carles and Muriel Joly carried out the gene expression analyses. Pascale Besse-Hoggan carried out the chemical analyses and metabolite identification. Armelle Vigouroux and Solange Moréra carried out the protein purification for crystallization, the crystallization itself and the structural analyses. All authors contributed to the writing of the paper, with Louis Carles, Pascale Besse-Hoggan and Isabelle Batisson making major contributions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Egon Heuson and Franck Charmantray for helpful advice and suggestions and Philip Hoggan for English reviewing. We acknowledge SOLEIL for provision of Synchrotron radiation facilities (proposal ID 20140774) in using beamlines Proxima 1 and 2.

## FUNDING

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche [grant number ANR-13-CESA-0002 TRICETOX] (programme CESA), the Région Auvergne, the French Ministry for Higher Education and Research and the European Regional Development Fund. This work has benefited from the I2BC crystallization platform, supported by French Infrastructure for Integrated Structural Biology [grant number FRISBI ANR-10-INSB-05-01].

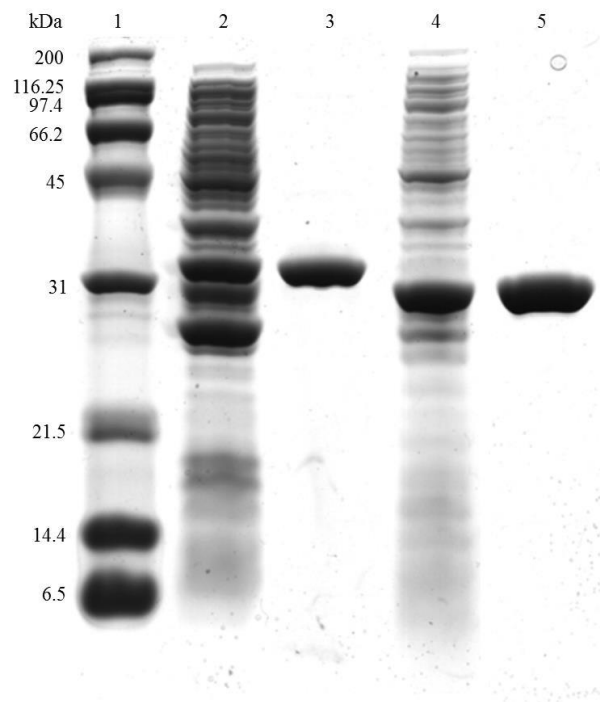
## REFERENCES

- Cantrell, C.L., Dayan, F.E. and Duke, S.O. (2012) Natural products as sources for new pesticides. *J. Nat. Prod.* **75**, 1231–1242 [CrossRef PubMed](#)
- Duke, S., Owens, D. and Dayan, F. (2014) The growing need for biochemical bioherbicides. In *ACS Symposium Series*, pp. 31–43, American Chemical Society, Washington [CrossRef](#)
- Bonnet, J.L., Bonnemoy, F., Dusser, M. and Bohatier, J. (2008) Toxicity assessment of the herbicides sulcotriione and mesotrione toward two reference environmental microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **55**, 576–583 [CrossRef PubMed](#)
- Barchanska, H. (2012) Triketones herbicides: expectations and risk. In *Advances in chemistry research* (Taylor, J.C., ed.), pp. 243–264, Nova Science Publishers, New York
- Chaabane, H., Vulliet, Calvayrac, E., Coste, C., -M., C. and Cooper, J.-F. (2008) Behaviour of sulcotriione and mesotrione in two soils. *Pest Manag. Sci.* **64**, 86–93 [CrossRef PubMed](#)
- Dyson, J.S., Beulke, S., Brown, C.D. and Lane, M.C.G. (2002) Adsorption and degradation of the weak acid mesotrione in soil and environmental fate implications. *J. Environ. Qual.* **31**, 613–618 [CrossRef PubMed](#)
- Alferness, P. and Wiebe, L. (2002) Determination of mesotrione residues and metabolites in crops, soil, and water by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3926–3934 [CrossRef PubMed](#)
- Durand, S., Amato, P., Sancelme, M., Delort, A.-M., Combourieu, B. and Besse-Hoggan, P. (2006) First isolation and characterization of a bacterial strain that biotransforms the herbicide mesotrione. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**, 222–228 [CrossRef PubMed](#)
- Youness, M. (2013) Impact de la Formulation et du Mélange de Deux Pesticides (Mésotrione et Tébuconazole) sur Leur Biotransformation et la Croissance de Microorganismes. Ph.D. Thesis, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France
- Liu, J., Chen, S., Ding, J., Xiao, Y., Han, H. and Zhong, G. (2015) Sugarcane bagasse as support for immobilization of *Bacillus pumilus* HZ-2 and its use in bioremediation of mesotrione-contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 10839–10851 [CrossRef PubMed](#)
- Batisson, I., Crouzet, O., Besse-Hoggan, P., Sancelme, M., Mangot, J.-F., Mallet, C. and Bohatier, J. (2009) Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp. from soil. *Environ. Pollut.* **157**, 1195–1201 [CrossRef PubMed](#)
- Romdhane, S., Devers-Lamrani, M., Martin-Laurent, F., Calvayrac, C., Racobay-Faquet, E., Riboul, D., Cooper, J.-F. and Barthelmebs, L. (2016) Isolation and characterization of *Bradyrhizobium* sp. SR1 degrading two  $\beta$ -triketone herbicides. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **23**, 4138–4148 [PubMed](#)
- Durand, S., Sancelme, M., Besse-Hoggan, P. and Combourieu, B. (2010) Biodegradation pathway of mesotrione: Complementarities of NMR, LC-NMR and LC-MS for qualitative and quantitative metabolic profiling. *Chemosphere* **81**, 372–380 [CrossRef PubMed](#)
- Bardot, C., Besse-Hoggan, P., Carles, L., Le Gall, M., Clary, G., Chafey, P., Federici, C., Brossard, C. and Batisson, I. (2015) How the edaphic *Bacillus megaterium* strain Mes11 adapts its metabolism to the herbicide mesotrione pressure. *Environ. Pollut.* **199**, 198–208 [CrossRef PubMed](#)
- Peterson, F.J., Mason, R.P., Hovsepian, J. and Holtzman, J.L. (1979) Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *J. Biol. Chem.* **254**, 4009–4014 [PubMed](#)
- Bryant, D.W., McCalla, D.R., Leeksa, M. and Laneville, P. (1981) Type I nitroreductases of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **27**, 81–86 [CrossRef PubMed](#)
- Mason, R.P. and Holtzman, J.L. (1975) The role of catalytic superoxide formation in the O<sub>2</sub> inhibition of nitroreductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**, 1267–1274 [CrossRef PubMed](#)
- Borrel, G., Lehours, A.-C., Crouzet, O., Jézéquel, D., Rockne, K., Kulczak, A., Duffaud, E., Joblin, K. and Fonty, G. (2012) Stratification of archaea in the deep sediments of a freshwater meromictic lake: vertical shift from methanogenic to uncultured archaeal lineages. *PLoS One* **7**, e43346 [CrossRef PubMed](#)
- Bers, K., Batisson, I., Proost, P., Wattiez, R., De Mot, R. and Springael, D. (2013) HylA, an alternative hydrolase for initiation of catabolism of the phenylurea herbicide linuron in *Variovorax* sp. strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 5258–5263 [CrossRef PubMed](#)
- Kabsch, W. (2010) Xds. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 [CrossRef PubMed](#)
- Karplus, P.A. and Diederichs, K. (2012) Linking crystallographic model and data quality. *Science* **336**, 1030–1033 [CrossRef PubMed](#)
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C. and Read, R.J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674 [CrossRef PubMed](#)
- Cortial, S., Chaignon, P., Iorga, B.I., Aymerich, S., Truan, G., Gueguen-Chaignon, V., Meyer, P., Moréra, S. and Ouazzani, J. (2010) NADH oxidase activity of *Bacillus subtilis* nitroreductase NfrA1: insight into its biological role. *FEBS Lett.* **584**, 3916–3922 [CrossRef PubMed](#)
- Morokutti, A., Lyskowski, A., Sollner, S., Pointner, E., Fitzpatrick, T.B., Kratky, C., Gruber, K. and Macheroux, P. (2005) Structure and function of YncD from *Bacillus subtilis*, a flavin-containing oxidoreductase. *Biochemistry* **44**, 13724–13733 [CrossRef PubMed](#)
- Blanc, E., Roversi, P., Vonrhein, C., Flensburg, C., Lea, S.M. and Bricogne, G. (2004) Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2210–2221 [CrossRef PubMed](#)
- Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 [CrossRef PubMed](#)
- Dugat-Bony, E., Missaoui, M., Peyretailade, E., Biderre-Petit, C., Bouzid, O., Gouinaud, C., Hill, D. and Peyret, P. (2011) HiSpOD: probe design for functional DNA microarrays. *Bioinformatics* **27**, 641–648 [CrossRef PubMed](#)
- Durand, S., Légeret, B., Martin, A.-S., Sancelme, M., Delort, A.-M., Besse-Hoggan, P. and Combourieu, B. (2006) Biotransformation of the triketone herbicide mesotrione by a *Bacillus* strain. Metabolite profiling using liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 2603–2613 [CrossRef PubMed](#)
- Roldán, M.D., Pérez-Reinado, E., Castillo, F. and Moreno-Viván, C. (2008) Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 474–500 [CrossRef PubMed](#)
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I. and Metz, F. (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**, 305–308 [CrossRef PubMed](#)
- Zenko, S., Kobori, T., Tanokura, M. and Saigo, K. (1998) Purification and characterization of NfrA1, a *Bacillus subtilis* nitro/flavin reductase capable of interacting with the bacterial luciferase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1978–1987 [CrossRef PubMed](#)
- Kim, H.-Y. and Song, H.-G. (2005) Purification and characterization of NAD(P)H-dependent nitroreductase I from *Klebsiella* sp. C1 and enzymatic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 766–773 [CrossRef PubMed](#)
- Kim, Y.-H., Song, W.-S., Go, H., Cha, C.-J., Lee, C., Yu, M.-H., Lau, P.C.K. and Lee, K. (2013) 2-Nitrobenzoate 2-nitroreductase (NbaA) switches its substrate specificity from 2-nitrobenzoic acid to 2,4-dinitrobenzoic acid under oxidizing conditions. *J. Bacteriol.* **195**, 180–192 [CrossRef PubMed](#)
- Prosser, G.A., Copp, J.N., Mowday, A.M., Guise, C.P., Syddall, S.P., Williams, E.M., Horvat, C.N., Swe, P.M., Ashoorzadeh, A., Denny, W.A. et al. (2013) Creation and screening of a multi-family bacterial oxidoreductase library to discover novel nitroreductases that efficiently activate the bioreductive prodrugs CB1954 and PR-104A. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 1091–1103 [CrossRef PubMed](#)
- Zenko, S., Koike, H., Kumar, A.N., Jayaraman, R., Tanokura, M. and Saigo, K. (1996) Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* major nitroreductase exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a *Vibrio Harveyi* flavin oxidoreductase. *J. Bacteriol.* **178**, 4508–4514 [PubMed](#)
- De Oliveira, I.M., Bonatto, D. and Henriques, J.A.P. (2010) Nitroreductases: enzymes with environmental, biotechnological and clinical importance. *Reactions* **3**, 6

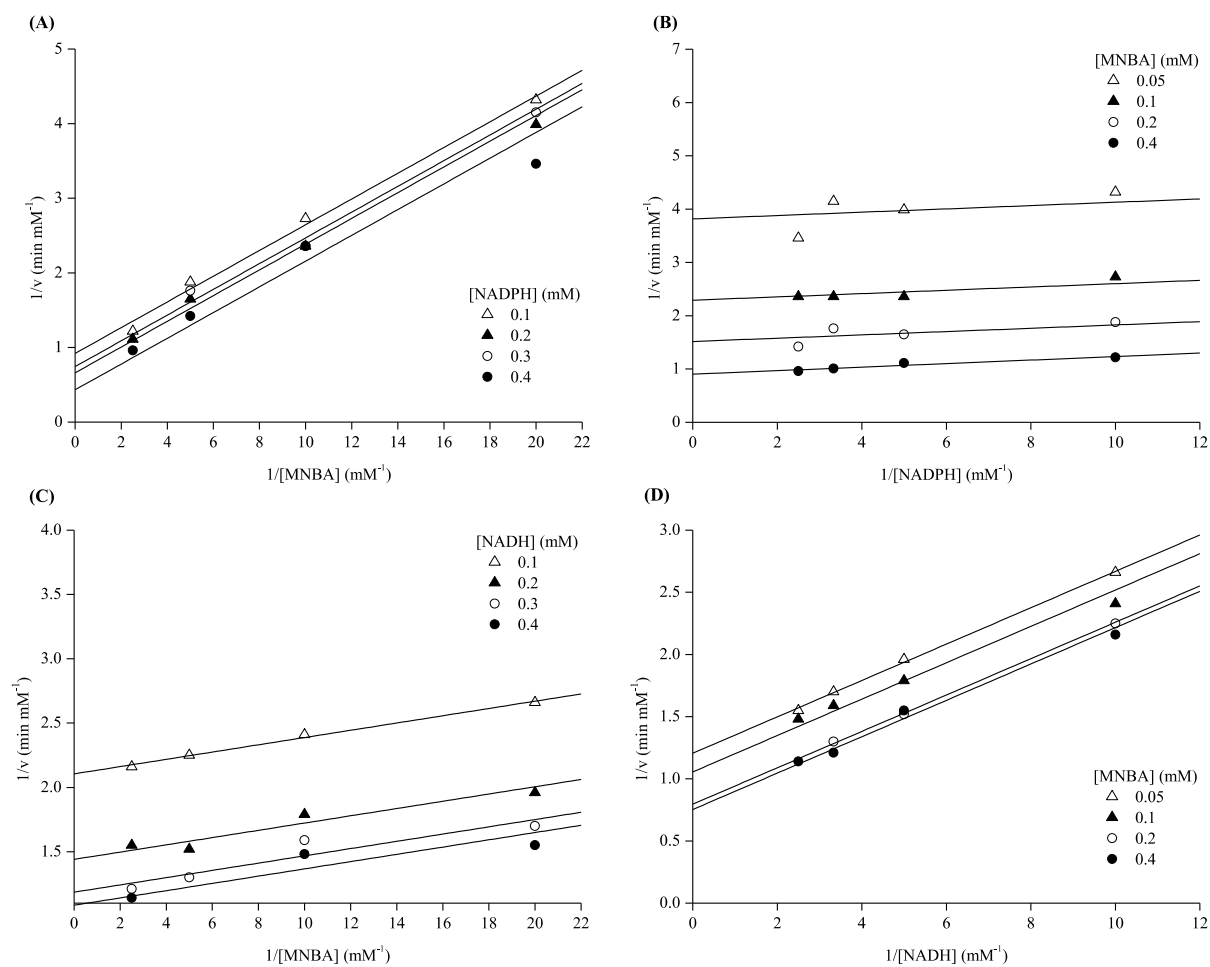


- 37 Hammill, T.B. and Crawford, R.L. (1996) Degradation of 2-sec-butyl-4, 6-dinitrophenol (dinoseb) by *Clostridium bifementans* KMR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1842–1846 [PubMed](#)
- 38 Hutson, D.H. (1998) *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Herbicides and Plant Growth Regulators*, Royal Society of Chemistry, Cambridge
- 39 Kaake, R.H., Crawford, D.L. and Crawford, R.L. (1995) Biodegradation of the nitroaromatic herbicide dinoseb (2-sec-butyl-4, 6-dinitrophenol) under reducing conditions. *Biodegradation* **6**, 329–337 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 40 European Food Safety Authority (2008) Conclusion Regarding the Peer Review of the Pesticide Risk Assessment of the Active Substance Fluazinam. EFSA Scientific Report 137
- 41 Serdar, C.M. and Gibson, D.T. (1985) Enzymatic hydrolysis of organophosphates: cloning and expression of a parathion hydrolase gene from *Pseudomonas diminuta*. *Bio/Technology* **3**, 567–571 [CrossRef](#)
- 42 Mulbry, W.W. and Karns, J.S. (1989) Purification and characterization of three parathion hydrolases from gram-negative bacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 289–293 [PubMed](#)
- 43 Alvarenga, N., Birolli, W.G., Selegim, M.H.R. and Porto, A.L.M. (2014) Biodegradation of methyl parathion by whole cells of marine-derived fungi *Aspergillus sydowii* and *Penicillium decaturense*. *Chemosphere* **117**, 47–52 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 44 Hao, J., Liu, J. and Sun, M. (2014) Identification of a marine *Bacillus* strain C5 and parathion-methyl degradation characteristics of the extracellular esterase B1. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 863094 [PubMed](#)
- 45 Smith, A.L., Erwin, A.L., Kline, T., Unrath, W.C.T., Nelson, K., Weber, A. and Howald, W.N. (2007) Chloramphenicol is a substrate for a novel nitroreductase pathway in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 2820–2829 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 46 Williams, E.M., Little, R.F., Mowday, A.M., Rich, M.H., Chan-Hyams, J.V.E., Copp, J.N., Small, J.B., Patterson, A.V. and Ackerley, D.F. (2015) Nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy: insights and advances toward clinical utility. *Biochem. J.* **471**, 131–153 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 47 Koder, R.L., Haynes, C.A., Rodgers, M.E., Rodgers, D.W. and Miller, A.-F. (2002) Flavin thermodynamics explain the oxygen insensitivity of enteric nitroreductases. *Biochemistry* **41**, 14197–14205 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 48 Race, P.R., Lovering, A.L., Green, R.M., Ossor, A., White, S.A., Searle, P.F., Wrighton, C.J. and Hyde, E.I. (2005) Structural and mechanistic studies of *Escherichia coli* nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone. *J. Biol. Chem.* **280**, 13256–13264 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 49 Barth, A., Corrie, J.E.T., Gradwell, M.J., Maeda, Y., Mantele, W., Meier, T. and Trentham, D.R. (1997) Time-resolved infrared spectroscopy of intermediates and products from photolysis of 1-(2-nitrophenyl)ethyl phosphates: reaction of the 2-nitrosoacetophenone byproduct with thiols. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 4149–4159 [CrossRef](#)
- 50 Uncuta, C., Tudose, A., Caproiu, M.T., Udrea, S. and Roussel, C. (2003) Correction to withdrawn article. Cyclization products of  $\delta$ -oxo- $\alpha,\beta$ -unsaturated ketoxime during reaction with hydrochloric acid in anhydrous diethyl ether. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1789–1795 [CrossRef](#)

Received 12 January 2016/11 March 2016; accepted 22 March 2016  
Accepted Manuscript online 22 March 2016, doi:10.1042/BJ20151366

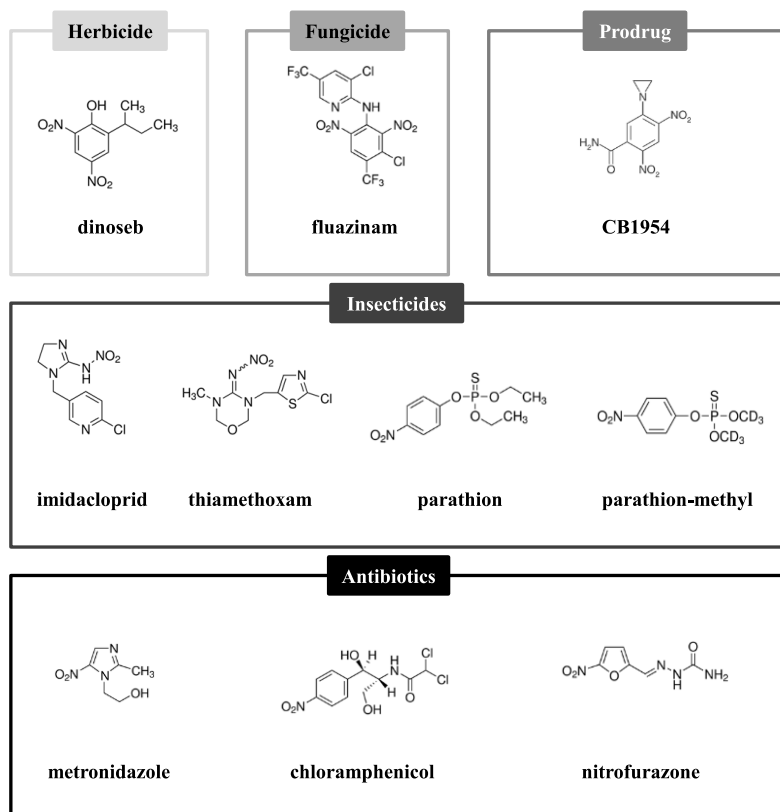


**Figure S1.** SDS-PAGE analysis of NfrA1 and NfrA2/YcnD. Bio-Rad Molecular Weight Standard (lane 1); crude cell extracts from BL21 Star (DE3) pLysS expressing pEXP5-CT\_NfrA1 (lane 2) and pEXP5-CT\_NfrA2/YcnD (lane 4); Ni-NTA purified NfrA1 (lane 3) and NfrA2/YcnD (lane 5).



**Figure S2.** Determination of the reaction mechanism of NfrA1 (A and B) and NfrA2/YcnD (C and D) with Lineweaver-Burk plots. Double-reciprocal plots of initial velocity versus concentrations of MNBA (A and C), NADPH (B) or NADH (D). The nitroreductase activity was assayed with various concentrations of NADPH (A), NADH (C), or MNBA (B and D) as indicated on plot legends. The reaction mixture (600  $\mu\text{l}$ ) contained 0.43  $\mu\text{M}$  of NfrA1 or 1.78  $\mu\text{M}$  of NfrA2/YcnD in a 50 mM sodium phosphate buffer pH 6 at 25°C. The reaction was initiated by the addition of NAD(P)H. Linear fitting was realized using OriginPro 8 software (OriginLab Corporation).





**Figure S3.** Chemical structures of the nitro-compounds tested with NfrA1 and NfrA2/YcnD enzymes.

### Principales conclusions de l'étude :

Deux nitroréductases, NfrA1 et NfrA2, de la souche *Bacillus megaterium* Mes11 ont montré leur capacité à transformer totalement la mésotrione et le MNBA et ont été caractérisées fonctionnellement et structurellement.

Elles appartiennent à la sous-famille NfsA-FRP des Nitro-FMN réductases.

Ce sont des nitroréductases de Type I (insensibles à l'oxygène), assemblées en homo-dimères, ayant une activité optimale à pH 6-6,5 et à 23-25 °C.

Elles transforment la mésotrione et le MNBA, *via* un mécanisme réactionnel ordonné de type Bi-Bi Ping Pong.

Elles sont également capables de transformer d'autres composés nitro-aromatiques tels que des insecticides et des antibiotiques.

## **2. Caractérisation des voies de dégradation du nicosulfuron et toxicité des métabolites**

Les cultures d'enrichissement menées à partir de sol agricole de la plaine de Limagne ont permis d'isoler une souche capable de transformer le nicosulfuron. Cette souche a alors été utilisée pour identifier les voies de biotransformation de cette molécule. La toxicité des métabolites produits a également été évaluée par le test standardisé Microtox<sup>®</sup>. Ces travaux sont décrits dans l'article ci-après (Carles *et al.*, 2017).





Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Hazardous Materials

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jhazmat](http://www.elsevier.com/locate/jhazmat)

# Identification of sulfonylurea biodegradation pathways enabled by a novel nicosulfuron-transforming strain *Pseudomonas fluorescens* SG-1: Toxicity assessment and effect of formulation



Louis Carles<sup>a,b,c</sup>, Muriel Joly<sup>a,b</sup>, Frédérique Bonnemoy<sup>a,b</sup>, Martin Lereboure<sup>a,c</sup>,  
Isabelle Batisson<sup>a,b,\*,1</sup>, Pascale Besse-Hoggan<sup>a,c,\*,1</sup>

<sup>a</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup> CNRS, UMR 6023, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, TSA 60026, CS 60026, 63178 Aubière Cedex, France

<sup>c</sup> CNRS, UMR 6296, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, TSA 60026, CS 60026, 63178 Aubière Cedex, France

## HIGHLIGHTS

- A nicosulfuron-transforming strain *P. fluorescens* has been isolated and characterized.
- Two major metabolites of nicosulfuron were identified (ADMP and ASDM).
- ADMP is 20-fold more toxic toward *A. fischeri* than nicosulfuron.
- Formulated-nicosulfuron biotransformation is lower than that of the active ingredient.
- Other sulfonylureas are biotransformed by this strain through various pathways.

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 10 August 2016

Received in revised form 19 October 2016

Accepted 21 October 2016

Available online 22 October 2016

### Keywords:

Nicosulfuron  
Metsulfuron-methyl  
Tribenuron-methyl  
Metabolite  
Microtox®

## ABSTRACT

Nicosulfuron is a selective herbicide belonging to the sulfonylurea family, commonly used on maize culture. A bacterial strain SG-1 was isolated from an agricultural soil previously treated with nicosulfuron. This strain was identified as *Pseudomonas fluorescens* and is able to quantitatively dissipate 77.5% of nicosulfuron (1 mM) at 28 °C in the presence of glucose within the first day of incubation. Four metabolites were identified among which ASDM (2-(aminosulfonyl)-N,N-dimethyl-3-pyridinecarboxamide) and ADMP (2-amino-4,6-dimethoxypyrimidine) in substantial proportions, corresponding to the hydrolytic sulfonylurea cleavage. Two-phase dissipation kinetics of nicosulfuron by SG-1 were observed at the highest concentrations tested (0.5 and 1 mM) due to biosorption. The extend and rate of formulated nicosulfuron transformation were considerably reduced compared to those with the pure active ingredient (appearance of a lag phase, 30% dissipation after 10 days of incubation instead of 100% with the pure herbicide) but the same metabolites were observed. The toxicity of metabolites (standardized Microtox® test) showed a 20-fold higher toxicity of ADMP than nicosulfuron. *P. fluorescens* strain SG-1 was also able to biotransform two other sulfonylureas (metsulfuron-methyl and tribenuron-methyl) with various novel pathways. These results provide new tools for a comprehensive picture of the sulfonylurea environmental fate and toxicity of nicosulfuron in the environment.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Sulfonylureas are a large family of herbicides, widely used for the control of broad leaf weeds in various crops and vegetables, with sales multiplied by 100 during the last 30 years in Europe and North America [1]. Since their discovery in the mid-70s, several active ingredients (AI) were developed and about 20 are now marketed worldwide. They can be classified in 3 sub-groups according to the substituents R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> on the sulfonylurea bridge: (i) R<sub>1</sub> = pyridinic ring and R<sub>2</sub> = pyrimidinic ring (e.g. nicosulfuron, rimsulfuron); (ii)

\* Corresponding author at: Institut de Chimie de Clermont–Ferrand (ICCF)—UMR CNRS 6296, Université Blaise Pascal, 24 avenue Blaise Pascal, TSA 60026, CS 60026, 63178 Aubière Cedex, France.

\*\* Corresponding author at: Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, 1 Impasse Amélie Murat, TSA 60026, CS 60026, 63178 Aubière Cedex, France.

E-mail addresses: [isabelle.batisson@univ-bpclermont.fr](mailto:isabelle.batisson@univ-bpclermont.fr) (I. Batisson), [pascale.besse@univ-bpclermont.fr](mailto:pascale.besse@univ-bpclermont.fr) (P. Besse-Hoggan).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

$R_1$  = aromatic ring and  $R_2$  = triazinic ring (e.g. tribenuron-methyl, metsulfuron-methyl); (iii) others. When applied at low doses varying from 2 to 75 g of AI per hectare, sulfonylureas possess high herbicidal activity, broad spectrum of action, good selectivity and low mammalian toxicity [2,3]. They act as inhibitors of the plant acetolactate synthase (ALS), a key enzyme for branched-chain amino acid synthesis, which stop cell division and plant growth [4]. Nevertheless, because of their high phytotoxicity towards sensitive crops [5,6] and the likelihood of their transport in surface runoff and/or transfer to groundwater [7], their fate and their potential impact on aquatic ecosystems is of concern.

Nicosulfuron is often considered as the representative of the family since it is one of the most-sold sulfonylurea herbicides [8]. This compound is a post-emergence herbicide commonly used on corn cultures at 60 g AI/ha. Its solubility (7.5 g/L) and sorption coefficient (0.14 to 2.15 L/kg according to the soil characteristics) make this compound relatively mobile and bioavailable in soil and water [9,10]. This compound is non-volatile (vapour pressure  $< 8.10^{-10}$  Pa) and its photolysis is not expected to be a major route of transformation in soil and water [11,12]. However, nicosulfuron can be transformed via microbial activities and chemical hydrolysis [13]. Some bacterial and fungal strains able to biotransform nicosulfuron have been isolated but only with an additional source of carbon (glucose or rich medium) (co-metabolism) [14–18]. The major metabolites identified, ADMP (2-amino-4,6-dimethoxypyrimidine) and ASDM (2-(aminosulfonyl)-N,N-dimethyl-3-pyridinecarboxamide) [11] were also detected in soils, surface water and crops. Previous studies showed toxic effects of nicosulfuron on various aquatic plants, such as macrophytes, phytoplankton, diatoms and freshwater microalgae [11,19–21] but also shifts in the microbial community structure of soil treated, leading to the selection of nicosulfuron-tolerant bacteria [22,23]. Nevertheless, the metabolites have not yet been considered in these toxicity studies. Another key parameter is that the farmers do not spray the herbicide as a pure AI but as a formulation (mixture of AI and co-formulants (surfactants, solvents, synergists, ...)) [24]. The presence of these chemicals can greatly modify the fate of AI [25] and is not often taken into account.

The aim of our study was to compare the biotransformation kinetics and pathways of pure and formulated nicosulfuron by a newly-isolated bacterial strain from an agricultural soil. The toxicity of nicosulfuron and its metabolites, alone or in mixtures, was also assessed with the normalized Microtox<sup>®</sup> test. The potential of this strain to biotransform other sulfonylureas was tested and metabolic pathways were proposed.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and media

Nicosulfuron (purity 99.6%), metsulfuron-methyl (purity 99.2%), tribenuron-methyl (purity 99.1%), rimsulfuron (purity 99.9%) and ADMP (2-amino-4,6-dimethoxypyrimidine, purity 98.0%) were purchased from Sigma Aldrich (France) and ASDM (2-(aminosulfonyl)-N,N-dimethyl-3-pyridinecarboxamide, purity 98%) from J and K Scientific (Germany). Mineral salt medium (MSM), pH 6.7, was composed of (L): 1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g  $\text{KNO}_3$ , 0.2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g NaCl, 0.02 g  $\text{CaCl}_2$ , 0.005 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mL each of a salt and vitamin stock solutions. The salt stock solution contained (L) 20 g boric acid, 18 g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 2 g  $\text{ZnSO}_4$ , 1 g  $\text{CuSO}_4$ , 2.5 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0.01 g  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ . The vitamin stock solution contained (L): 2 mg biotin, 5 mg thiamine-HCl. The glucose-mineral salt medium (GSM) was composed of 5 g/L glucose in MSM. The MSM and GSM agar plates were prepared by

adding 1.5% (w/v) agar into the liquid media. Tryptic soy broth (TS) medium (Sigma Aldrich, France) is composed of (L): 17 g casein peptone, 3 g soya peptone, 5 g NaCl, 2.5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2.5 g glucose (pH 7.3).

### 2.2. Enrichment culture and isolation of nicosulfuron-transforming bacteria

Nicosulfuron herbicide-contaminated soil was collected from the surface layer (0–5 cm) of an agricultural field in Limagne (Puy-de-Dôme, France) planted with maize and treated with a nicosulfuron/mesotrione/S-metolachlor cocktail used at the recommended agronomic dose (60 g/150 g/1920 g AI/ha, respectively). 60 g of air dried, sieved ( $\phi = 2$  mm), homogenised soil was added to 500 mL (10% dry soil w/v) of MSM or GSM in 2L flasks. The final nicosulfuron concentration in the enrichment media was initially 0.05 mM. Two additional enrichment steps were realized every 3 weeks by subculturing 10 mL of the culture into 490 mL of fresh medium containing 0.1 and then 0.5 mM of nicosulfuron. The flasks were incubated at 28 °C on an orbital shaker at 150 rpm in darkness. The cultures were sampled weekly for bacterial isolation on MSM or GSM agar plates containing nicosulfuron (final concentration corresponding to that of the enrichment step). Pure colonies were tested for their capacity to transform nicosulfuron in liquid MSM or GSM. Agar plates and liquid culture were incubated at 28 °C in the dark for at least eight days. The liquid cultures were daily sampled for nicosulfuron quantification by HPLC (cf. Section 2.5.1). Among the isolates coming from the final step of the enrichment, a pure strain transforming completely the nicosulfuron in GSM medium was selected and named SG-1.

### 2.3. Identification of the nicosulfuron-transforming strain SG-1

The identification of the isolated strain SG-1 was carried out by Vitek<sup>®</sup> test (Biomérieux, France) and 16S rDNA gene sequencing. Bacterial genomic DNA of strain SG-1 was extracted via the QIAamp kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations and used as template for 16S rDNA gene PCR amplification using universal primers 27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') and 1492r (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') as described by Batisson et al. [26]. The PCR products were sequenced by Eurofins using the primers 27f, 338f (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'), 518r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'), 968f (5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3') and 1492r. The sequence was deposited in GenBank under the accession number KU291443.

The SG-1 16S rDNA sequence was compared to the closest sequences retrieved in GenBank database using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). The phylogenetic analysis was carried out by multiple alignments (Clustal  $\Omega$ ) followed by construction of a phylogenetic tree (MEGA 6.0 software).

### 2.4. Biotransformation of nicosulfuron and other sulfonylurea herbicides

The biotransformation of nicosulfuron (0.1, 0.5 or 1 mM) by the SG-1 strain was determined in GSM. SG-1 was pre-cultured in TS medium, washed in NaCl 0.8% and used to inoculate 150 mL of GSM in 500 mL flasks ( $10^5$  cfu.mL<sup>-1</sup> final). Uninoculated media served as abiotic controls. Each experiment was carried out in triplicate. The cultures were incubated in the dark at 28 °C under agitation at 150 rpm on a rotary shaker and sampled ( $2 \times 1$  mL) periodically for growth (Optical Density  $\text{OD}_{\lambda = 600\text{nm}}$ ) and determination of nicosulfuron residual concentration (HPLC) measurements. The metabolite analysis (HPLC, <sup>1</sup>H NMR and LC/ESI-MS) and toxicological bioassays (Microtox<sup>®</sup> test) were carried out at an initial 1 mM nicosulfuron concentration.

The capacity of the SG-1 strain to biotransform commercial formulation of nicosulfuron (0.1 mM) (Milagro®) and other sulfonylurea herbicides (1 mM of metsulfuron-methyl, tribenuron-methyl or rimsulfuron) has also been determined as described above.

One millilitre of SG-1 culture was used for the extraction of nicosulfuron/metabolites adsorbed on biomass. After centrifugation (13,000 g, 5 min), the pellet was suspended in 500 µL absolute ethanol. The suspension was vortexed, incubated overnight at room temperature and centrifuged (13,000 g, 5 min). The extraction was performed twice.

## 2.5. Analysis of sulfonylurea herbicides and their transformation products

### 2.5.1. Analysis by HPLC

The sulfonylurea analyses were conducted by HPLC on an Agilent Series 1100 chromatograph, equipped with a Diode Array Detector (DAD) set at  $\lambda = 220$  and 254 nm, and a reverse phase column (Zorbax Eclipse XDB-C18, 3.5 µm, 75 mm x 4.6 mm) at 22 °C. The mobile phase was composed of acetonitrile (Solvent A) and acidified water (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% v/v; pH 2.9) (Solvent B) at a flow rate of 1 mL/min, linear gradient 0–1 min: 2% A; 1–10 min: 2–70% A; 10–13 min: 70–100% A; 13–13.5 min: 100–2% A; 13.5–15 min: 0% A. Each sample was injected twice.

### 2.5.2. Analysis by <sup>1</sup>H NMR

<sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analyses were performed at 25 °C at 500.134 MHz on an Avance 500 Bruker spectrometer (Bruker Biospin, Wissembourg, France) equipped with a triple-resonance (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N) inverse probe with 5-mm-diameter tubes containing 600 µL of sample (540 µL of supernatant with 60 µL of a 5 mM of tetradeuterated sodium trimethylsilylpropionate solution), with water being suppressed by a classical two phase-shifted pulse saturation sequence (double pulsed field gradient echo sequence WATERGATE) according to Durand et al. [27].

### 2.5.3. Analysis by LC–MS

LC/ESI–MS analyses were performed on a ThermoScientific UHPLC Ultimate 3000 RSLC coupled with an Orbitrap Q-Exactive analyser. The crude supernatants were harvested (13,000 g, 5 min) before LC–MS analyses and directly injected in the LC–MS system without any further treatment. The analyses were carried out in positive mode. The UHPLC was equipped with a Kinetex EVO C18 column (100 × 2.1 mm; 1.7 µm) (Phenomenex) at 30 °C with a gradient acetonitrile + 0.1% Formic acid (Solvent A) and water + 0.1% Formic acid (Solvent B): 0–7.5 min: 5–99% A (linear); 7.5–8.5 min: 99% A; 8.5–9 min: 99–5% A; 9–11 min: 5% A. Flow: 0.45 mL/min. For the mass spectrometer, gaseous N<sub>2</sub> was used as nebulizer gas (50 L/h). The spray voltage was 3.2 kV.

## 2.6. Microtox® assays

The median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of nicosulfuron, ADMP, ASDM and *P. fluorescens* SG-1 culture supernatant on *Aliivibrio fischeri* bioluminescence was measured after 15 min of incubation as previously described [28,29]. The IC<sub>50</sub> values of pure chemicals were expressed in µM. The IC<sub>50</sub> values were calculated during nicosulfuron biotransformation by SG-1 by a serial-dilution of the culture supernatant in the diluent buffer supplied by the manufacturer. The IC<sub>50</sub> was then expressed in percentage of the supernatant in the total reaction volume (v/v).

## 2.7. Statistical analyses

The fitting of the transformation curves of nicosulfuron by SG-1 from various initial concentrations (BiDoseResp Function) and the statistical analyses were performed using the OriginPro 8 software (OriginLab Corporation). The initial nicosulfuron concentration was used as the factor to determine differences between the parameters after having checked normality and homogeneity of variance. Differences in parameters were assessed using one-way ANOVA, followed by separate *post hoc* comparisons (Tuckey's test,  $P < 0.05$ ).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Isolation and characterization of the SG-1 strain

The enrichment cultures were produced using an agricultural soil previously described as having nicosulfuron-dissipation capacities [30]. The Mineral Salt medium with (GSM) or without (MSM) glucose was used to isolate bacterial strains either able to metabolize nicosulfuron or to biotransform it via co-metabolism processes, respectively. No isolates from MSM cultures showed nicosulfuron-transformation capabilities. However, three pure cultures from the GSM enrichments were able to transform nicosulfuron after 14 days of incubation (Isolate 1: 8%, Isolate 2: 43%) but only one transformed it totally. This isolate was selected for further characterization and named the SG-1 strain. It was a Gram-negative, aerobic, motile and rod-shaped bacterium (see Supplementary material Fig. S1 in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.048>). The SG-1 strain was able to use citrate, glucose, melibiose and arabinose for growth and was affiliated to *Pseudomonas fluorescens*. SG-1 16S rDNA sequence (1477 bp) showed 99% of similarity with several *P. fluorescens* strains (see Supplementary material Fig. S2 in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.048>). The *Pseudomonas* genus contains other sulfonylurea herbicide-transforming strains (ethametsulfuron-methyl, chlorimuron-ethyl, pyrazosulfuron-ethyl) [31–33] but *P. fluorescens* SG-1 is the first one able to transform nicosulfuron.

### 3.2. Biotransformation of pure and formulated nicosulfuron by the SG-1 strain: identification of the transformation pathway and toxicity of metabolites

#### 3.2.1. Kinetics of pure nicosulfuron biotransformation during SG-1 growth

The transformation kinetics of nicosulfuron were determined in GSM medium supplemented with 1 mM of nicosulfuron and inoculated with 10<sup>5</sup> cfu.mL<sup>-1</sup> of *P. fluorescens* SG-1. This nicosulfuron was completely transformed within 19 days whereas its concentration was stable in the abiotic control (Fig. 1A). The concentration of nicosulfuron sharply declined within the first day of incubation (77.5 ± 0.5% of dissipation). This occurs concomitantly with the SG-1 strain growth. However, nicosulfuron is not used as a carbon source but is only co-metabolically transformed by the SG-1 strain since no growth and no nicosulfuron transformation were observed in MSM medium. Biotransformation of nicosulfuron by co-metabolic processes has also been described for all the other nicosulfuron-transforming strains isolated until now [14,15,17,18], showing the importance of co-metabolism in the pesticide biotransformation.

#### 3.2.2. Effect of initial concentration on the kinetic transformation of pure nicosulfuron by SG-1

The biotransformation kinetics of nicosulfuron were investigated with three initial concentrations (0.1, 0.5 and 1 mM) (Fig. 1B). In all cases, the dissipation of nicosulfuron was complete within

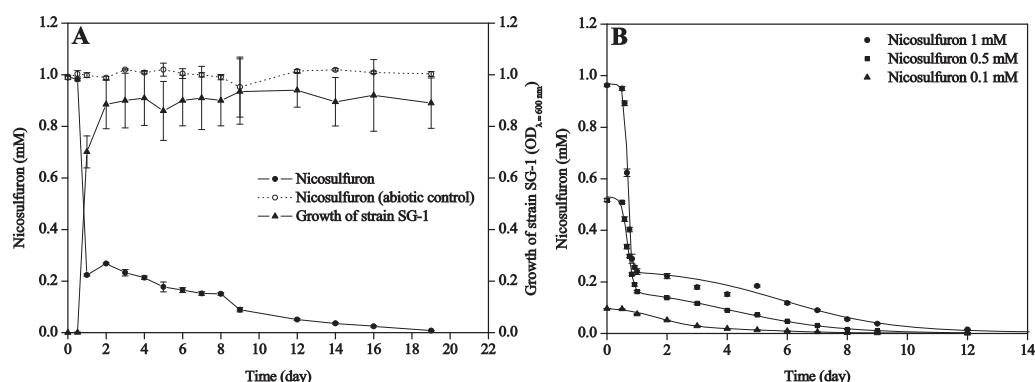


Fig. 1. (A) Growth of *P. fluorescens* SG-1 in GSM containing 1 mM nicosulfuron. (B) Transformation of nicosulfuron by SG-1 at various initial concentrations. Values are expressed as the mean  $\pm$  standard error,  $n=3$ .

16, 9 and 6 days for 1, 0.5 and 0.1 mM, respectively. Each transformation curve was fitted with the best function describing the dissipation of nicosulfuron (Table 1), characterized by a two phase process (Eq. (1)):

$$C = A1 + (A2 - A1) \left[ \frac{p}{1 + 10^{(DT_{50}01-x)(-h1)}} + \frac{1-p}{1 + 10^{(DT_{50}02-x)(-h2)}} \right] \quad (1)$$

where  $A1$  and  $A2$  are the final and initial concentrations of nicosulfuron, respectively (mM),  $DT_{50}$ : time needed to remove 50% of the initial nicosulfuron concentration (day),  $h$ : transformation rate (mM/day), the numbers 1 and 2 correspond to the first and second phase, respectively. The proportionality coefficient  $p$  was the ratio of the nicosulfuron concentration removed during the first dissipation phase to its total concentration removed during the experiment.

The  $DT_{50}$  and transformation rate parameters were compared for each initial nicosulfuron concentration. No significant differences were found between the first  $DT_{50}$ s and the first transformation rates ( $h1$ ) of initial nicosulfuron concentrations at 0.5 and 1 mM. The first  $DT_{50}$  and transformation rate of 0.1 mM nicosulfuron were respectively higher and lower than those of 0.5 and 1 mM (Tukey's test,  $P < 0.01$ ; Table 1), probably due to the predominance of adsorption processes on bacteria at high nicosulfuron concentrations (0.5 and 1 mM), but not at the lowest one (0.1 mM). Indeed, the rapid dissipation of nicosulfuron within one

day of incubation results partially from the adsorption/absorption of the herbicide on SG-1 biomass as evidenced by the nicosulfuron concentration found after ethanol extraction of the pellet (see Supplementary material Table S1 in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.048>). This explains the existence of a first and second phase in the dissipation curves, mainly dominated by adsorption and biotransformation processes, respectively.

These results showed that the SG-1 strain was able to tolerate and to completely transform nicosulfuron at relatively high concentrations (up to 1 mM). The higher dissipation rates were observed within the first day of incubation for the higher nicosulfuron concentrations ( $68.7 \pm 0.8\%$  and  $77.5 \pm 0.5\%$  for an initial nicosulfuron concentration of 0.5 and 1 mM, respectively), contrary to other nicosulfuron-transforming strains described, for which the maximum dissipation rate was obtained with lower initial concentrations [14,15,17,18].

### 3.2.3. Biotransformation pathways of pure nicosulfuron by SG-1 strain

Three major metabolites were identified by LC-(+)ESI-MS and  $^1H$  NMR analyses during the 1 mM nicosulfuron biotransformation by SG-1 strain (Fig. 2). Two metabolites resulted from the cleavage of the C–N bond of the sulfonylurea bridge: ASDM (2-aminosulfonyl-N,N-dimethyl-nicotinamide) with a retention time of 1.18 min, a molecular ion at  $m/z$  230  $[M+H]^+$  and a main frag-

Table 1

Kinetic parameters for the dissipation of nicosulfuron at various initial concentrations. The curves presented in Fig. 1B were fitted with the BiDoseResp function. Parameters are expressed as the mean  $\pm$  standard error (SE),  $n=3$ . Significant differences between conditions are indicated by letters in parenthesis (a > b > c, Tukey's test,  $P < 0.05$ ).

Parameters	Initial concentration of nicosulfuron		
	1 mM	0.5 mM	0.1 mM
$A1$ (mM) <sup>‡</sup>	$3.14 \times 10^{-3} \pm 1.78 \times 10^{-3}$ (a)	$8.76 \times 10^{-4} \pm 3.98 \times 10^{-4}$ (b)	$4.29 \times 10^{-4} \pm 1.15 \times 10^{-4}$ (b)
$A2$ (mM) <sup>‡</sup>	$1.02 \pm 0.02$ (a)	$0.55 \pm 0.01$ (b)	$0.11 \pm 2.17 \times 10^{-3}$ (c)
$DT_{50}01$ (d) <sup>§</sup>	$0.68 \pm 0.01$ (b)	$0.69 \pm 0.01$ (b)	$1.51 \pm 0.04$ (a)
$DT_{50}02$ (d) <sup>¶</sup>	$4.97 \pm 0.46$ (a)	$4.05 \pm 0.34$ (b)	$5.61 \pm 0.38$ (a)
$h1$ (mM d <sup>-1</sup> ) <sup>†</sup>	$8.47 \pm 0.56$ (a)	$8.27 \pm 0.33$ (a)	$0.56 \pm 0.04$ (b)
$h2$ (mM d <sup>-1</sup> ) <sup>‡</sup>	$0.26 \pm 0.02$ (a)	$0.25 \pm 0.01$ (a)	$0.35 \pm 0.06$ (a)
$p$ <sup>¶</sup>	$0.76 \pm 0.03$ (a)	$0.66 \pm 0.03$ (b)	$0.82 \pm 0.03$ (a)
$R^2$ <sup>‡</sup>	0.996	0.993	0.999

<sup>‡</sup> Bottom asymptote.

<sup>‡</sup> Top asymptote.

<sup>§</sup> First dissipation time 50%.

<sup>¶</sup> Second dissipation time 50%.

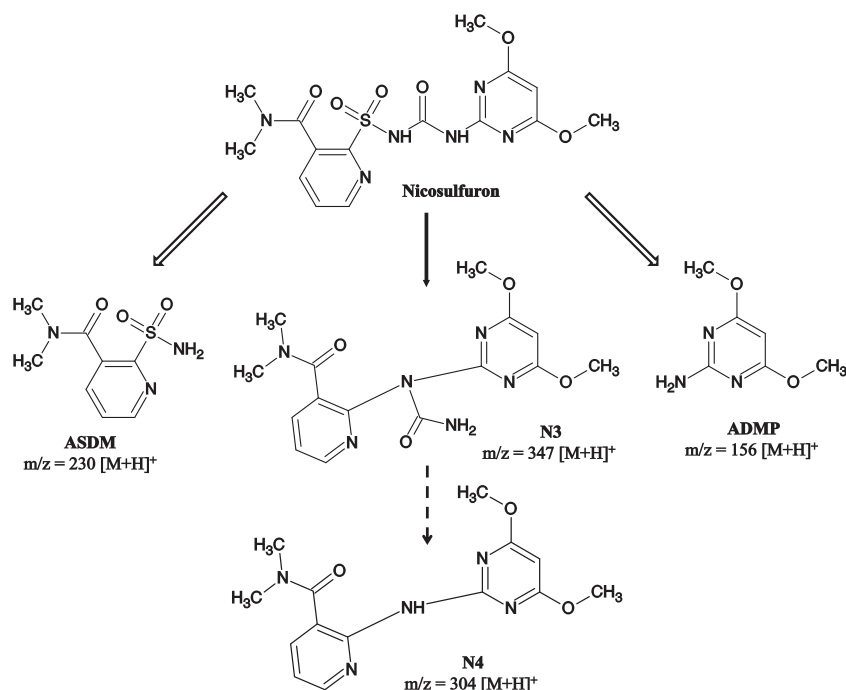
<sup>†</sup> Slope 1.

<sup>‡</sup> Slope 2.

<sup>¶</sup> Proportion coefficient.

<sup>‡</sup> Coefficient of determination.





**Fig. 2.** Proposed scheme of nicosulfuron biotransformation pathway by *P. fluorescens* SG-1. The blank (major), solid (minor) and dashed (very minor) arrows correspond to the predominance of the pathways.

ment ion at  $m/z$  213, and two characteristic  $^1\text{H}$  NMR singlets at 2.88 and 3.11 ppm (in the GSM medium); **ADMP** (2-amino-4,6-dimethoxypyrimidine) with a retention time of 1.51 min, a molecular ion at  $m/z$  156  $[\text{M}+\text{H}]^+$  and a characteristic  $^1\text{H}$  NMR singlet at 5.70 ppm (in the GSM medium). The structures of both metabolites were confirmed with the commercially available standard compounds. The last major metabolite with a retention time of 2.81 min presents a molecular ion at  $m/z$  347  $[\text{M}+\text{H}]^+$  and a main fragment ion at  $m/z$  304 as well as two characteristic  $^1\text{H}$  NMR singlets at 2.84 and 2.93 ppm (in the GSM medium). It was identified as 2-(1-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yl)-ureido)-N,N-dimethyl-nicotinamide (**N3**) and derived from the cleavage of the C-S bond of the sulfonylurea bridge and contraction by elimination of the sulfur dioxide group. This metabolite was also described with *Alcaligenes faecalis* ZWS11 and *Talaromyces flavus* LZM1 strains [15,18]. A very minor metabolite (**N4**) was detected by HPLC and by LC-(+)ESI-MS after 5 days of incubation. It presents a retention time of 2.28 min and a molecular ion at  $m/z$  304  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . This ion was already observed in the mass spectrum of **N3** as a fragment ion, suggesting that **N4** came directly from **N3**. It was assigned as 2-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yl)-N,N-dimethyl-nicotinamide, corresponding to the hydrolysis of the **N3** urea function.

The cleavage of the sulfonylurea bridge is a common transforming pathway of sulfonylurea herbicides by chemical and biological processes [3,32–35]. Although nicosulfuron-transforming strains belong to different genera, ADMP was identified with all of them and therefore can be described as a common metabolite. In addition to the SG-1 strain, ASDM was identified during biotransformation of nicosulfuron by *T. flavus* LZM1, *A. faecalis* ZWS11 and *Serratia marcescens* N80 [15,17].

The metabolites were quantified during the nicosulfuron (1 mM) biotransformation by the SG-1 strain using standards for ASDM and ADMP and  $^1\text{H}$  NMR for **N3**. As soon as nicosulfuron disappeared,

ADMP and ASDM appearance (in similar molar concentrations) was observed, the production of **N3** being slightly delayed (Fig. 3A). At the end of the experiment (day 19), ASDM and ADMP were present at the highest concentrations (0.84 and 0.88 mM, respectively) compared to that of **N3** (0.14 mM). These results indicate that a quantitative biotransformation of nicosulfuron occurred and that its major transformation pathway is the hydrolytic cleavage of the sulfonylurea bridge. The concentration of these three nicosulfuron metabolites remains constant at the end of the experiment, indicating no further transformation of these compounds. Indeed, the strain SG-1 was unable to grow in GSM supplemented with 1 mM of ADMP or ASDM, and no biotransformation of these metabolites was observed. Our results emphasize that ADMP is a common and major metabolite of nicosulfuron resulting from microbial activity since this compound was systematically observed with all the known nicosulfuron-transforming strains. Further investigations on the toxicity of nicosulfuron metabolites and especially ADMP are therefore of particular interest.

#### 3.2.4. Toxicity of pure nicosulfuron and its metabolites

The toxicity of nicosulfuron and its metabolites has been assessed from the culture supernatants sampled at T0 and T14 days of the nicosulfuron (1 mM) biotransformation in GSM inoculated with the SG-1 strain ( $10^5$  cfu.mL $^{-1}$ ). The results showed increased toxicity during the transformation of nicosulfuron from an  $\text{IC}_{50} > 45\%$  (v/v, supernatant) at day 0 to an  $\text{IC}_{50}$  of  $3.9 \pm 0.6\%$  at day 14 (Table 2), corresponding to  $1.3 \pm 0.1$   $\mu\text{M}$  nicosulfuron,  $37.4 \pm 0.04$   $\mu\text{M}$  ADMP,  $34.4 \pm 0.05$   $\mu\text{M}$  ASDM and  $5.8 \pm 0.02$   $\mu\text{M}$  **N3** (Fig. 3A). This increased toxicity could thus be caused by the production of nicosulfuron metabolites that are more toxic than the parent compound. Indeed, the toxicity tests on pure ADMP and ASDM, the major nicosulfuron metabolites of the SG-1 strain, revealed a toxicity of ADMP ( $\text{IC}_{50} = 22.4 \pm 8.4$   $\mu\text{M}$ ) about 20-fold higher than



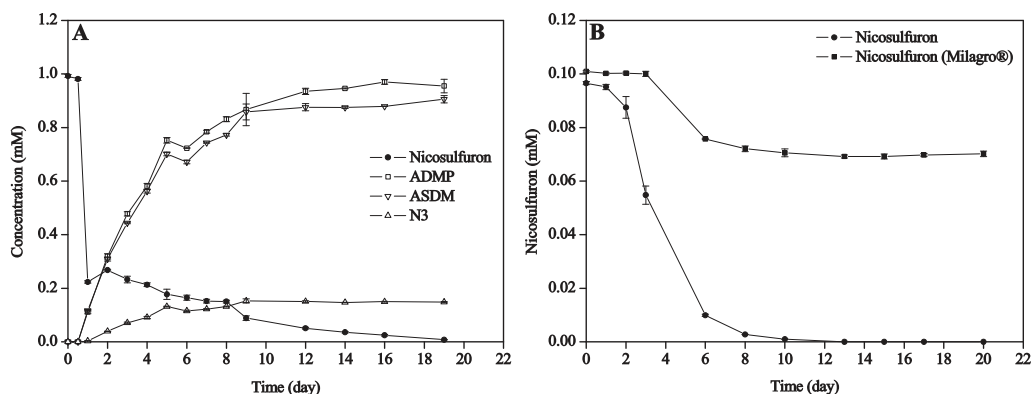


Fig. 3. (A) Biotransformation kinetics of pure nicosulfuron (1 mM) and appearance of metabolites and (B) comparison of pure and formulated (Milagro®) nicosulfuron (0.1 mM) biotransformation by *P. fluorescens* SG-1. Values are expressed as the mean  $\pm$  standard error,  $n = 3$ .

Table 2

Toxicity of pure chemicals (on the left) and of the *P. fluorescens* SG-1 culture supernatants in GSM (on the right) towards *A. fischeri* (Microtox®). The results are reported as the mean  $\pm$  standard error,  $n = 4$ .

Chemicals	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Culture supernatant	IC <sub>50</sub> (%)
Nicosulfuron	420.3 $\pm$ 47.7	SG-1 + nicosulfuron	Day 0 >45
ADMP	22.4 $\pm$ 8.4	Day 14	3.9 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>
ASDM	>3900		
ADMP + ASDM	391.3 $\pm$ 25.2		

IC<sub>50</sub> = Inhibitory concentration 50%.

<sup>a</sup> Corresponding to the concentrations: 1.3  $\pm$  0.1  $\mu$ M nicosulfuron, 37.4  $\pm$  0.04  $\mu$ M ADMP, 34.4  $\pm$  0.05  $\mu$ M ASDM and 5.8  $\pm$  0.02  $\mu$ M N3.

that of nicosulfuron (420.3  $\pm$  47.7  $\mu$ M), contrary to the toxicity of ASDM, which appeared relatively low (IC<sub>50</sub> > 3900  $\mu$ M) (Table 2). It is therefore assumed that ADMP is mainly responsible for the increase of the toxicity in the culture supernatant of SG-1 strain during nicosulfuron biotransformation since the IC<sub>50</sub> value of the pure molecule was close to its concentration in the diluted supernatant. Nevertheless, surprisingly, the IC<sub>50</sub> value of the equimolar mixture of ASDM + ADMP was determined to be 391.3  $\pm$  25.2  $\mu$ M (Table 2), being 20-fold less toxic toward *A. fischeri* than ADMP alone, suggesting an antagonist effect of ASDM on ADMP toxicity. The toxicity inhibition of a compound by another has already been shown for other pesticides (glyphosate, cypermethrin [36], carbofuran, cyromazine, fenamiphos, formetanate, propamocarb [37]). We could not exclude that N3, although present as a minor metabolite, explains the toxicity of the supernatant at day 14. These results highlight the importance of taking all the potential transformation products into account to obtain a global assessment of pesticide toxicity.

### 3.2.5. Transformation of a commercially available nicosulfuron formulation by the SG-1 strain

Since a herbicide is not sprayed as the pure active ingredient in the field, the biotransformation of nicosulfuron (0.1 mM) in a commercial formulation used on corn cultures (Milagro®, 40 g/L nicosulfuron) was evaluated in GSM medium and compared to that of the pure active ingredient. The results showed less efficient transformation of the formulated nicosulfuron with a 3 day lag-phase and only 30% of biotransformation after 8 days of incubation with no further evolution (Fig. 3B). In comparison, pure nicosulfuron was quickly dissipated and completely transformed by 12 days, suggesting a strong negative effect of the co-formulants on the biodegrading-capability of the SG-1 strain. Nevertheless, the

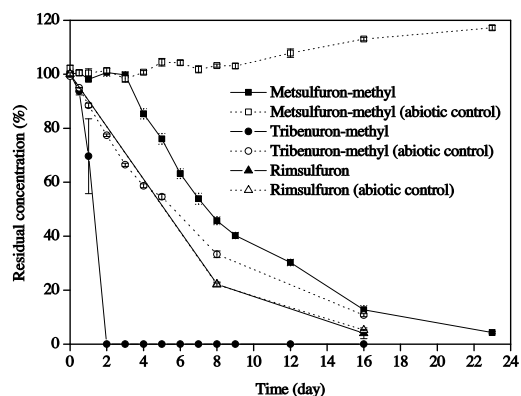


Fig. 4. Transformation of sulfonylurea herbicides (1 mM) by *P. fluorescens* SG-1 and under abiotic conditions. Values are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the percentage of residual concentration,  $n = 3$ .

metabolites produced under both conditions were identical and in the same proportion at the end of the experiment (about 85% of ADMP and ASDM, and about 15% of N3), suggesting no differences in the biotransformation pathways of nicosulfuron. The prediction of the co-formulant effect on the biodegradation of pesticides is usually difficult, depending on their number and structures (data not available due to industrial secrecy), the type of active ingredient and the degrading-strain [25,38]. Previous studies have shown an increase of the biodegradation rate with formulations due to the presence of other carbon sources or a partial or complete inhibition according to the compounds present and the bacterial strains tested [25,38]. Nevertheless, in our case, the co-formulant effect is significant and should be taken into account more often in the overall environmental fate of pesticides.

### 3.3. Transformation of various sulfonylurea herbicides by the SG-1 strain

The SG-1 strain ability to transform three other sulfonylurea herbicides (rimsulfuron, metsulfuron-methyl or tribenuron-methyl) was investigated in GSM medium (Fig. 4). Rimsulfuron has a chemical structure similar to that of nicosulfuron only distinguish by pyridine substituent. The other two compounds belong to a dif-

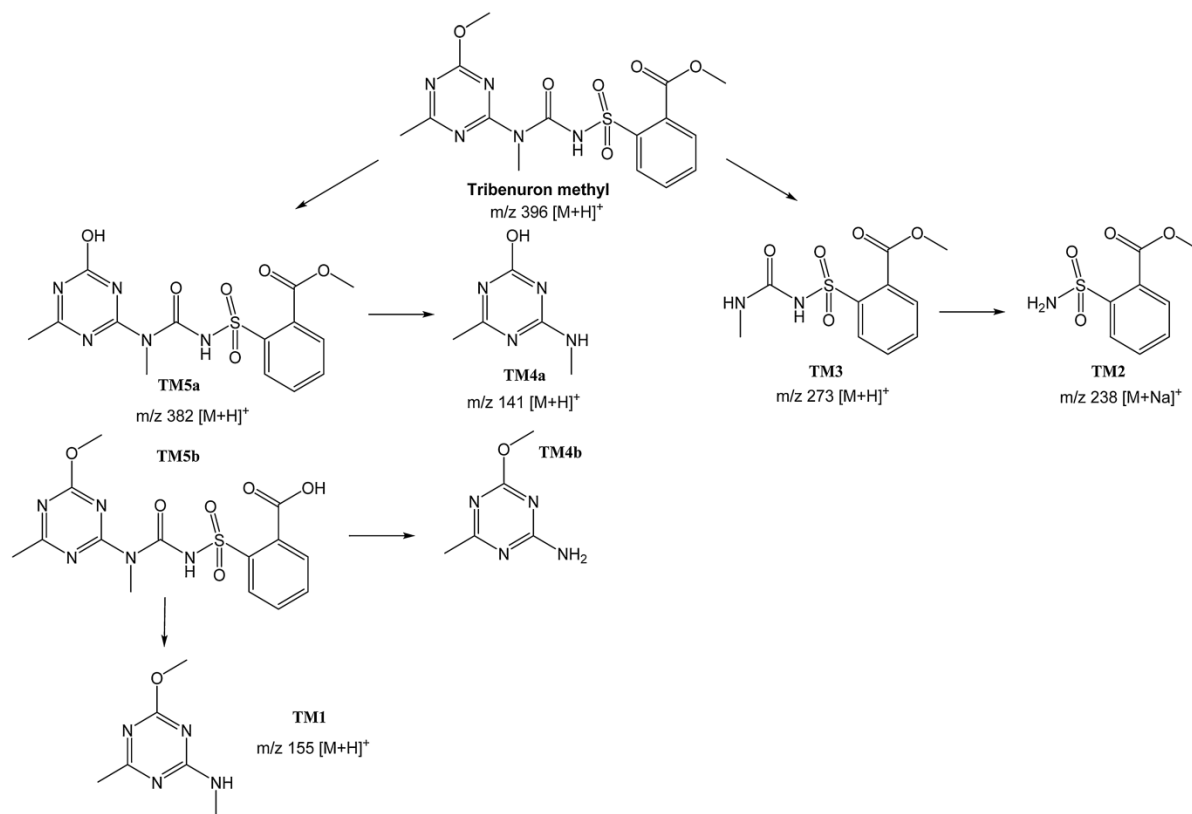


Fig. 5. Proposed tribenuron-methyl biotransformation pathway by *P. fluorescens* SG-1.

ferent structural sub-family of sulfonyleureas, since they contain a triazinic and a benzenic ring instead of a pyridinic and a pyrimidine ring for nicosulfuron. The transformation kinetics were compared for abiotic and biotic conditions.

With rimsulfuron (a very unstable molecule [39]), the dissipation was complete within 16 days of incubation but the kinetic curves were superimposable for abiotic and biotic conditions (Fig. 4). The same transformation products from the sulfonyleurea bridge hydrolysis or contraction were identified by LC-(+)ESI-MS (data not shown) in both cases. The bacterial strain SG-1 was not involved in the transformation process and seems unable to biotransform rimsulfuron, although it has a similar chemical structure to nicosulfuron, conversely to most of the nicosulfuron-degrading strains described in the literature [15,17,18].

Conversely, the results showed a fast and complete biotransformation of tribenuron-methyl by the SG-1 strain within 2 days of incubation (Fig. 4). Abiotic dissipation of this sulfonyleurea occurred also but with slower kinetics (20% degradation at day 2). The LC-(+)ESI-MS analysis of different samples taken during the incubation evidenced five metabolites with molecular masses of  $m/z$  155 [M+H]<sup>+</sup> ( $t_R = 1.28$  min, **TM1**), 238 [M+Na]<sup>+</sup> ( $t_R = 2.85$  min, **TM2**), 273 [M+H]<sup>+</sup> ( $t_R = 2.98$  min, **TM3**), 141 [M+H]<sup>+</sup> ( $t_R = 3.69$  min, **TM4**) and 382 [M+H]<sup>+</sup> ( $t_R = 4.2$  min, **TM5**) (Fig. 5). Some of them have already been described with other tribenuron-methyl-transforming strains (*Serratia* sp. strain BW30, *Pseudomonas* sp. strain NyZ42 [40,41]). The hydrolytic cleavage of the sulfonyleurea bridge, commonly described for the transformation of sulfonyleureas [3,42], led to the formation of methyl-2-sulfamoylbenzoate ( $M = 215$  g/mol)

(**TM2**) and 4-methoxy-N,6-dimethyl-1,3,5-triazin-2-amine ( $M = 154$  g/mol) (**TM1**), also described with *Pseudomonas* sp. NyZ42 and *Serratia* sp. BW30 [40,41]. A O-demethylation of the methoxy substituent on the triazine ring of tribenuron-methyl leading to the metabolite 2-(N-((4-hydroxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)(methyl)carbamoyl)-sulfamoyl)-benzoate ( $M = 381$  g/mol) (**TM5a**), known as a mechanism of chemical degradation [3], was described with *Pseudomonas* sp. NyZ42 [41]. Nevertheless, a de-esterification could also be suggested as already observed with other sulfonyleureas [43] (**TM5b**). This first step can be followed by cleavage of the sulfonyleurea bond leading to **TM4a**/**TM4b** ( $M = 140$  g/mol). For the last compound (**TM3**), the accurate mass of  $m/z = 273.054$  [M+H]<sup>+</sup> corresponds to the elemental composition C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>S. The fragment at  $m/z = 199$  proves the presence of the aromatic group. The proposed structure of **TM3** is the result of the NH-triazine cleavage, a structure which was suggested only in the advanced oxidation process of tribenuron-methyl [43] but not described with microorganisms (Fig. 5).

The biotransformation of metsulfuron-methyl started after a lag-phase of 3 days and was slower than that of tribenuron-methyl ( $4.3 \pm 0.4\%$  remaining concentration after 23 days of incubation). No abiotic transformation was observed (Fig. 4). The absence of a N-methyl substituent on the sulfonyleurea bridge (more reactive towards hydrolysis) leads to greater stability of this compound as already shown [3]. Five metsulfuron-methyl metabolites were detected at the end of the experiment:  $m/z$  386 [M+H]<sup>+</sup> ( $t_R = 2.56$  min, **MSM1**),  $m/z$  259 [M+H]<sup>+</sup> ( $t_R = 2.69$  min, **MSM2**); 238 [M+Na]<sup>+</sup> ( $t_R = 2.85$  min, **MSM3**),  $m/z$  368 [M+H]<sup>+</sup> ( $t_R = 3.15$  min,

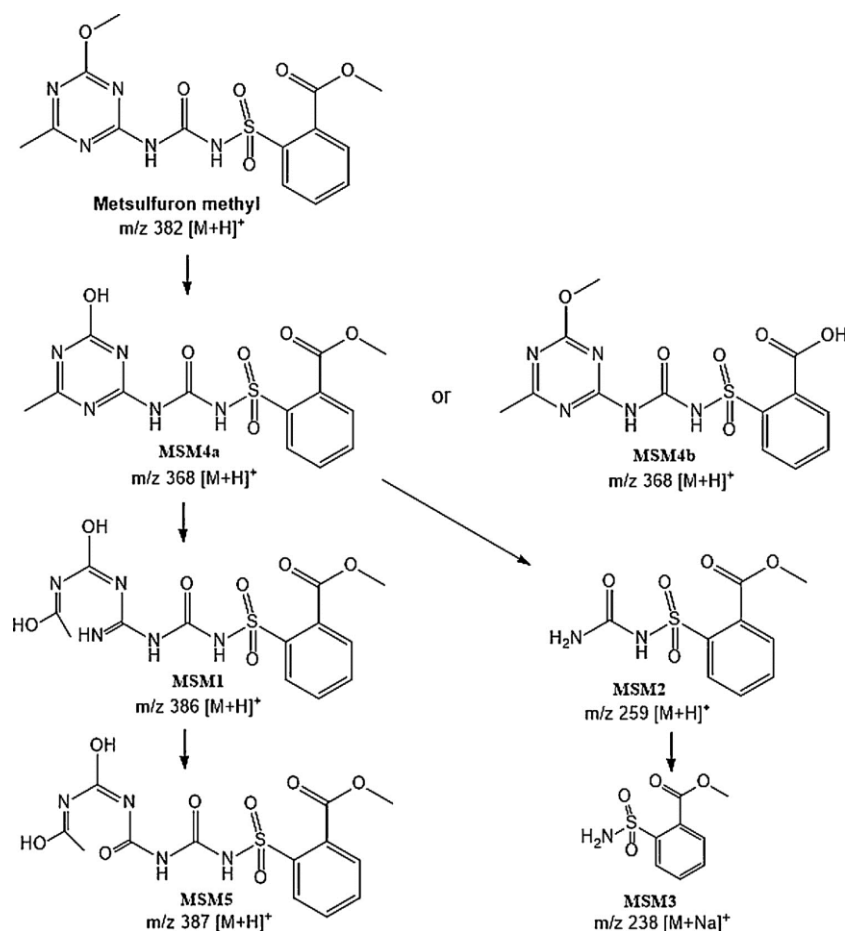


Fig. 6. Proposed metsulfuron-methyl biotransformation pathway by *P. fluorescens* SG-1.

**MSM4**),  $m/z$  387  $[M+H]^+$  ( $t_R$  = 3.76 min, **MSM5**). The mass of **MSM4** differs from that of metsulfuron-methyl by the loss of a methyl group. Two reaction hypotheses can be proposed: (i) a de-esterification (**MSM4b**, Fig. 6), already described with *Acylobacter* sp. XJ-412-1 that was due to carboxyesterase activity [44] or (ii) a demethylation of the methoxy group of the triazinic ring (**MSM4a**, Fig. 6), compound already identified with *P. fluorescens* B2 [45]. As all the other metabolites identified by MS have the methylester moiety on the aromatic ring, **MSM4a** is the most likely metabolite. **MSM1** and **MSM5** correspond to the cleavage of the triazinic ring followed by the hydrolysis of the imine into a ketone. These compounds have already been identified in abiotic degradation experiments or in sterile soils [3,43,46,47]. Nevertheless, such a microbial reaction has been reported in a few cases with other sulfonyleureas (it was proposed as one of the biotransformation pathways of ethametsulfuron by a bacterial strain of the same genus, *Pseudomonas* sp. SW4 [31] and a strain able to degrade the triazine amine has been isolated [48]). The **MSM2** structure resulted from the NH-triazine cleavage, as already observed with tribenuron-methyl. Hydrolysis of the **MSM2** urea bond led to **MSM3** (Fig. 6).

These results suggest that *P. fluorescens* SG-1 has a panel of enzymes enabling various biotransformation pathways of sul-

fonylureas according to their fine chemical structure: common hydrolytic cleavage of the sulfonyleurea bridge, demethylation but also cleavage of the NH-triazine bond and even opening of the triazinic ring.

#### 4. Conclusions

The present study described the characterization of a newly-isolated strain, identified as a *P. fluorescens* strain called SG-1, able not only to biotransform nicosulfuron efficiently (1 mM within 12 days) but also tribenuron-methyl and methylsulfuron-methyl. Whilst the classic hydrolytic cleavage of the sulfonyleurea bridge was observed, other more unusual pathways were identified such as contraction/rearrangement of the sulfonyleurea bond, demethylation, and cleavage of the NH-triazinic ring or opening of the triazinic ring according to the sulfonyleurea structure, showing the great potential of this strain. The present study also provides the microbial toxicity of nicosulfuron metabolites for the first time. ADMP, a nicosulfuron metabolite common to all known nicosulfuron-transforming strains, presents a 20-fold higher toxicity than nicosulfuron, showing that the toxicity of all the transformation products has to be taken into account to assess the overall risk of an herbicide. Another important parameter is

the co-formulants present in the commercially available pesticide that can have a strong negative effect on the biodegradation of the active ingredient as shown in this work for the first time and that are not usually taken into account.

### Conflict of interest

The authors confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant support for this work that could have influenced its outcome.

### Funding source

This work was supported by the Région Auvergne, the French Ministry for Higher Education and Research and the European Regional Development Fund.

### Acknowledgement

The authors acknowledge Philip Hoggan for English reviewing.

### References

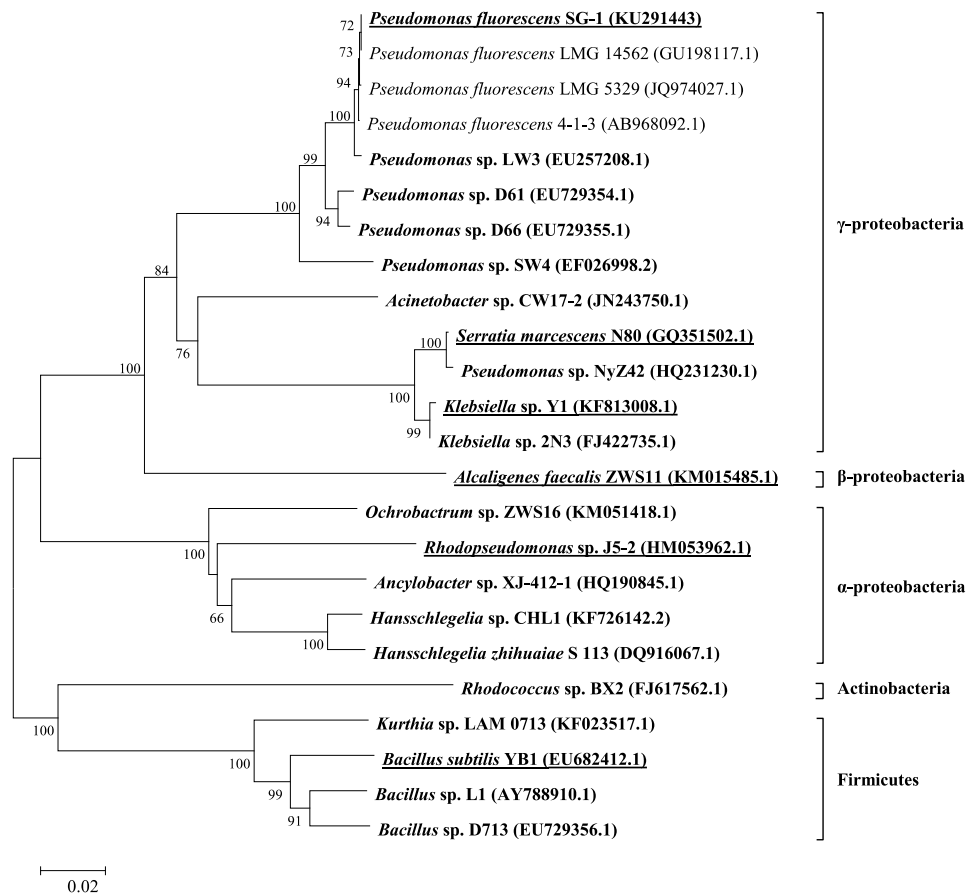
- [1] FAO, Food and Agriculture Organization—FAOSTAT, (2013). <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx> (accessed 22.06.16).
- [2] A.M. Blair, T.D. Martin, A review of the activity, fate and mode of action of sulfonylurea herbicides, *Pestic. Sci.* 22 (1988) 195–219.
- [3] A.K. Sarmah, J. Sabadie, Hydrolysis of sulfonylurea herbicides in soils and aqueous solutions: a review, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 6253–6265.
- [4] C. Tomlin, *The Pesticide Manual* tenth edition edited by Clive Tomlin, Published by the Royal Society of Chemistry and the British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, UK, 1994.
- [5] S.M. Andersen, P.B. Hertz, T. Holst, R. Bossi, C.S. Jacobsen, Mineralisation studies of 14 C-labelled metsulfuron-methyl tribenuron-methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron-methyl in one Danish soil and groundwater sediment profile, *Chemosphere* 45 (2001) 775–782.
- [6] H.Z. Wang, J. Gan, J.B. Zhang, J.M. Xu, S.R. Yates, J.J. Wu, Q.F. Ye, Kinetic distribution of C-metsulfuron-methyl residues in paddy soils under different moisture conditions, *J. Environ. Qual.* 38 (2009) 164–170.
- [7] Y. de Lafontaine, C. Beauvais, A.J. Cessna, P. Gagnon, C. Hudon, L. Poissant, Sulfonylurea herbicides in an agricultural catchment basin and its adjacent wetland in the St. Lawrence River basin, *Sci. Total Environ.* 479–480 (2014) 1–10.
- [8] AGRESTE, Données de vente des produits phytosanitaires 2011 à 2014. <http://agreste.agriculture.gouv.fr/thematiques-872/productions-vegetales-874/grandes-cultures-fourrages-875>, 2016 (accessed 5.05.16).
- [9] R.S. Oliveira, W.C. Koskinen, F.A. Ferreira, Sorption and leaching potential of herbicides on Brazilian soils, *Weed Res.* 41 (2001) 97–110.
- [10] Agritox, Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques. <http://www.agritox.anses.fr/php/sa.php?sa=1104>, 2016 (accessed 3.02.16).
- [11] EFSA, Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance nicosulfuron, *EFSA J.* 120 (2007) 1–91.
- [12] PMRA, Proposed re-evaluation decision—Nicosulfuron, *Pest Manag. Regul. Agency* (2008).
- [13] B.M. Berger, N.L. Wolfe, Hydrolysis and biodegradation of sulfonylurea herbicides in aqueous buffers and anaerobic water-sediment systems: Assessing fate pathways using molecular descriptors, *Environ. Toxicol. Chem.* 15 (1996) 1500–1507.
- [14] X.H. Lu, Z.H. Kang, B. Tao, Y.N. Wang, J.G. Dong, J.L. Zhang, Degradation of nicosulfuron by *Bacillus subtilis* YB1 and *Aspergillus niger* YF1, *Appl. Biochem. Microbiol.* 48 (2012) 460–466.
- [15] J. Song, J. Gu, Y. Zhai, W. Wu, H. Wang, Z. Ruan, Y. Shi, Y. Yan, Biodegradation of nicosulfuron by a *Talaromyces flavus* LZM1, *Bioresour. Technol.* 140 (2013) 243–248.
- [16] L. Wang, X. Zhang, Y. Li, Degradation of nicosulfuron by a novel isolated bacterial strain *Klebsiella* sp. Y1: condition optimization, kinetics and degradation pathway, *Water Sci. Technol.* 73 (2016) 2896–2903.
- [17] H. Zhang, W. Mu, Z. Hou, X. Wu, W. Zhao, X. Zhang, H. Pan, S. Zhang, Biodegradation of nicosulfuron by the bacterium *Serratia marcescens* N80, *J. Environ. Sci. Health Part B* 47 (2012) 153–160.
- [18] W. Zhao, C. Wang, L. Xu, C. Zhao, H. Liang, L. Qiu, Biodegradation of nicosulfuron by a novel *Alcaligenes faecalis* strain ZWS11, *J. Environ. Sci.* 35 (2015) 151–162.
- [19] C. Leboulanger, F. Rimet, M. Hème de Lacotte, A. Bérard, Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae, *Environ. Int.* 26 (2001) 131–135.
- [20] F. Seguin, J.-C. Druart, R. Le Cohu, Effects of atrazine and nicosulfuron on periphytic diatom communities in freshwater outdoor lentic mesocosms, *Ann. Limnol.—Int. J. Limnol.* 37 (2001) 3–8.
- [21] F. Seguin, C. Leboulanger, F. Rimet, J.C. Druart, A. Bérard, Effects of atrazine and nicosulfuron on phytoplankton in systems of increasing complexity, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40 (2001) 198–208.
- [22] D.G. Karpouzas, E. Kandeler, D. Bru, I. Friedel, Y. Auer, S. Kramer, S. Vasileiadis, I. Petric, N. Udikovic-Kolic, S. Djuric, F. Martin-Laurent, A tiered assessment approach based on standardized methods to estimate the impact of nicosulfuron on the abundance and function of the soil microbial community, *Soil Biol. Biochem.* 75 (2014) 282–291.
- [23] I. Petric, D.G. Karpouzas, D. Bru, N. Udikovic-Kolic, E. Kandeler, S. Djuric, F. Martin-Laurent, Nicosulfuron application in agricultural soils drives the selection towards NS-tolerant microorganisms harboring various levels of sensitivity to nicosulfuron, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 4320–4333.
- [24] I. Nobels, P. Spanoghe, G. Haesaert, J. Robbens, R. Blust, Toxicity ranking and toxic mode of action evaluation of commonly used agricultural adjuvants on the basis of bacterial gene expression profiles, *PLoS One* 6 (2011) e24139.
- [25] M. Youness, Impact de la formulation et du mélange de deux pesticides (mésotrione et tébuconazole) sur leur biodégradation et la croissance de microorganismes, Univ. Blaise Pascal Clermont-Ferrand Fr., 2013 (Thesis DU2378).
- [26] I. Batisson, O. Crouzet, P. Besse-Hoggan, M. Sancelme, J.-F. Mangot, C. Mallet, J. Bohatier, Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp. from soil, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 1195–1201.
- [27] S. Durand, M. Sancelme, P. Besse-Hoggan, B. Combourieu, Biodegradation pathway of mesotrione: complementarities of NMR, LC-NMR and LC-MS for qualitative and quantitative metabolic profiling, *Chemosphere* 81 (2010) 372–380.
- [28] AZUR-Environmental, *Microtox user's manual* AZUR Environmental, Carlsbad, CA, USA, (1996).
- [29] P. Joly, F. Bonnemoy, J.-C. Charvy, J. Bohatier, C. Mallet, Toxicity assessment of the maize herbicides S-metolachlor, benoxacor, mesotrione and nicosulfuron, and their corresponding commercial formulations, alone and in mixtures, using the Microtox® test, *Chemosphere* 93 (10) (2013) 2444–2450.
- [30] P. Joly, F. Bonnemoy, P. Besse-Hoggan, F. Perrière, O. Crouzet, N. Cheviron, C. Mallet, Responses of limagne clay/organic matter-rich soil microbial communities to realistic formulated herbicide mixtures, including S-metolachlor, mesotrione, and nicosulfuron, *Water Air Soil Pollut.* 226 (2015).
- [31] L. Gu, J. Jian-dong, L. Xiao-hui, S.W. Ali, L. Shun-peng, Biodegradation of ethametsulfuron-methyl by *Pseudomonas* sp. SW4 isolated from contaminated soil, *Curr. Microbiol.* 55 (2007) 420–426.
- [32] J.-P. Ma, Z. Wang, P. Lu, H. Wang, S. Waseem Ali, S.-P. Li, X. Huang, Biodegradation of the sulfonylurea herbicide chlorimuron-ethyl by the strain *Pseudomonas* sp. LW3, *FEMS Microbiol. Lett.* 296 (2009) 203–209.
- [33] J. Xu, X. Li, Y. Xu, L. Qiu, C. Pan, Biodegradation of pyrazosulfuron-ethyl by three strains of bacteria isolated from contaminated soils, *Chemosphere* 74 (2009) 682–687.
- [34] J. Kim, K.-H. Liu, S.-H. Kang, S.-J. Koo, J.-H. Kim, Degradation of the sulfonylurea herbicide LGC-42153 in flooded soil, *Pest Manag. Sci.* 59 (2003) 1037–1042.
- [35] W. Luo, Y. Zhao, H. Ding, X. Lin, H. Zheng, Co-metabolic degradation of bensulfuron-methyl in laboratory conditions, *J. Hazard. Mater.* 158 (2008) 208–214.
- [36] J.C. Brodeur, S. Malpel, A.B. Anglesio, D. Cristos, M.F. D'Andrea, M.B. Poliserpi, Toxicities of glyphosate- and cypermethrin-based pesticides are antagonistic in the ten-spotted livebearer fish (*Cnesterodon decemmaculatus*), *Chemosphere* 155 (2016) 429–435.
- [37] A.R. Fernández-Alba, L.H. Guil, G.D. López, Y. Chisti, Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays, *Anal. Chim. Acta* 426 (2001) 289–301.
- [38] T. Katagi, Surfactant effects on environmental behavior of pesticides, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 194 (2008) 71–177, in: D.M. Whitacre (Ed.) Springer New York.
- [39] J.M. Martins, N. Chevre, L. Spack, J. Tarradellas, A. Mermoud, Degradation in soil and water and ecotoxicity of rimsulfuron and its metabolites, *Chemosphere* 45 (2001) 515–522.
- [40] N.-X. Wang, Q. Tang, G.-M. Ai, Y.-N. Wang, B.-J. Wang, Z.-P. Zhao, S.-J. Liu, Biodegradation of tribenuron methyl that is mediated by microbial acidohydrolysis at cell-soil interface, *Chemosphere* 86 (2012) 1098–1105.
- [41] J.-J. Zhang, Y.-F. Chen, T. Fang, N.-Y. Zhou, Co-metabolic degradation of tribenuron methyl a sulfonylurea herbicide, by *Pseudomonas* sp. strain NyZ42, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 76 (2013) 36–40.
- [42] M. Bottaro, P. Frascarolo, F. Gosetti, E. Mazzucco, V. Gianotti, S. Polati, E. Pollici, L. Piacentini, G. Pavese, M.C. Gennaro, Hydrolytic and photoinduced degradation of tribenuron methyl studied by HPLC-DAD-MS/MS, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (2008) 1221–1229.
- [43] R. Chahboune, H. Mountacer, M. Sarakha, Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry for the elucidation of hydroxyl radical oxidation of metsulfuron methyl and related sulfonylurea pesticide products: evidence for the triazine skeleton scission, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29 (2015) 1370–1380.
- [44] P. Lu, L. Jin, B. Liang, J. Zhang, S. Li, Z. Peng, X. Huang, Study of biochemical pathway and enzyme involved in metsulfuron-methyl degradation by *Ancylobacter* sp. XJ-412-1 isolated from soil, *Curr. Microbiol.* 62 (2011) 1718–1725.



- [45] E. Zanardini, A. Arnoldi, G. Boschin, A.D. Agostina, M. Negri, C. Sorlini, Degradation pathways of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl by a *Pseudomonas fluorescens* strain, *Ann. Microbiol.* 52 (2002) 25–38.
- [46] B.S. Ismail, O.K. Eng, M.A. Tayeb, Degradation of triazine-2-14C metsulfuron-methyl in soil from an oil palm plantation, *PLoS One* 10 (2015) e0138170.
- [47] Y. Li, W.T. Zimmerman, M.K. Gorman, R.W. Reiser, A.J. Fogiel, P.E. Haney, Aerobic soil metabolism of metsulfuron-methyl, *Pestic. Sci.* 55 (1999) 434–445.
- [48] S.M. Andersen, H.S. Mortensen, R. Bossi, C.S. Jacobsen, Isolation and characterisation of *Rhodococcus erythropolis* TA57 able to degrade the triazine amine product from hydrolysis of sulfonylurea pesticides in soils, *Syst. Appl. Microbiol.* 24 (2001) 262–266.



**Figure S1.** Phase contrast microscopy of *P. fluorescens* strain SG-1 (magnification x 1000).



**Figure S2.** Neighbor-joining phylogenetic analysis based on the multiple alignment of 16S rDNA sequences of *P. fluorescens* SG-1 with its closest homologues, sulfonyleurea herbicide-degrading strains (in bold) and nicosulfuron-degrading strains (underlined). Bootstrap values (1000 replicates) higher than 50 % were indicated at branches. GenBank accession numbers are indicated in brackets.

**Table S1.** Biosorption of nicosulfuron (1 mM initial concentration) on the strain SG-1. The concentration of nicosulfuron was determined either directly in the culture supernatant or after ethanol extraction of the bacterial pellet. The results are reported as the mean  $\pm$  standard error, n = 3.

Incubation time (day)	Nicosulfuron concentration (mM)		
	Culture supernatant	Bacterial pellet	Total
1	0.22 $\pm$ 0.01	0.70 $\pm$ 0.02	0.92 $\pm$ 0.02
2	0.27 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.04	0.76 $\pm$ 0.04
3	0.23 $\pm$ 0.01	0.38 $\pm$ 0.01	0.62 $\pm$ 0.02
4	0.21 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.01	0.48 $\pm$ 0.01
5	0.18 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.02

Principales conclusions de l'étude :

La souche *P. fluorescens* SG-1 transforme le nicosulfuron par un processus de co-métabolisme en produisant deux métabolites majeurs issus du clivage de la liaison sulfonylurée : l'ADMP et l'ASDM.

La toxicité de l'ADMP vis-à-vis de *A. fischeri* (test Microtox®) est 20 fois supérieure à celle du nicosulfuron. Cependant, le mélange ADMP + ASDM présente une toxicité réduite d'environ 17 fois comparée à l'ADMP seul, montrant un effet antagoniste de l'ASDM sur l'ADMP.

La transformation du nicosulfuron formulé est plus faible que celle de la substance active pure, suggérant un effet inhibiteur des adjuvants.

La souche SG-1 est capable de transformer deux autres sulfonylurées (le metsulfuron-méthyle et le tribénuron-méthyle) en utilisant différentes voies, dont certaines n'avaient jamais été décrites à ce jour.

Suite à la caractérisation des voies de dégradation de la mésotrione et du nicosulfuron, respectivement par les souches *B. megaterium* Mes11 et *P. fluorescens* SG-1, j'ai élargi mes recherches à l'étude de ces deux herbicides en mélange, en présence ou non du troisième herbicide ciblé dans mon étude : le S-métolachlore.





## Chapitre 3. Mélange de mésotrione, nicosulfuron et S-métolachlore : étude des voies de biotransformation et toxicité des métabolites

N'ayant pas réussi à isoler de souches/consortia capables de dégrader simultanément les 3 herbicides étudiés, j'ai alors été amené à recréer un consortium multi-dégradant en associant les souches *B. megaterium* Mes11 et *P. fluorescens* SG-1 transformant, respectivement, la mésotrione et le nicosulfuron. Les tests de transformation de la mésotrione et/ou du nicosulfuron ont été réalisés en condition de resting cells en MM (cf. Partie III, Chapitre 1, 1.2.1) additionné ou non de 10 g L<sup>-1</sup> de glucose et de 1 mM de mésotrione et/ou nicosulfuron. Le dosage des herbicides a été réalisé par HPLC (cf. Tableau 8).

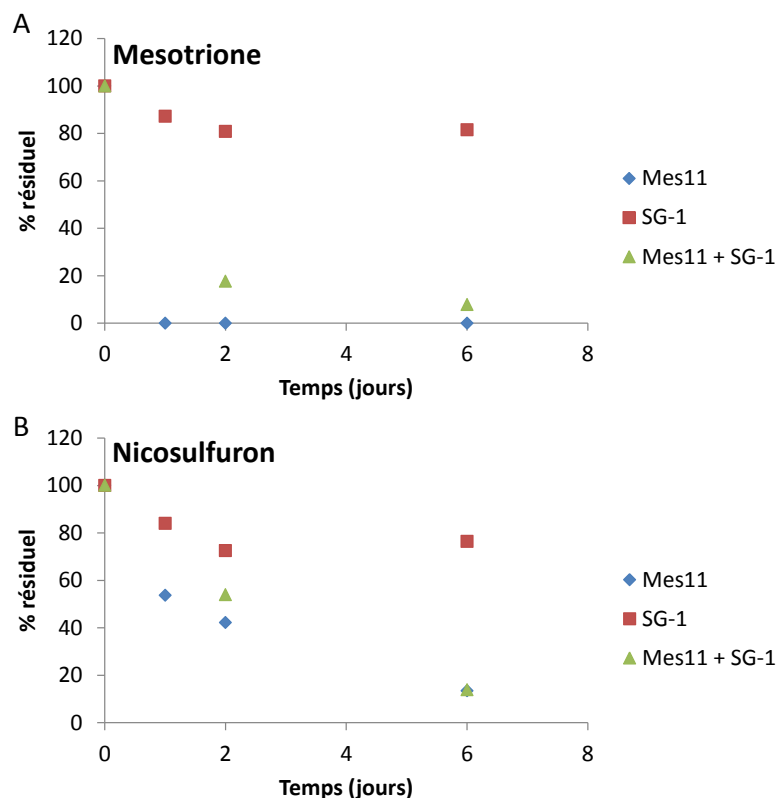
Le récapitulatif des tests réalisés et des résultats obtenus en termes de pourcentages de transformation de la mésotrione et du nicosulfuron (seuls ou en mélange) par les souches Mes11 et SG-1 (seules ou en consortium artificiel) est présenté dans le Tableau 10. Ces résultats préliminaires ont fait apparaître que les deux souches pouvaient coexister et que ce consortium artificiel était capable de transformer la mésotrione et le nicosulfuron (Figure 35). La dégradation de la mésotrione est cependant légèrement ralentie quand les deux souches sont ensemble (environ 80 % de dégradation à t = 2 jours) en comparaison de sa dégradation par la souche Mes11 seule (100 % de dégradation à t = 1 jour) (Figure 35). Il faut également noter un taux de transformation du nicosulfuron par la souche SG-1 nettement moins élevé en conditions de resting cells (environ 20 % en 6 jours, Figure 35) qu'en croissance (environ 80 % en 6 jours) (cf. Partie III, Chapitre 2, 2).

**Tableau 10.** Taux de dissipation de la mésotrione (Méso) et du nicosulfuron (Nico) seuls ou en mélange, par les souches *B. megaterium* Mes11 et *P. fluorescens* SG-1 seules ou en consortium artificiel. Les tests de dégradation ont été réalisés en condition de resting cells, dans du MM + herbicide (1 mM chacun), avec ou sans glucose (10 g L<sup>-1</sup>). Les résultats correspondent à des taux de transformation après 6 jours d'incubation.

		Mes11		SG-1		Mes11 + SG-1	
		+ glucose	- glucose	+ glucose	- glucose	+ glucose	- glucose
Mix	Méso	100.0	100.0	18.0	0.0	100.0	100.0
	Nico	87.0	0.0	23.5	0.0	82.5	0.0
	Méso	100.0	100.0	8.3	0.0	92.0	100.0
	Nico	80.0	0.0	30.0	0.0	86.0	0.0

Nous avons également pu mettre en évidence, que la souche Mes11, en plus de transformer la mésotrione, était également capable de transformer plus efficacement le nicosulfuron en condition de co-métabolisme et de resting cells que la souche SG-1 (Figure 35, Tableau 10).

Devant ce résultat inattendu, j'ai par la suite fait le choix d'utiliser la souche *B. megaterium* Mes11 seule pour étudier les voies de transformation des deux herbicides en mélange.



**Figure 35.** Cinétiques de dissipation de la mésotrione (A) et du nicosulfuron (B) seuls par les souches *B. megaterium* Mes11, *P. fluorescens* SG-1 et du mélange équimolaire (1 mM chacun) des deux herbicides par le consortium des deux. Les données correspondent au pourcentage résiduel de chaque molécule (aire du pic de la molécule dans le chromatogramme HPLC à un instant t divisée par l'aire du pic à t = 0 jours).

Dans un premier temps, j'ai donc été amené à élucider la voie de biotransformation du nicosulfuron chez la souche *B. megaterium* Mes11, et dans un 2<sup>nd</sup> temps, à étudier la transformation du mélange nicosulfuron/mésotrione par la souche Mes11, et ceci en présence ou en absence de *S*-métolachlore, le troisième herbicide du mélange qui n'est pas transformé par la souche, mais qu'elle est capable de tolérer. La toxicité des métabolites de la mésotrione et du nicosulfuron a également été déterminée à l'aide du test standard Microtox<sup>®</sup>. Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article ci-après (en préparation).

## Potential environmental risk assessment (Biodegradation, Toxicity) of a herbicide mixture of mesotrione, nicosulfuron and S-metolachlor

Louis Carles<sup>a,b,c</sup>, Muriel Joly<sup>a,b</sup>, Frédérique Bonnemoy<sup>a,b</sup>, Martin Lerembouire<sup>a,c</sup>, Florence Donnadieu<sup>a,b</sup>, Isabelle Batisson<sup>§a,b\*</sup> and Pascale Besse-Hoggan<sup>§a,c\*</sup>

<sup>a</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup> CNRS, UMR 6023, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, TSA 60026, CS 60026, 63178 Aubière Cedex, France

<sup>c</sup> CNRS, UMR 6296, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, TSA 60026, CS 60026, 63178 Aubière Cedex, France

<sup>§</sup> Both authors contributed equally to the work

### Abstract

The Environmental Risk Assessment (ERA) of chemicals is of great concern in the case of unintentional mixture of pesticides coming from agricultural lands treated with a variety of pesticides. We focused our work on a mixture of three herbicides composed of mesotrione ( $\beta$ -triketone), nicosulfuron (sulfonylurea) and S-metolachlor (chloroacetanilide) commonly applied on maize crops in a short period of time. The biotransformation pathways of mesotrione and nicosulfuron were qualitatively and quantitatively determined with a model bacterial strain (*Bacillus megaterium* Mes11) isolated from an agricultural soil, able to biotransform both these herbicides. Although these pathways were not affected in the case of binary or ternary herbicide mixtures, kinetics of the parent herbicide disappearance as well as those of the metabolite formation were strongly modulated. The toxicity of the parent compounds and metabolites has been evaluated for individual compounds and mixtures with the standardized Microtox<sup>®</sup> test. Synergistic interactions have been pointed out for all the parent compound mixtures, while synergistic, antagonistic or additive toxicity was found for metabolite mixtures, depending on the mixture. Overall, the results highlight the need to take into account active ingredient and metabolites for the determination of environmental fate, toxicity and ERA of pesticide mixtures.

**Keywords:** Pesticide mixture; Simultaneous biotransformation; Environmental Risk Assessment; Microbial toxicity

## Introduction

Agricultural practices have considerably evolved over the last decades in accordance with the Integrated Pest Management (IPM), which includes different management practices to grow healthy crops and minimize the use of pesticides. This trend led to the introduction of new-generation pesticides applied at lower doses than the former ones. However, these “low-dose” pesticides are often used in mixture to improve their efficiency and the range of weeds treated. In return, it can lead to a potential contamination of surface and ground water by a variety of compounds coming from various sources. The Environmental Risk Assessment (ERA) of such unintentional mixtures is a great challenge because of their complex composition, many of the compounds being unidentified and toxicity data being lacking (Kienzler *et al.*, 2014). However, the regulatory requirements for mixture ERA is not or only partially addressed without specific recommendations under the legislation of the European Union as for the Environmental Impact Assessment (Dir 2011/92/EC), the Integrated Pollution Prevention and Control (Dir 2010/75/EC), the Waste and waste streams Directive (Dir 2008/98/EC), the Water Framework Directive (Dir 2006/60/EC) and the Groundwater Directive (Dir 2006/118/EC) (Kienzler *et al.*, 2016).

The mixture risk assessment can be based on the (eco)toxicological data of individual compounds combined with the chemical concentration data, allowing the prediction of a mixture toxicity using a mathematical model. However, this approach requires detailed information regarding the identity, concentration and toxicity of the individual compounds, and is limited because it does not consider synergistic effects, known to be possible with pesticides (Kienzler *et al.*, 2016). Moreover, linking toxic effects and monitoring data of environmental surveys can only be carried out with compounds that are identified. Active substances or metabolites that are not analysed or detected because of their low concentrations are not considered, although they can have an impact. The identification of biodegradation pathways of chemicals in mixture (*i.e.* identification of metabolites) is therefore of great concern to include all parent compounds and transformation products potentially found in a given environment in monitoring studies.

Up to now, only a few studies investigated the simultaneous biodegradation of several pesticides either by natural microbial consortia (Kengara *et al.*, 2010; Kulshrestha and Kumari, 2010; Pino and Peñuela, 2011; Ortiz-Hernandez, 2014), artificial consortia composed of single-pesticide degrading strains (Rama Krishna and Philip, 2011; Abraham *et al.*, 2014) or genetically engineered bacteria (Shimazu *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010, 2013; Cao *et al.*, 2013). Nevertheless, very few studies have illustrated the capability of a

single microbial strain isolated from the environment to simultaneously degrade several mixed pesticides from different chemical families (Lü *et al.*, 2008; Karas *et al.*, 2010; Kulshrestha and Kumari, 2010). Moreover, these studies are often limited to the measure of pesticide degradation rates and are not interested in the fate and toxicity of both parent compounds and metabolites, alone or in mixture.

We focused our work on three herbicides, commonly applied in a short period of time on maize crops: mesotrione ( $\beta$ -triketone), nicosulfuron (sulfonylurea) and S-metolachlor (chloroacetanilide). Mesotrione (2-(4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoyl)cyclohexane-1,3-dione) is a selective herbicide inhibiting the carotenoid biosynthesis of a wide range of broad-leaved and grass weeds in maize, with a recommended field dose (RD) of 150 g AI ha<sup>-1</sup> (Mitchell *et al.*, 2001). Two major metabolites, AMBA (2-amino-4-methylsulfonylbenzoic acid) and MNBA (4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoic acid) are often detected in the environment (Alferness and Wiebe, 2002). Both these metabolites possess higher persistence in soil than the parent compound (Barchanska *et al.*, 2016) and AMBA was found to be more toxic than mesotrione toward *Aliivibrio fischeri* (Bonnet *et al.*, 2008). Nicosulfuron (2-[(4,6-dimethoxypyrimidin-2-ylcarbamoyl)sulfamoyl]-N,N-dimethylnicotinamide) is a selective herbicide inhibiting the branched-chain amino acid biosynthesis of annual grass, broad-leaved and perennial weeds, with a RD of 60 g AI ha<sup>-1</sup> (Schloss, 1990). The major transformation pathway of nicosulfuron is the hydrolysis of the sulfonylurea bridge, leading to ADMP (2-amino-4,6-dimethoxypyrimidine) and ASDM (2-(aminosulfonyl)-N,N-dimethyl-3-pyridinecarboxamide), ADMP being more toxic than the parent compound (Carles *et al.*, 2017). S-metolachlor (2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-[(1S)-2-methoxy-1-methylethyl]acetamide) is the active enantiomer of metolachlor, which replaces the racemic mixture banned in 2003 in France. It inhibits the very long chain fatty acid (VLCFA) biosynthesis of annual grass, and broad-leaved weeds, with a RD of 1920 g AI ha<sup>-1</sup> (Gotz and Boger, 2004). The concentration of its major metabolites (metolachlor oxalinic acid (OXA) and ethan sulfonic acid (ESA)), which are less adsorbed on soil, are often higher in water than that of the parent compound (Kolpin *et al.*, 2004; Baran and Gourcy, 2013).

These herbicides are applied sequentially in pre-emergence (S-metolachlor) and in post-emergence (mixture of nicosulfuron and mesotrione) in maize crops to replace atrazine, banned in 2003 due to its high toxicity on numerous organisms (Graymore *et al.*, 2001), its persistence and its transfer into the environment. Despite the predictability of their co-occurrence due to their quasi-simultaneous applications on the same crop, combinations of these herbicides have not extensively been studied, notably regarding their biotransformation,

which is assumed to be the predominant process involved in their environmental fate. Several isolated microbial strains, able to biotransform each herbicide separately, have already been described: for mesotrione (Durand *et al.*, 2006, 2010; Batisson *et al.*, 2009; Pileggi *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015; Romdhane *et al.*, 2015), for nicosulfuron (Yang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2015a; b; Carles *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016), and in a lesser extend for S-metolachlor (Martins *et al.*, 2007). Some studies have also investigated the microbial toxicity (Microtox<sup>®</sup>) of pure active ingredients and formulations (alone or in mixture) of the three herbicides (Bonnet *et al.*, 2008; Joly *et al.*, 2013). However, no data are available concerning the biotransformation kinetics of these herbicides and the toxicity of parent compounds and/or metabolites when they are in mixture.

A preliminary screening of several bacterial strains for their ability to transform the three herbicides revealed that *Bacillus megaterium* Mes11 (previously isolated from an agricultural soil by Batisson *et al.* (2009) and described for its mesotrione-degrading activity) was also able to transform nicosulfuron. The aims of this study were therefore to determine for this model strain: (i) the biotransformation pathways of each of the three studied herbicides, (ii) the effects of each compound on the biotransformation of the other ones, and (ii) the toxicity of the parent compounds and metabolites, alone or in mixture, with the standardized Microtox<sup>®</sup> bioassay according to the biotransformation kinetics. The present study will therefore give relevant information on the biotransformation and toxicity of the studied pesticide mixture, allowing the implementation of databases for a comprehensive and exhaustive ERA.

## **Experimental**

### **Bacterial strain, chemicals and media**

The bacterial strain *Bacillus megaterium* Mes11 was previously isolated from an agricultural soil (Batisson *et al.*, 2009). Nicosulfuron (Pestanal, purity 99.6%), mesotrione (Pestanal, purity 99.9%), S-metolachlor (Pestanal, purity 98.4%), AMBA (2-Amino-4-(methylsulfonyl)benzoic acid) and ADMP (2-amino-4,6-dimethoxypyrimidine, purity 98.0%) were purchased from Sigma Aldrich (France) and ASDM (2-(aminosulfonyl)-N,N-dimethyl-3-pyridinecarboxamide, purity 98%) from J and K Scientific (Germany). Glucose-mineral salt medium (GSM), pH 6.7, was composed of (/L): 5 g glucose, 1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g KNO<sub>3</sub>, 0.2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g NaCl, 0.02 g CaCl<sub>2</sub>, 0.005 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 mL of a salt stock solution and 1 mL of a vitamin stock solution. The salt stock solution contained (/L): 20 g boric acid, 18 g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2 g ZnSO<sub>4</sub>, 1 g CuSO<sub>4</sub>, 2.5 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.01 g Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. The

vitamin stock solution contained (/L): 2 mg biotin and 5 mg thiamine-HCl. Tryptic soy broth (TS) medium (Sigma Aldrich, France) is composed of (/L): 17 g casein peptone, 3 g soya peptone, 5 g NaCl, 2.5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5 g glucose (pH 7.3).

#### Biotransformation assays

The strain Mes11 was grown in 2 L portions of TS broth supplemented with 0.1 mM mesotrione, in 5 L flasks incubated à 28 °C on a rotary shaker (150 rpm). The cells (750 mL of the culture) were harvested after 24 h of culture and centrifuged at 8 000 x g for 15 min at 4 °C. The bacterial pellet was washed in NaCl (8 g/L). The resting cells were then resuspended in 150 mL of GSM supplemented with 1 mM of mesotrione, nicosulfuron and *S*-metolachlor, either alone, in binary or ternary mixtures. Uninoculated media served as abiotic controls. Each condition was carried out in triplicate. The cultures were incubated in the dark at 28°C under agitation at 150 rpm on a rotary shaker and sampled periodically (3 x 1 mL). The samples were frozen at -25°C until analysis by HPLC, <sup>1</sup>H NMR and LC/ESI-MS.

#### Analysis of the herbicides and their metabolites

##### *Analysis by HPLC*

The herbicide analyses were monitored by HPLC on an Agilent Series 1100 chromatograph, equipped with a Diode Array Detector (DAD) and a reverse phase column (Zorbax Eclipse XDB-C18, 3.5 µm, 75 mm x 4.6 mm) at 22°C. The mobile phase was composed of acetonitrile (Solvent A) and acidified water (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% v/v; pH 2.9) (Solvent B) used at a flow rate of 1 mL/min and with different linear gradients according to the herbicide analysed (Table 1). Injection volume: 5 µL. Flow: 1 mL/min. Each sample was injected twice.

**Table 1.** HPLC conditions for the analysis of herbicides and their metabolites.

	Nicosulfuron	S-metolachlor	Mesotrione / Mixture
Mobile phase, % acetonitrile (v/v)	0-1 min: 2% 1-10 min: 2-70% 10-13 min: 70-100% 13-13.3 min: 100-2% 13.3-15 min: 2%	0-1 min: 2% 1-17 min: 2-70% 17-22 min: 70-100% 22-22.3 min: 100-2% 22.3-25 min: 2 %	0-5 min: 5% 5-30 min: 5-70% 30-32 min: 70-100% 32-33 min: 100-5% 33-35 min : 2 %
λ (DAD)	254 nm	220 nm	220 nm 254 nm
λ <sub>ex</sub> (FLD)	220 nm	220 nm	220 nm
λ <sub>em</sub> (FLD)	430 nm	430 nm	430 nm



### *Analysis by <sup>1</sup>H NMR*

<sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analyses were performed at 25°C at 500.134 MHz on an Avance 500 Bruker spectrometer (Bruker Biospin, Wissembourg, France) equipped with a triple-resonance (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N) inverse probe with 5-mm-diameter tubes containing 600 μL of sample (540 μL of supernatant with 60 μL of a 5 mM of tetradeuterated sodium trimethylsilylpropionate), with water being suppressed by a classical two phase-shifted pulse saturation sequence (double pulsed field gradient echo sequence WATERGATE) according to Durand *et al.* (2010).

### *Analysis by LC-MS*

LC/ESI-MS analyses were performed on a ThermoScientific UHPLC Ultimate 3000 RSLC coupled with an Orbitrap Q-Exactive analyser. The crude supernatants were harvested (5 min at 13,000 g) before LC-MS analyses and directly injected in the LC-MS system without any further treatment. The analyses were carried out in positive mode. The UHPLC was equipped with a Kinetex EVO C18; 100 x 2.1 mm; 1.7 μm (Phenomenex) at 30°C with a gradient acetonitrile + 0.1% Formic acid (Solvent A) and water + 0.1% Formic acid (Solvent B): 0–7.5 min: 5–99 % A (linear); 7.5– 8.5 min: 99 % A; 8.5–9 min: 99–5 % A; 9–11 min: 5 % A. Flow: 0.45 mL/min. For the mass spectrometer, gaseous N<sub>2</sub> was used as nebulizer gas (50 L/h). The spray voltage was 3.2 kV.

## Modelling of the herbicide degradation and metabolite formation/disappearance kinetics

### *Parent compound and metabolite degradation*

The transformation kinetics of the parent herbicides and metabolites were fitted with the DFOP (Double First-Order in Parallel) model using the CAKE (Computer Assisted Kinetic Evaluation) V 3.2 software (Tessella Technology & Consulting, UK), characterized by the following equation:

$$C_t = C_0 g^{-k_1 t} + C_0 (1 - g)^{-k_2 t} \quad (\text{Equation 1})$$

where  $t$  is the incubation time,  $C_t$  the chemical concentration at time  $t$ ,  $C_0$  the initial concentration of the parent herbicide or the maximal concentration of the intermediate metabolites,  $g$  the fraction of  $C_0$  applied to the first term of the equation 1 (*i.e.* the fraction of the initial chemical that degrades at the fastest rate),  $k_1$  and  $k_2$  the rate constants for the first and the second terms of the equation 1, respectively (in days<sup>-1</sup>). The dissipation time  $x$  (DT <sub>$x$</sub> ) value is the time required for the concentration to decline to  $x$  % of the initial value.

### *Metabolite production*

The kinetics of the metabolite production (intermediate metabolites and end-products) was fitted with the DoseResp function of the OriginPro V8 software (Origin Lab Corporation, USA), characterized by the following equation:

$$C_t = \frac{C_{max}}{1 + 10^{(h_{50} - t)(p)}} \quad (\text{Equation 2})$$

where  $t$  is the incubation time,  $C_t$  the chemical concentration at time  $t$ ,  $C_{max}$  the maximal concentration of this chemical,  $h_{50}$  the time required for the concentration to reach 50 % of the final value and  $p$  the rate constant.

### Mixture toxicity assays

#### *Mixture ratio*

The mixtures of the active ingredients and/or metabolites were carried out according to the initial concentration of the parent compounds (starting condition) and the final concentration of the transformation products (after 20 days of incubation). In our study, all the ratios were 1:1 (binary mixture), 1:1:1 (ternary mixture), and 1:1:1:1 (quaternary mixture), except for mixtures containing AMBA which has a proportion of 0.31.

#### *Microtox<sup>®</sup> assays*

The herbicides and their metabolites were dissolved in DMSO, and the median inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of each mixture of chemicals on *Aliivibrio fischeri* bioluminescence was measured after 15 min of incubation as previously described (AZUR-Environmental, 1996; Bonnet *et al.*, 2008; Joly *et al.*, 2013).

#### *Modelling of mixture toxicity*

The mixture toxicities were compared with the expected toxicity values predicted by the Concentration Addition (CA) model (Berenbaum, 1985). The prediction of combined effects of mixture-components based on CA can be expressed as:

$$IC_{50, mix} = \left( \sum_{i=1}^n \frac{p_i}{IC_{50, i}} \right)^{-1} \quad (\text{Equation 3})$$

where  $IC_{50, mix}$  is the total concentration of the mixture that causes 50 % inhibition,  $p_i$  the proportion of the  $i^{th}$  component in the mixture,  $n$  is the number of components in the mixture, and  $IC_{50, i}$  the median inhibitory concentration of the  $i^{th}$  compound when applied alone.

The synergy was evaluated with the ratio of predicted *versus* observed IC<sub>50</sub> values, called Model Deviation Ratio (MDR) and defined as:

$$MDR = \frac{Expected}{Observed} \quad (\text{Equation 4})$$

where “*Expected*” corresponds to the IC<sub>50, mix</sub> predicted by the CA model, and “*Observed*” is the IC<sub>50, mix</sub> observed with the Microtox<sup>®</sup> test (*i.e.* the concentration of each component in the mixture causing 50 % inhibition of *A. fischeri* bioluminescence). The compounds were then classified as synergistic (MDR > 2), additive (0.5 ≤ MDR ≤ 2), or antagonistic (MDR < 0.5).

### Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using the OriginPro 8 software. The differences in IC<sub>50</sub> values of the parent compounds and metabolites, alone or in mixture, were assessed using one-way ANOVA. The normality and homogeneity of variance were checked prior to ANOVA analysis (Kolmogorov Smirnov’s and Levene’s tests, respectively, P < 0.05). Separate *post hoc* comparisons (Tukey’s test, P < 0.05) were applied to determine differences in IC<sub>50</sub> values of the parent compounds and metabolites, alone or in combination.

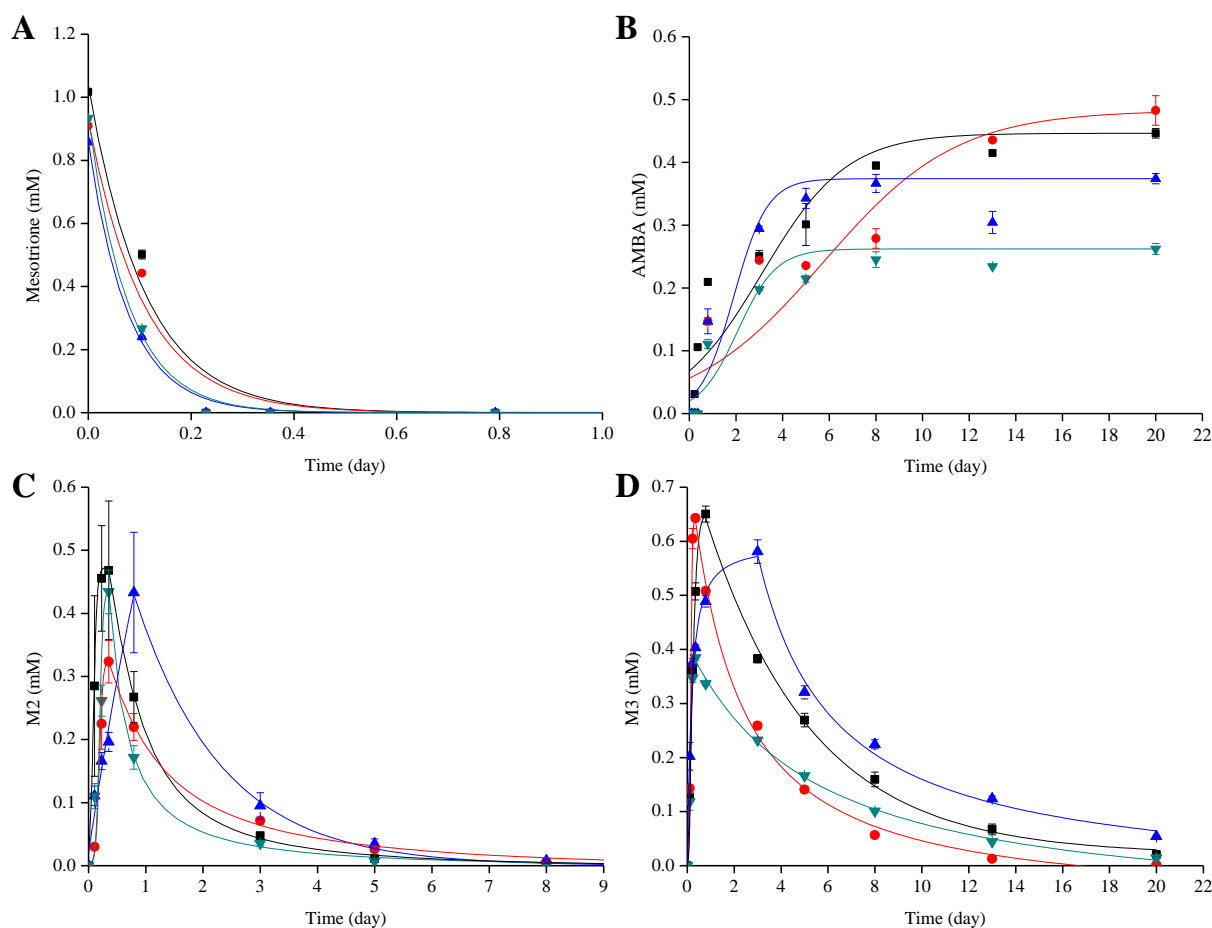
The differences in degradation kinetic parameters and DT<sub>50</sub> values of parent compounds and metabolites, alone or in mixture, were assessed in the same manner. Separate *post hoc* comparisons (Tukey’s test, P < 0.05) were applied separately for each compound on parameters or DT<sub>x</sub>, to determine differences between conditions (alone or in mixture).

## Results and Discussion

### Biotransformation kinetics of each herbicide by *Bacillus megaterium* Mes11

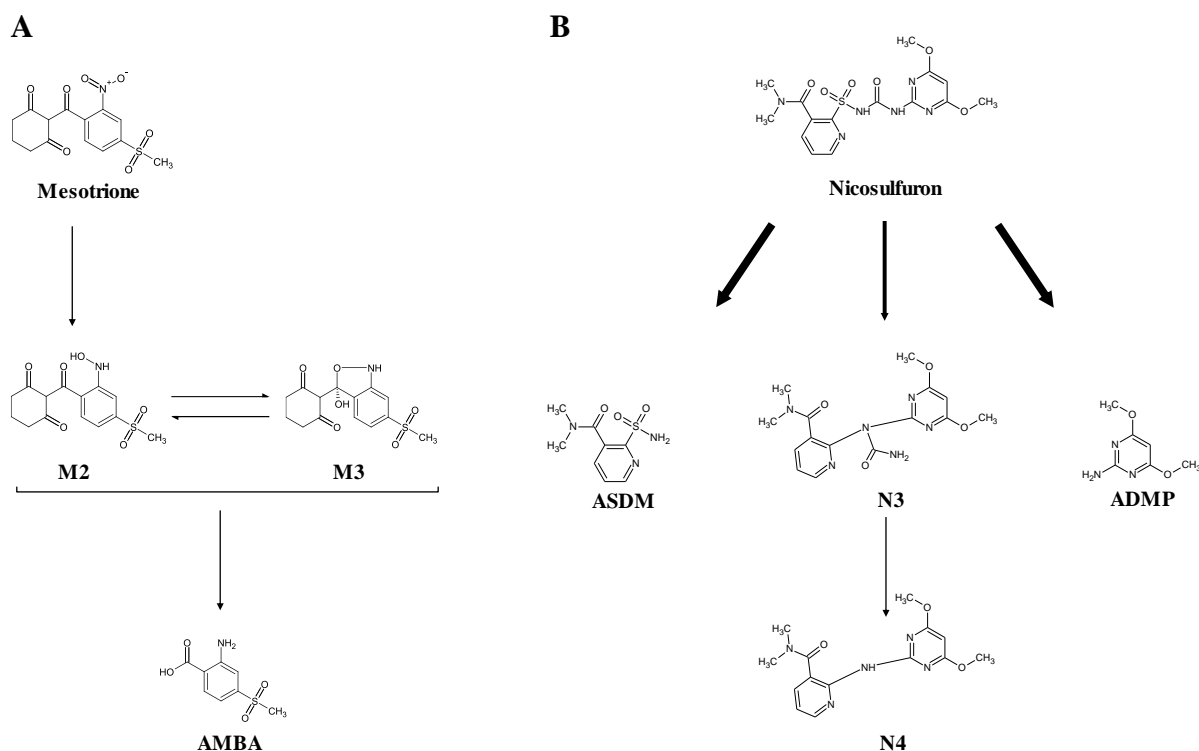
#### *Mesotrione*

Both HPLC and <sup>1</sup>H NMR analyses revealed a complete removal of mesotrione (1 mM) within 5.5 h of incubation with the strain Mes11 (Figure 1A), four to five-times faster than that observed previously (Batisson *et al.*, 2009). The increase of the mesotrione biotransformation rate observed in our study could be due to the presence of glucose (5 g L<sup>-1</sup>) during the biodegradation step, that could lead to a different physiological state of Mes11 strain compared to what was observed in minimal medium without glucose used in the previous study (Batisson *et al.*, 2009).



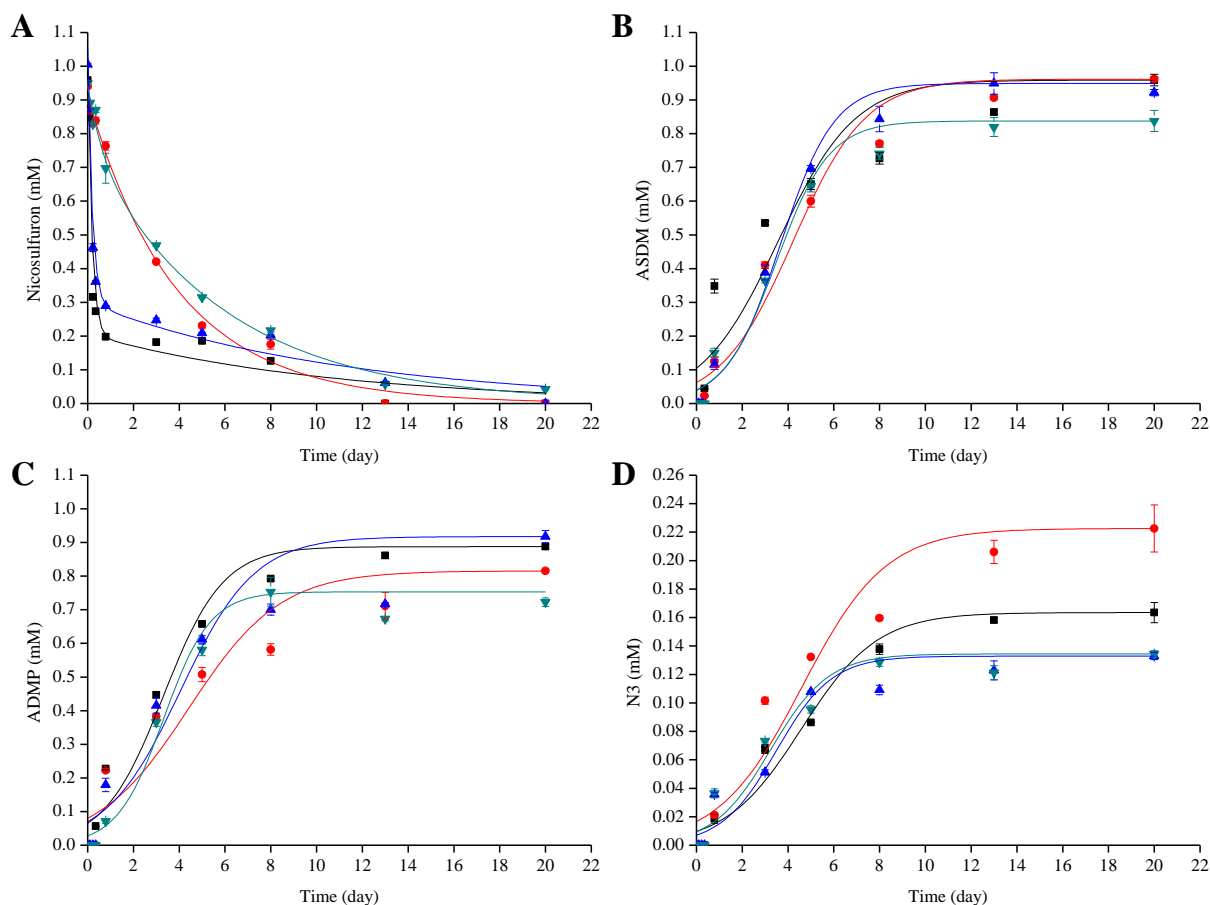
**Figure 1.** Comparative biotransformation kinetics of mesotrione (alone or in mixture) by *Bacillus megaterium* Mes11. Mesotrione alone (—■—) or with nicosulfuron (—●—), S-metolachlor (—▲—) or nicosulfuron and S-metolachlor (—▼—). (A) mesotrione, (B) AMBA, 2-Amino-4-(methylsulfonyl)benzoic acid (C) M2 and (D) M3, hydroxylamino and isoxazolol derivatives of mesotrione, respectively. The values are means  $\pm$  standard errors ( $n \geq 3$ ) of experimental data. Fitting curves are also indicated (decreasing concentration = DFOP model, increasing concentration = DoseResp model).

The mesotrione metabolites, identified by  $^1\text{H}$  NMR and LC-MS, were the same as those previously described (Figure 2A): two transitory metabolites, an hydroxylamino derivative (M2) obtained by reduction of the nitro group of mesotrione, in equilibrium with its cyclized form isoxazolol (M3) formed by an intramolecular cyclization of the hydroxyl moiety of the hydroxylamine on the nearest carbonyl group, were observed and transformed into AMBA, which accumulated in the medium (Figures 1B-D) (Batisson *et al.*, 2009). The presence of glucose has therefore not changed the biotransformation pathway of mesotrione by Mes11 strain.



**Figure 2.** Proposed scheme of (A) mesotrione and (B) nicosulfuron biotransformation by *Bacillus megaterium* Mes11 in GSM. The thick and thin arrows show the main and the minor pathways, respectively. AMBA, 2-Amino-4-(methylsulfonyl)benzoic acid; M2 and M3, hydroxylamino and isoxazolol derivatives of mesotrione, respectively; ADMP, 2-amino-4,6-dimethoxypyrimidine; ASDM, 2-(aminosulfonyl)-N,N-dimethyl-3-pyridinecarboxamide; N3, 2-(1-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yl)-ureido)-N,N-dimethyl-nicotinamide; N4, 2-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yl)-N,N-dimethyl-nicotinamide.

The M2 and M3 transitory metabolites reached their maximal concentrations (about 0.5 and 0.65 mM, respectively) after 8 and 19 h of incubation, respectively, and have completely disappeared after 8 and 20 days of incubation (Figures 1C and 1D). The increase of the AMBA concentration (end-product) was more rapid in presence of glucose than in its absence (*i.e.* compared to data from Batisson *et al.* (2009)), which is consistent with the faster transformation of mesotrione observed in our study. Additionally, its final concentration was higher in presence of glucose (0.45 mM) than in its absence (0.30 mM). The presence of glucose has therefore not only accelerated the transformation of mesotrione, but also the production of AMBA and increased its final concentration.



**Figure 3.** Comparative biotransformation kinetics of nicosulfuron (alone or in mixture) by *Bacillus megaterium* Mes11. Nicosulfuron alone (—■—) or with mesotrione (—●—), S-metolachlor (—▲—) or mesotrione and S-metolachlor (—▼—). (A) nicosulfuron, (B) ASDM, 2-(aminosulfonyl)-N,N-dimethyl-3-pyridinecarboxamide (C) ADMP, 2-amino-4,6-dimethoxypyrimidine and (D) N3, 2-(1-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yl)-ureido)-N,N-dimethyl-nicotinamide. The values are means  $\pm$  standard errors ( $n \geq 3$ ) of experimental data. Fitting curves are also indicated (decreasing concentration = DFOP model, increasing concentration = DoseResp model).

### Nicosulfuron

Preliminary tests showed that *B. megaterium* Mes11 strain was not able to biotransform nicosulfuron in resting cell conditions without glucose (data not shown). However, in GSM, the Mes11 strain totally transforms this herbicide within 20 days (Figure 3A), indicating that nicosulfuron is not used as a carbon source but is only co-metabolically transformed, as described for all the other nicosulfuron-transforming strains isolated until now (Lu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2015a; Carles *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016). The fast dissipation of nicosulfuron observed within 19 h of incubation (about 80% of dissipation, Figure 3A) resulted mainly from an adsorption of nicosulfuron on bacteria. This step was then followed by the transformation of nicosulfuron (from 20 h to 20 days), leading to the quantitative formation of three major metabolites identified by LC-MS and  $^1\text{H}$  NMR analyses (Figures 3B-D). Two of them resulted from the cleavage of the C-N bound of

the sulfonylurea bridge: **ASDM** (2-aminosulfonyl-N,N-dimethyl-nicotinamide) and **ADMP** (2-amino-4,6-dimethoxypyrimidine). A third metabolite (**N3**), resulted from the cleavage of the C-S bond of the sulfonylurea bridge and contraction by elimination of the sulfur dioxide group, was identified as 2-(1-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yl)-ureido)-N,N-dimethyl-nicotinamide, as already described with three other nicosulfuron-transforming strains, *Talaromyces flavus* LZM1, *Alcaligenes faecalis* ZWS11 and *Pseudomonas fluorescens* SG-1 (Song *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2015a; Carles *et al.*, 2017). A very minor metabolite (**N4**, 2-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yl)-N,N-dimethyl-nicotinamide) was also detected by LC-(+)ESI-MS, corresponding to the hydrolysis of the **N3** urea function (Figure 2B).

Both ASDM and ADMP concentrations reached about 0.8 mM as soon as 8 days of incubation, while N3 concentration did not exceeded 0.1 mM (Figures 3B-D). These results indicate that the major transformation pathway of nicosulfuron is the hydrolytic cleavage of the sulfonylurea bridge leading to the formation of ASDM and ADMP, which is a common (bio)transforming pathway of sulfonylurea herbicides (Sarmah and Sabadie, 2002; Kim *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009; Carles *et al.*, 2017). ADMP was also identified with all the nicosulfuron-transforming strains reported in the literature and can be therefore described as a common metabolite.

#### *S-metolachlor*

*S*-metolachlor was not transformed by the strain Mes11 since the initial and final (after 20 days of incubation) *S*-metolachlor concentrations were similar.

#### Biotransformation kinetics of the herbicide mixtures by *B. megaterium* Mes11

The same mesotrione and nicosulfuron metabolites were identified in the absence or in the presence of the other herbicides, indicating no effect of the studied herbicides on the biotransformation pathway of mesotrione (Figures 1 and 2A) and nicosulfuron (Figure 2B and 3). However, some differences could be identified in terms of transformation kinetics.

**Table 2.** Kinetics of mesotriene biotransformation and production of its metabolites. The experimental data were fitted with the DFOP and DosaResp function using CAKE and OriginPro, respectively, as described in the Materials and Methods section. The values of model parameters, coefficient of determination ( $r^2$ ) and Dissipation Time x% (DT<sub>x</sub>) are reported as the mean  $\pm$  standard error (SE),  $n = 3$ . Significant differences between conditions for the parameters of each compound are indicated by low-case letters  $a < b < c$  (Tukey's test,  $P < 0.05$ ).

Compound	Condition	Model	Model parameters				g	DT <sub>50</sub> (day)	DT <sub>90</sub> (day)	$r^2$
			C <sub>0</sub> (mM)	k <sub>1</sub> (day <sup>-1</sup> )	k <sub>2</sub> (day <sup>-1</sup> )	k <sub>3</sub> (day <sup>-1</sup> )				
Mesotriene	Mesotriene	DFOP	1.04 $\pm$ 2.10 <sup>-3</sup>	8.85 $\pm$ 0.15 (a)	4.10 <sup>-5</sup> $\pm$ 3.10 <sup>-5</sup>	0.99 $\pm$ 7.10 <sup>-4</sup>	0.08 $\pm$ 1.10 <sup>-3</sup> (b)	0.26 $\pm$ 4.10 <sup>-3</sup> (c)	0.973 $\pm$ 0.002	
	Mesotriene + Nicoufuron	DFOP	0.93 $\pm$ 6.10 <sup>-3</sup>	8.91 $\pm$ 0.06 (a)	3.10 <sup>-5</sup> $\pm$ 3.10 <sup>-5</sup>	1.00 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 5.10 <sup>-3</sup> (b)	0.26 $\pm$ 2.10 <sup>-2</sup> (c)	0.975 $\pm$ 0.001	
	Mesotriene + S-metolachlor	DFOP	0.86 $\pm$ 8.10 <sup>-3</sup>	12.77 $\pm$ 0.26 (b)	2.10 <sup>-5</sup> $\pm$ 5.10 <sup>-5</sup>	1.00 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 1.10 <sup>-3</sup> (a)	0.18 $\pm$ 2.10 <sup>-2</sup> (a)	0.997 $\pm$ 2.10 <sup>-4</sup>	
	Mesotriene + Nicoufuron + S-metolachlor	DFOP	0.93 $\pm$ 1.10 <sup>-2</sup>	12.48 $\pm$ 0.75 (b)	8.10 <sup>-5</sup> $\pm$ 7.10 <sup>-5</sup>	0.99 $\pm$ 1.10 <sup>-4</sup>	0.06 $\pm$ 4.10 <sup>-3</sup> (a)	0.21 $\pm$ 0.00 (b)	0.996 $\pm$ 0.001	
M2 (†)	Mesotriene	DFOP	0.51 $\pm$ 0.10	0.78 $\pm$ 0.07 (b)	0.01 $\pm$ 8.10 <sup>-4</sup>	1.00 $\pm$ 0.00	0.91 $\pm$ 0.09 (a)	3.00 $\pm$ 0.30 (a)	0.955 $\pm$ 0.021	
	Mesotriene + Nicoufuron	DFOP	0.33 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.01 (a)	0.01 $\pm$ 3.10 <sup>-4</sup>	1.00 $\pm$ 0.00	1.36 $\pm$ 0.02 (b)	4.51 $\pm$ 0.07 (b)	0.931 $\pm$ 0.016	
	Mesotriene + S-metolachlor	DFOP	0.43 $\pm$ 0.10	0.51 $\pm$ 0.00 (a)	0.01 $\pm$ 5.10 <sup>-4</sup>	1.00 $\pm$ 0.00	1.36 $\pm$ 0.00 (b)	4.53 $\pm$ 0.00 (b)	0.900 $\pm$ 0.000	
	Mesotriene + Nicoufuron + S-metolachlor	DFOP	0.61 $\pm$ 0.16	0.85 $\pm$ 0.01 (b)	0.01 $\pm$ 9.10 <sup>-4</sup>	1.00 $\pm$ 0.00	0.82 $\pm$ 0.01 (a)	2.72 $\pm$ 0.04 (a)	0.928 $\pm$ 0.004	
M3 (†)	Mesotriene	DFOP	0.65 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01 (b)	0.06 $\pm$ 0.06	0.99 $\pm$ 7.10 <sup>-3</sup>	3.97 $\pm$ 0.29 (b)	13.17 $\pm$ 0.96 (b)	0.966 $\pm$ 0.009	
	Mesotriene + Nicoufuron	DFOP	0.64 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.01 (c)	0.11 $\pm$ 0.10	0.68 $\pm$ 0.32	2.27 $\pm$ 0.05 (a)	7.54 $\pm$ 0.15 (a)	0.979 $\pm$ 0.005	
	Mesotriene + S-metolachlor	DFOP	0.58 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 4.10 <sup>-4</sup> (a)	0.11 $\pm$ 4.10 <sup>-4</sup>	0.73 $\pm$ 1.10 <sup>-3</sup>	5.84 $\pm$ 0.02 (c)	19.40 $\pm$ 0.06 (c)	0.931 $\pm$ 0.001	
	Mesotriene + Nicoufuron + S-metolachlor	DFOP	0.38 $\pm$ 4.10 <sup>-3</sup>	0.17 $\pm$ 2.10 <sup>-3</sup> (b)	3.10 <sup>-11</sup> $\pm$ 2.10 <sup>-11</sup>	0.99 $\pm$ 3.10 <sup>-3</sup>	4.14 $\pm$ 0.06 (b)	13.90 $\pm$ 0.26 (b)	0.976 $\pm$ 0.002	
AMBA	Mesotriene	DosaResp	0.45 $\pm$ 0.01 (c)	0.25 $\pm$ 0.04 (a)	3.17 $\pm$ 0.37 (b)	-	-	-	0.880 $\pm$ 0.01	
	Mesotriene + Nicoufuron	DosaResp	0.48 $\pm$ 0.02 (c)	0.15 $\pm$ 0.01 (a)	5.74 $\pm$ 0.28 (c)	-	-	-	0.865 $\pm$ 0.01	
	Mesotriene + S-metolachlor	DosaResp	0.37 $\pm$ 0.01 (b)	0.61 $\pm$ 0.05 (b)	1.92 $\pm$ 0.06 (a)	-	-	-	0.922 $\pm$ 0.02	
	Mesotriene + Nicoufuron + S-metolachlor	DosaResp	0.26 $\pm$ 0.01 (a)	0.53 $\pm$ 0.06 (b)	2.09 $\pm$ 0.17 (ab)	-	-	-	0.912 $\pm$ 0.02	
M2 (‡)	Mesotriene	DosaResp	0.51 $\pm$ 0.10 (a)	57.49 $\pm$ 20.46 (b)	0.13 $\pm$ 0.04 (a)	-	-	-	0.979 $\pm$ 0.02	
	Mesotriene + Nicoufuron	DosaResp	0.33 $\pm$ 0.03 (a)	10.83 $\pm$ 1.02 (a)	0.20 $\pm$ 0.01 (a)	-	-	-	0.997 $\pm$ 2.10 <sup>-3</sup>	
	Mesotriene + S-metolachlor	DosaResp	0.43 $\pm$ 0.10 (a)	3.54 $\pm$ 0.64 (a)	0.31 $\pm$ 0.08 (a)	-	-	-	0.931 $\pm$ 0.02	
	Mesotriene + Nicoufuron + S-metolachlor	DosaResp	0.43 $\pm$ 0.03 (a)	6.97 $\pm$ 0.23 (a)	0.19 $\pm$ 0.01 (a)	-	-	-	0.969 $\pm$ 0.01	
M3 (‡)	Mesotriene	DosaResp	0.65 $\pm$ 0.01 (c)	5.26 $\pm$ 0.46 (a)	0.22 $\pm$ 0.01 (b)	-	-	-	0.985 $\pm$ 4.10 <sup>-3</sup>	
	Mesotriene + Nicoufuron	DosaResp	0.65 $\pm$ 0.01 (c)	14.16 $\pm$ 1.39 (b)	0.14 $\pm$ 3.10 <sup>-3</sup> (a)	-	-	-	0.999 $\pm$ 2.10 <sup>-4</sup>	
	Mesotriene + S-metolachlor	DosaResp	0.38 $\pm$ 0.02 (b)	3.89 $\pm$ 0.40 (a)	0.21 $\pm$ 0.02 (b)	-	-	-	0.871 $\pm$ 0.03	
	Mesotriene + Nicoufuron + S-metolachlor	DosaResp	0.38 $\pm$ 0.01 (a)	11.21 $\pm$ 0.11 (b)	0.14 $\pm$ 0.01 (a)	-	-	-	0.998 $\pm$ 1.10 <sup>-3</sup>	

(†): data for the second kinetic phase of the intermediate metabolites M2 and M3, (i.e. decrease of metabolite concentration)

(‡): data for the first kinetic phase of the intermediate metabolites M2 and M3 (i.e. increase of metabolite concentration)

k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> and p: rate constants

The fitting of mesotriene transformation by the DFOP model was satisfactory ( $r^2 > 0.97$ ) (Table 2). This model corresponds to the sum of two first order terms (see Experimental section, Equation 1). The term with the faster rate dominates the early degradation step whereas the term with the slower rate dominates the later part of the degradation curve. The DFOP model can be applied both on mono and bi-phasic degradation curves (EPA, 2015). Mesotriene kinetics being mono-phasic (Table 2, Equation 1) g values are closed to 1 and the



second terms are negligible. The comparisons of mesotrione kinetic parameters were therefore only performed for  $k_1$ ,  $DT_{50}$  and  $DT_{90}$ . The kinetics of nicosulfuron disappearance were well fitted by the DFOP model ( $r^2 > 0.93$ ), which corresponds here to a bi-phasic decrease, as attested by  $g$  values relatively far from 1 (Table 3).

**Table 3.** Kinetics of nicosulfuron biotransformation and production of its metabolites. The experimental data were fitted with the DFOP and DoseResp functions using CAKE and OriginPro, respectively, as described in the Materials and Methods section. The values of model parameters, coefficient of determination ( $r^2$ ) and Dissipation Time x % ( $DT_x$ ) are reported as the mean  $\pm$  standard error (SE),  $n = 3$ . Significant differences between conditions for the parameters of each compound are indicated by lowercase letters a < b < c < d (Tukey's test,  $P < 0.05$ ).

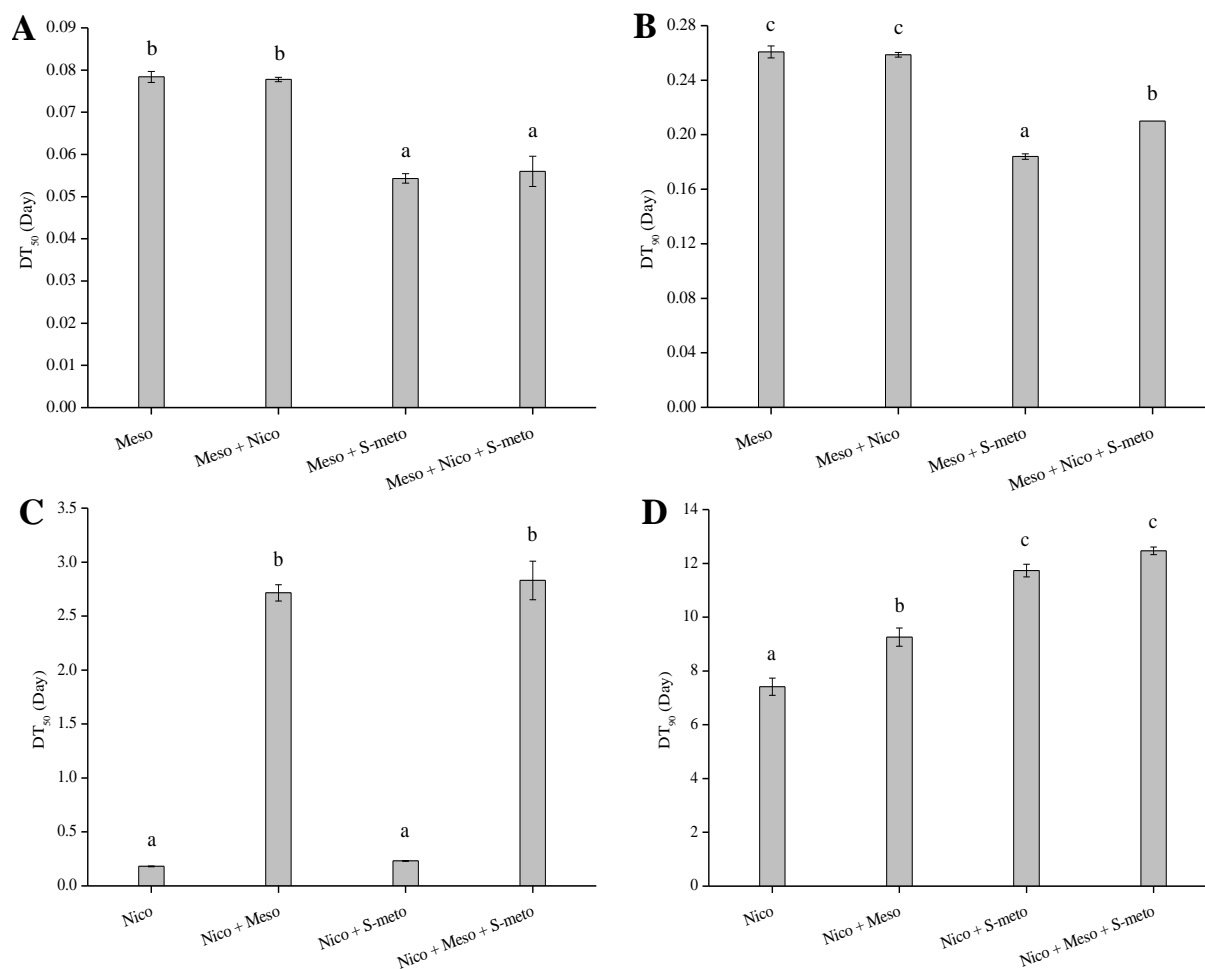
Compound	Condition	Model	Model parameters				$r^2$		
			$C_0$ (mM)	$k_1$ (day $^{-1}$ )	$k_2$ (day $^{-1}$ )	$g$			
Nicosulfuron	Nicosulfuron	DFOP	$1.02 \pm 4 \cdot 10^{-3}$	$5.35 \pm 0.02$ (b)	$0.09 \pm 1 \cdot 10^{-3}$ (a)	$0.80 \pm 0.01$	$0.18 \pm 3 \cdot 10^{-3}$ (a)	$7.41 \pm 0.32$ (a)	$0.937 \pm 0.002$
	Nicosulfuron + Mesotrione	DFOP	$0.91 \pm 0.01$	$0.41 \pm 0.11$ (a)	$0.23 \pm 3 \cdot 10^{-3}$ (c)	$0.30 \pm 0.22$	$2.72 \pm 0.08$ (b)	$9.26 \pm 0.34$ (b)	$0.994 \pm 0.002$
	Nicosulfuron + S-metolachlor	DFOP	$1.05 \pm 2 \cdot 10^{-3}$	$5.02 \pm 0.10$ (b)	$0.09 \pm 2 \cdot 10^{-3}$ (a)	$0.72 \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$0.23 \pm 4 \cdot 10^{-3}$ (a)	$11.73 \pm 0.23$ (c)	$0.965 \pm 0.002$
	Nicosulfuron + Mesotrione + S-metolachlor	DFOP	$0.94 \pm 0.01$	$1.38 \pm 0.41$ (a)	$0.16 \pm 4 \cdot 10^{-3}$ (b)	$0.23 \pm 0.02$	$2.83 \pm 0.18$ (b)	$12.47 \pm 0.15$ (c)	$0.993 \pm 0.003$
ASDM	Nicosulfuron + Mesotrione + S-metolachlor	DoseResp	$0.96 \pm 0.02$ (b)	$0.26 \pm 0.03$ (a)	$3.59 \pm 0.25$ (a)	-	-	-	$0.852 \pm 0.017$
		DoseResp	$0.96 \pm 0.01$ (b)	$0.27 \pm 2 \cdot 10^{-4}$ (a)	$4.22 \pm 0.01$ (a)	-	-	-	$0.966 \pm 0.001$
		DoseResp	$0.96 \pm 0.02$ (b)	$0.37 \pm 8 \cdot 10^{-4}$ (b)	$3.71 \pm 0.12$ (a)	-	-	-	$0.982 \pm 0.003$
		DoseResp	$0.84 \pm 0.03$ (a)	$0.37 \pm 0.01$ (b)	$3.50 \pm 0.12$ (a)	-	-	-	$0.978 \pm 0.002$
		DoseResp	$0.89 \pm 0.01$ (b)	$0.33 \pm 3 \cdot 10^{-3}$ (ab)	$3.31 \pm 0.03$ (a)	-	-	-	$0.966 \pm 0.001$
ADMP	Nicosulfuron + Mesotrione + S-metolachlor	DoseResp	$0.82 \pm 0.01$ (ab)	$0.21 \pm 0.02$ (a)	$4.44 \pm 0.22$ (b)	-	-	-	$0.901 \pm 0.019$
		DoseResp	$0.92 \pm 0.02$ (b)	$0.27 \pm 0.01$ (a)	$4.04 \pm 0.08$ (b)	-	-	-	$0.904 \pm 0.014$
		DoseResp	$0.76 \pm 0.03$ (a)	$0.43 \pm 0.04$ (b)	$3.36 \pm 0.21$ (a)	-	-	-	$0.975 \pm 0.008$
		DoseResp	$0.17 \pm 0.01$ (b)	$0.26 \pm 0.01$ (a)	$4.69 \pm 0.09$ (b)	-	-	-	$0.969 \pm 0.004$
N3	Nicosulfuron + Mesotrione + S-metolachlor	DoseResp	$0.22 \pm 0.02$ (c)	$0.24 \pm 0.04$ (a)	$4.61 \pm 0.54$ (b)	-	-	-	$0.941 \pm 0.009$
		DoseResp	$0.13 \pm 3 \cdot 10^{-3}$ (a)	$0.36 \pm 0.01$ (b)	$3.51 \pm 0.11$ (a)	-	-	-	$0.943 \pm 0.011$
		DoseResp	$0.14 \pm 2 \cdot 10^{-3}$ (a)	$0.34 \pm 3 \cdot 10^{-3}$ (b)	$3.26 \pm 0.03$ (a)	-	-	-	$0.946 \pm 0.003$

$k_1$ ,  $k_2$  and  $p$ : rate constants

### Effects of nicosulfuron and/or S-metolachlor on the biotransformation of mesotrione

The disappearance of mesotrione was faster in presence of S-metolachlor compared to the transformation of mesotrione alone (independently of the presence of nicosulfuron) (Figure

1A), as attested by the differences observed between rate constant  $k_1$  and  $DT_{50}$  (Figure 4A, Table 2, Tukey's test,  $P < 0.05$ ). These effects led to lower mesotrione  $DT_{50}$  and  $DT_{90}$  in the presence of S-metolachlor but the differences tend to be less pronounced with time when nicosulfuron is added to the cocktail, as attested by the  $DT_{90}$  values (Figure 4B, Tukey's test,  $P < 0.05$ ). These results indicate that the biotransformation of mesotrione was accelerated by S-metolachlor.



**Figure 4.** Values of  $DT_{50}$  and  $DT_{90}$  (Dissipation Time of 50 % and 90 %) of (A, B) mesotrione and (C, D) nicosulfuron, alone or in mixtures. Mesotrione (Meso), nicosulfuron (Nico), S-metolachlor (S-meto). The values are means  $\pm$  standard errors ( $n = 3$ ). Significant differences between conditions are indicated by lowercase letters  $a < b < c$  (Tukey's test,  $P < 0.05$ ).

The positive effect of mixing pesticides on their transformation has already been described for the degradation of chlorpyrifos, monocrotophos (organophosphorus) and endosulfan (organochlorine) by an artificial bacterial consortium (Abraham *et al.*, 2014). Although the biodegradation of contaminants may be enhanced by the presence of other compounds which serve as additional carbon sources for degrading microorganisms (Ogunseitan and Olson, 1993), this is probably not the case in the present study, because S-metolachlor was not

metabolized by the strain Mes11. A most suitable explanation could be linked to the modification of the cell membrane permeability by a pesticide which allows the entrance of another one into the cell, as described in the case of chlorothalonil and atrazine (DeLorenzo and Serrano, 2003). S-metolachlor could therefore facilitate the entrance of mesotrione into the cells where its biotransformation can occur more rapidly. S-metolachlor may also induce the expression of the mesotrione-transforming enzymes, NfrA1 and NfrA2 nitroreductases (Carles *et al.*, 2016), as previous studies have shown an activation of the nitroreductase regulatory system by pesticides such as paraquat (Roldán *et al.*, 2008).

Some significant differences between conditions were observed for the kinetic parameters of the formation/disappearance of M2 and M3 (Table 2 and Figure 1C and D, Tukey's test,  $P < 0.05$ ). It is difficult to conclude on these differences between conditions because these compounds are transitory metabolites and their kinetic parameters depend on many unknown phenomena, such as dynamic equilibrium between M2 and M3, flows from mesotrione and to AMBA. However, the identification and quantification of such intermediates are of great concern if they are toxic compounds causing adverse effects in the environment. Once identified, they can therefore be added into the list of compounds included in environmental surveys, allowing a better ERA of pesticide mixtures.

Concomitantly to the mesotrione disappearance, the formation of the end-product AMBA was faster in presence of S-metolachlor than in its absence, as attested by the  $p$  rate constant and  $h_{50}$  values (Table 2 and Figure 1B, Tukey's test,  $P < 0.05$ ). However, unless accelerating the transformation of mesotrione into AMBA, the S-metolachlor led to a lower final AMBA concentration ( $C_{max}$ ), mainly with the ternary mixture (Table 2 and Figure 1B, Tukey's test,  $P < 0.05$ ). These results showed that S-metolachlor can modify the formation kinetics of AMBA, which is more persistent in soil than mesotrione (Barchanska *et al.*, 2016).

#### *Effects of mesotrione and/or S-metolachlor on the biotransformation of nicosulfuron*

The first rate constant  $k_1$  of nicosulfuron in the presence of mesotrione (independently of the presence of S-metolachlor) was 4 to 13-fold lower than those of nicosulfuron alone or associated with S-metolachlor, showing that nicosulfuron dissipation was considerably slowed down by mesotrione during the first phase of dissipation (Table 3 and Figure 3A, Tukey's test,  $P < 0.05$ ). This resulted in lower  $DT_{50}$  values for nicosulfuron without mesotrione (Table 3 and Figure 4C, Tukey's test,  $P < 0.05$ ). On the contrary, the second rate constant  $k_2$  of nicosulfuron in presence of mesotrione (independently of the presence of S-metolachlor) was higher than those of nicosulfuron alone or with S-metolachlor during the

second phase of dissipation (Table 3 and Figure 3A, Tukey's test,  $P < 0.05$ ). The  $DT_{90}$  value of nicosulfuron alone was the lowest one, showing a global inhibitory effect of the two other herbicides on the biotransformation of nicosulfuron (Table 3 and Figure 4D, Tukey's test,  $P < 0.05$ ).

Overall, these results indicate a lower dissipation of nicosulfuron in the presence of mesotrione during the first phase of dissipation. A previous study showed a similar fast dissipation of nicosulfuron by *Pseudomonas fluorescens* SG-1 strain in one day, attributed mainly to sorption processes on bacterial biomass and followed by a biotransformation step (Carles *et al.*, 2017). This is probably also the case with Mes11 strain and it could be hypothesized that mesotrione modified the properties of the bacterial cell wall, leading to a reduction of nicosulfuron adsorption/absorption into the cell, as described in the case of chlorothalonil and atrazine (DeLorenzo and Serrano, 2003). Lower degradation efficiency of mixed pesticides (methyl-parathion, lindane and carbofuran) compared to individual pesticides was also observed in a previous study (Rama Krishna and Philip, 2011). The stimulation of nicosulfuron dissipation by mesotrione during the second phase indicates a positive effect of mesotrione on the nicosulfuron biotransformation, which is supposed predominant during this phase. We should also be aware that mesotrione disappeared very quickly (within 5.5 h). Therefore, the potential effects of this herbicide on the biotransformation of nicosulfuron should probably due to mesotrione metabolites rather than to the parent compound.

Some differences have also been observed for production kinetics of metabolites in the mixtures, as in the case of ASDM formation, which was accelerated in the presence of S-metolachlor (independently of the mesotrione presence), as attested by the  $p$  rate constant (Table 3 and Figure 3B, Tukey's test,  $P < 0.05$ ). The maximal concentration of ASDM and ADMP were also the lowest in the case of the ternary mixture (Table 3 and Figure 3C, Tukey's test,  $P < 0.05$ ). Overall, these results did not show any significant effect of mesotrione and/or S-metolachlor on the balance between the two identified biotransformation pathways of nicosulfuron leading to ADMP/ASDM or N3.

**Table 4.** Toxicity values of chemicals towards *A. fischeri* (Microtox®). Experimental data were compared to predicted toxicity values according to the Concentration Addition (CA) model. The effect of the other components of the mixture on each compound were qualified of synergistic, additive and antagonistic according to MDR (Model Deviation Ratio) values (see Materials and Methods section). The results are reported as the mean ± standard error (SE), n = 3.

Chemicals and mixtures (ratio)	Microtox® IC <sub>50</sub> , 15 min (µM)		MDR	Effect
	Observed (experimental data)	Predicted (CA model)		
Mesotrione	128.5 ± 7.1 <sup>a</sup>	-	-	-
Nicosulfuron	420.3 ± 47.7 <sup>c</sup>	-	-	-
S-metolachlor	628.6 ± 80.3 <sup>b</sup>	-	-	-
AMBA	82.7 ± 18.6 <sup>a</sup>	-	-	-
ADMP	22.4 ± 8.4 <sup>c</sup>	-	-	-
ASDM	> 3900 <sup>c</sup>	-	-	-
Mesotrione + nicosulfuron (1:1)	42.4 ± 4.0	196.8 ± 12.4	4.6	Synergistic
Mesotrione + S-metolachlor (1:1)	42.4 ± 2.3	213.4 ± 13.1	5.0	Synergistic
Nicosulfuron + S-metolachlor (1:1)	110 ± 0.7	503.8 ± 59.8	4.6	Synergistic
Mesotrione + nicosulfuron + S-metolachlor (1:1:1)	51.6 ± 2.1	255.3 ± 17.2	4.9	Synergistic
ADMP + ASDM (1:1)	391.3 ± 25.2 <sup>c</sup>	44.5 ± 1.8	0.1	Antagonistic
AMBA + ADMP (0.31:1)	97.8 ± 2.2 (AMBA)	27.1 ± 9.7	0.3	Antagonistic
	312.8 ± 6.9 (ADMP)		0.1	Antagonistic
AMBA + ASDM (0.31:1)	68.3 ± 0.9 (AMBA)	327.1 ± 1.3	4.8	Synergistic
	218.4 ± 2.8 (ASDM)		1.5	Additive
AMBA + ADMP + ASDM (0.31:1:1)	69.1 ± 1.5 (AMBA)	47.5 ± 2.1	0.7	Additive
	221.2 ± 4.9 (ADMP)		0.2	Antagonistic
	221.2 ± 4.9 (ASDM)		0.2	Antagonistic
S-metolachlor + AMBA + ADMP (1:0.31:1)	147.6 ± 8.5 (S-metolachlor)	46.2 ± 15.6	0.3	Antagonistic
	46.1 ± 2.7 (AMBA)		1.0	Additive
	147.6 ± 8.5 (ADMP)		0.3	Antagonistic
S-metolachlor + AMBA + ASDM (1:0.31:1)	135.6 ± 5.8 (S-metolachlor)	412.8 ± 2.2	3.0	Synergistic
	42.4 ± 1.8 (AMBA)		9.7	Synergistic
	135.6 ± 5.8 (ASDM)		3.0	Synergistic
S-metolachlor + AMBA + ADMP + ASDM (1:0.31:1:1)	213.6 ± 20.3 (S-metolachlor)	65.9 ± 2.9	0.3	Antagonistic
	66.8 ± 6.4 (AMBA)		1.0	Additive
	213.6 ± 20.3 (ADMP)		0.3	Antagonistic
	213.6 ± 20.3 (ASDM)		0.3	Antagonistic

<sup>a</sup> Bonnet *et al.* (2008); <sup>b</sup> Joly *et al.* (2013); <sup>c</sup> Carles *et al.* (2017); IC<sub>50</sub> = Inhibitory Concentration 50%.

The predicted (CA) IC<sub>50,mix</sub> values of mixtures containing ASDM were calculated with an IC<sub>50</sub> value of ASDM = 3900.

#### Toxicity of herbicide and/or metabolite mixtures (Microtox® test)

The experimental data of mixture toxicity were compared with the predicted data of CA model. This model is known to generate larger predicted mixture effects than the other ones such as the Independent Action (IA) model, and is therefore considered as more conservative (Belden *et al.*, 2007; Cedergreen *et al.*, 2008; Cedergreen, 2014) and adapted to multicomponent (more than two molecules) mixtures (Warne and Hawker, 1995; Deneer, 2000). However, the combined variances of toxicity data for individual compounds and mixtures make difficult the detection of small deviations from the reference model (here CA). Biologically significant synergy was therefore previously defined as a more than two fold deviation from CA (Belden *et al.*, 2007; Cedergreen, 2014; Wiczerzak *et al.*, 2016), and evaluated with the ratio of predicted *versus* observed IC<sub>50</sub> values (MDR). The MDR values were chosen as the reference scale because of the simplicity of adjusting values from the

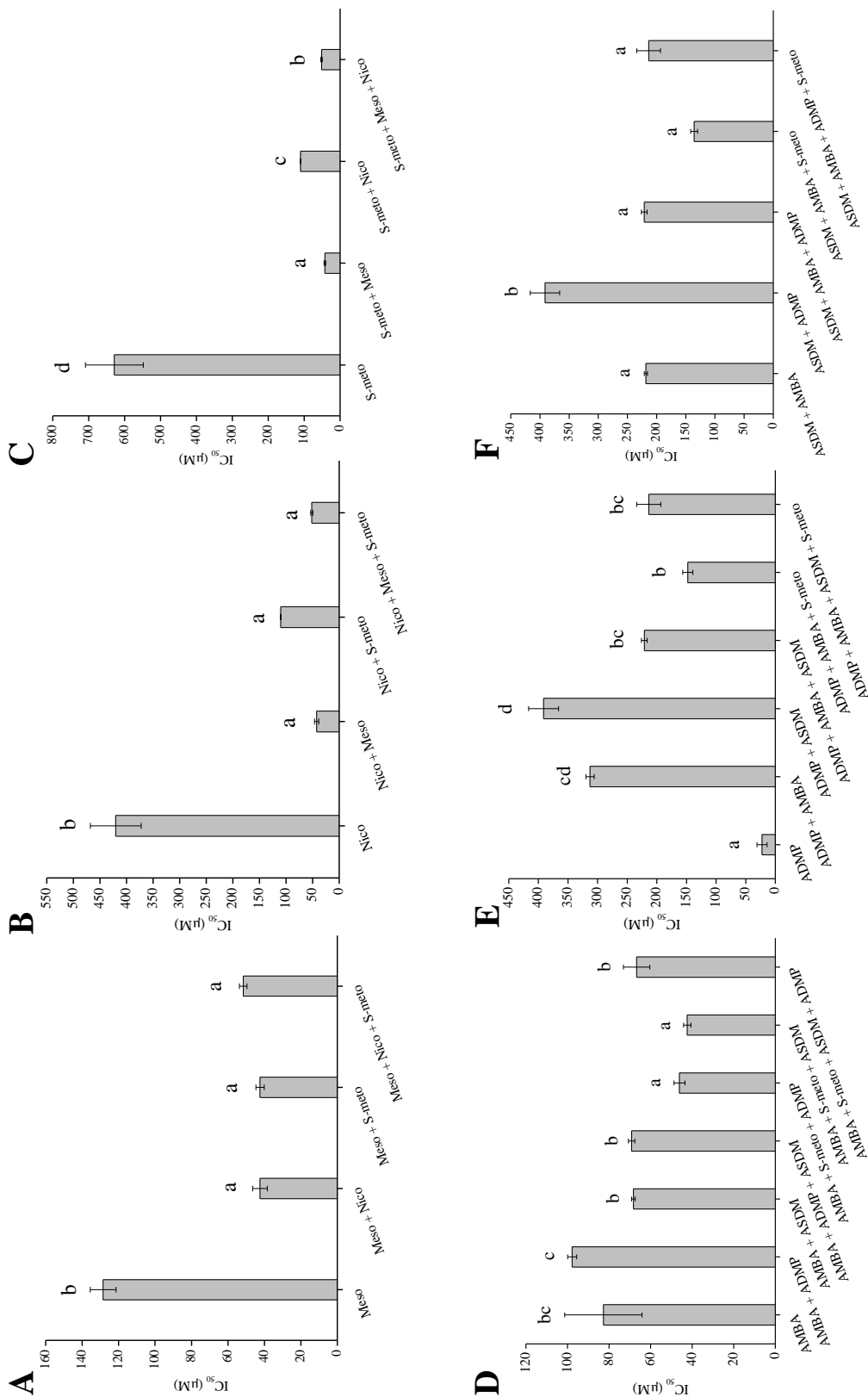
predictive model. Risk assessors can easily divide the level of potential toxicity described by a mixture model by the MDR to adjust empirical data for the mixture of interest (Belden *et al.*, 2007).

#### *Toxicity of the herbicide mixtures (starting conditions)*

The MDR values of all the parent herbicide mixtures tested were higher than 2, revealing synergistic effects of these compounds for the toxicity towards *A. fischeri* (Table 4). These results were reinforced by the fact that the IC<sub>50</sub> values of single parent compounds were about 3-fold (mesotrione, Figure 5A), 4 to 10-fold (nicosulfuron, Figure 5B) and 6 to 15-fold (S-metolachlor, Figure 5C) higher than those of their binary or ternary mixtures (Tukey's test,  $P < 0.05$ ). This was already emphasized by Cedergreen (2014) who showed five groups of pesticides over-represented in the synergistic mixtures (azole fungicides, triazine herbicides and organophosphate, carbamate and pyrethroid insecticides). The synergistic interactions found in the present study pointed out that  $\beta$ -triketone, sulfonyleurea and chloroacetanilide herbicides, which have different mode of action, are possible synergistic compounds at high concentration, both on biotransformation processes and bacterial toxicity. However, additional works are needed to determine the mechanisms behind this synergy. Concerning superior organisms, chemical interactions between pesticides may change the bioavailability, the uptake, the internal transportation, the metabolization, the binding at the target site and the excretion of each compound (Cedergreen, 2014). However, very little is known about the mechanisms involved in the toxicity towards microorganisms.

#### *Toxicity of metabolite and/or S-metolachlor mixtures (final conditions)*

The toxicity of metabolite mixtures was determined with and without S-metolachlor because this herbicide was not degraded by the strain Mes11 and was therefore present at the end of the experiment. Synergistic effects were observed in the case of mixture composed of AMBA + ASDM (independently of the presence of S-metolachlor), as attested by  $MDR > 2$  (Table 4). On the contrary, the effect of the other mixtures was antagonistic or additive, with MDR values  $< 0.5$  or 1, depending of each molar concentration in the mixture causing 50% of *A. fischeri* bioluminescence inhibition (Table 4).



**Figure 5.** Comparative toxicity of the parent compounds and metabolites, alone or in mixtures, toward *A. fischeri*. (A) Mesotrione (Meso), (B) Nicosulfuron (Nico), (C) S-metolachlor (S-meto), (D) AMBA, (E) ADMP and (F) ASDM. The values are means  $\pm$  standard errors of IC<sub>50</sub> values per condition (n  $\geq$  3). Significant differences between conditions are indicated by lowercase letters a < b < c < d, Tukey's test, P < 0.05).

There was no effect of the other compounds on the IC<sub>50</sub> value of AMBA, except for two mixtures (AMBA + S-metolachlor + ADMP or ASDM) being about 2 fold more toxic than the single compound (Figure 5D, Tukey's test, P < 0.05). The IC<sub>50</sub> values of ADMP in all the tested mixtures were about 6.5-fold (ADMP + AMBA + S-metolachlor) to 14-fold (ADMP + ASDM) higher than that of the single compound (Figure 5E, Tukey's test, P < 0.05). On the contrary, the IC<sub>50</sub> value of ASDM (> 3900 µM) indicates an extremely low toxicity towards *A. fischeri* that was considerably increased in all the tested mixtures (up to 100 to 200 µM), and in a lesser extend in the mixture composed of ASDM + ADMP (about 400 µM) (Figure 5F, Tukey's test, P < 0.05).

Up to now, studies related to the toxicity of pesticide metabolites towards *A. fischeri* were only performed with individual compounds (*e.g.* Tixier *et al.*, 2001; Osano *et al.*, 2002; Bonnet *et al.*, 2008). The present work showed synergism for AMBA and ASDM, and antagonism for the majority of the other metabolite mixtures tested, highlighting the importance of mixture toxicity studies.

Environmental significance of this work.

The results of our study indicate that *B. megaterium* Mes11 was able to simultaneously biotransform herbicides belonging to different chemical families (β-triketone and sulfonylurea), which is very poorly documented so far (Lü *et al.*, 2008; Karas *et al.*, 2010; Kulshrestha and Kumari, 2010). Indeed, most of the studies dealing with the biotransformation of different pesticides in a mixture investigated this process, compound by compound, as in the case of white rot fungi (Bending *et al.*, 2002; Fragoeiro and Magan, 2005) or genetically-engineered bacterial strains (Shimazu *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010, 2013; Cao *et al.*, 2013).

Pesticides are among the most described chemicals regarding toxicity and they are frequently included in environmental monitoring programs (Kienzler *et al.*, 2016). However, “we can only find something if we are looking for”, meaning that monitoring programs and case studies on co-occurring pesticides are *de facto* limited to known compounds. Hence, the identification of each transformation product of a pesticide, including transitory metabolites, as carried out in our study, is particularly relevant for ERA.

The present work also allowed the identifications of mixture effects on the biotransformation kinetics of mesotrione and nicosulfuron. Pesticide synergism is mostly described for toxicological end-points (Cedergreen, 2014), while biotransformation processes are not well documented, despite the fact that environmental fate and toxicity of pesticides are



strongly linked. Knowledges on biotransformation of individual pesticides and their unintentional mixtures will help for the development of new environmental fate models allowing prospective ERA of pesticide mixtures. Therefore, we recommend developing the concept of ‘pesticidomics’ in the future, defined as a large-scale study of pesticides (in analogy of the other ‘omics’ approaches), which may help to the construction of a complete dataset on pesticide fate and toxicity in the environment. This implies considering the ‘pesticidome’ (*i.e.* active ingredients, metabolites and adjuvants potentially co-occurring in the environment) and not only the active ingredient, to improve the global risk assessment of pesticides.

New data on the toxicity of mesotrione (and its metabolites), nicosulfuron (and its metabolites) and S-metolachlor, alone or in binary/ternary mixtures towards microorganisms, also give significant input to implement toxicity databases, allowing *in fine* a better ERA of these herbicides. New toxicity data on the studied herbicides and their metabolites can also be used to help identifying synergistic compounds, and thus may be important to consider when the active ingredients are present at concentrations below toxic level in the environment.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche [grant number ANR-13-CESA-0002 TRICETOX] (programme CESA), the Région Auvergne, the French Ministry for Higher Education and Research and the European Regional Development Fund.

### **References**

- Abraham, J., Silambarasan, S., and Logeswari, P. (2014) Simultaneous degradation of organophosphorus and organochlorine pesticides by bacterial consortium. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **45**: 2590–2596.
- Alferness, P. and Wiebe, L. (2002) Determination of mesotrione residues and metabolites in crops, soil, and water by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 3926–3934.
- AZUR-Environmental (1996) Microtox user’s manual AZUR Environmental, Carlsbad, CA, USA.
- Baran, N. and Gourcy, L. (2013) Sorption and mineralization of S-metolachlor and its ionic metabolites in soils and vadose zone solids: Consequences on groundwater quality in an alluvial aquifer (Ain Plain, France). *J. Contam. Hydrol.* **154**: 20–28.
- Barchanska, H., Kluza, A., Krajczewska, K., and Maj, J. (2016) Degradation study of mesotrione and other triketone herbicides on soils and sediments. *J. Soils Sediments* **16**: 125–133.

- Batissou, I., Crouzet, O., Besse-Hoggan, P., Sancelme, M., Mangot, J.-F., Mallet, C., and Bohatier, J. (2009) Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp. from soil. *Environ. Pollut.* **157**: 1195–1201.
- Belden, J.B., Gilliom, R.J., and Lydy, M.J. (2007) How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integr. Environ. Assess. Manag.* **3**: 364–372.
- Bending, G.D., Friloux, M., and Walker, A. (2002) Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiol. Lett.* **212**: 59–63.
- Berenbaum, M.C. (1985) The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J. Theor. Biol.* **114**: 413–431.
- Bonnet, J.L., Bonnemoy, F., Dusser, M., and 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.
- Cao, X., Yang, C., Liu, R., Li, Q., Zhang, W., Liu, J., Song, C., Qiao, C., and Mulchandani, A. (2013) Simultaneous degradation of organophosphate and organochlorine pesticides by *Sphingobium japonicum* UT26 with surface-displayed organophosphorus hydrolase. *Biodegradation* **24**: 295–303.
- Carles, L., Besse-Hoggan, P., Joly, M., Vigouroux, A., Morera, S., and Batissou, I. (2016) Functional and structural characterization of two *Bacillus megaterium* nitroreductases biotransforming the herbicide mesotrione. *Biochem. J.* **473**: 1443–1453.
- Carles, L., Joly, M., Bonnemoy, F., Lereboure, M., Batissou, I., and Besse-Hoggan, P. (2017) Identification of sulfonylurea biodegradation pathways enabled by a novel nicosulfuron-transforming strain *Pseudomonas fluorescens* SG-1: toxicity assessment and effect of formulation. *J. Hazard. Mater.* **324**: 184–193.
- Cedergreen, N. (2014) Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *Plos One* **9**: e96580.
- Cedergreen, N., Christensen, A.M., Kamper, A., Kudsk, P., Mathiassen, S.K., Streibig, J.C., and Sørensen, H. (2008) A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environ. Toxicol. Chem.* **27**: 1621–1632.
- DeLorenzo, M.E. and Serrano, L. (2003) Individual and mixture toxicity of three pesticides; atrazine, chlorpyrifos, and chlorothalonil to the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *J. Environ. Sci. Health Part B* **38**: 529–538.
- Deneer, J.W. (2000) Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. *Pest Manag. Sci.* **56**: 516–520.
- Durand, S., Amato, P., Sancelme, M., Delort, A.-M., Combourieu, B., and Besse-Hoggan, P. (2006) First isolation and characterization of a bacterial strain that biotransforms the herbicide mesotrione. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**: 222–228.
- Durand, S., Sancelme, M., Besse-Hoggan, P., and Combourieu, B. (2010) Biodegradation pathway of mesotrione: Complementarities of NMR, LC–NMR and LC–MS for qualitative and quantitative metabolic profiling. *Chemosphere* **81**: 372–380.
- EPA (2015) Standard operating procedure for using the NAFTA guidance to calculate representative half-life values and characterizing pesticide degradation. <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/standard-operating-procedure-using-nafta-guidance>. US EPA.
- Fragoieiro, S. and Magan, N. (2005) Enzymatic activity, osmotic stress and degradation of pesticide mixtures in soil extract liquid broth inoculated with *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *Environ. Microbiol.* **7**: 348–355.

- Gotz, T. and Boger, P. (2004) The very-long-chain fatty acid synthase is inhibited by chloroacetamides. *Z. Naturforschung C* **59**: 549–553.
- Graymore, M., Stagnitti, F., and Allinson, G. (2001) Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ. Int.* **26**: 483–495.
- Jiang, J., Zhang, R., Li, R., Gu, J.-D., and Li, S. (2007) Simultaneous biodegradation of methyl parathion and carbofuran by a genetically engineered microorganism constructed by mini-Tn5 transposon. *Biodegradation* **18**: 403–412.
- Joly, P., Bonnemoy, F., Charvy, J.-C., Bohatier, J., and Mallet, C. (2013) Toxicity assessment of the maize herbicides S-metolachlor, benoxacor, mesotrione and nicosulfuron, and their corresponding commercial formulations, alone and in mixtures, using the Microtox® test. *Chemosphere* **93**(10): 2444–2450.
- Karas, P.A., Perruchon, C., Exarhou, K., Ehaliotis, C., and Karpouzias, D.G. (2010) Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi. *Biodegradation* **22**: 215–228.
- Kengara, F.O., Schramm, K.-W., Doerfler, U., Munch, J.C., Henkelmann, B., Welzl, G., Bernhoeft, S., Hense, B., and Schroll, R. (2010) Degradation capacity of a 1,2,4-trichlorobenzene mineralizing microbial community for traces of organochlorine pesticides. *Sci. Total Environ.* **408**: 3359–3366.
- Kienzler, A., Berggren, E., Bessems, J., Bopp, S., van der Linden, S., and Worth, A. (2014) Assessment of mixtures-Review of regulatory requirements and guidance. *JRC Rep. ISSN*.
- Kienzler, A., Bopp, S., van der Linden, S., Berggren, E., and Worth, A. (2016) Regulatory assessment of chemical mixtures: Requirements, current approaches and future perspectives. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **80**: 321–334.
- Kim, J., Liu, K.-H., Kang, S.-H., Koo, S.-J., and Kim, J.-H. (2003) Degradation of the sulfonylurea herbicide LGC-42153 in flooded soil. *Pest Manag. Sci.* **59**: 1037–1042.
- Kolpin, D.K., Schnoebelen, D.J., and Thurman, E.M. (2004) Degradates provide insight to spatial and temporal trends of herbicides in ground water. *Ground Water* **42**: 601–608.
- Kulshrestha, G. and Kumari, A. (2010) Simultaneous degradation of mixed insecticides by mixed fungal culture isolated from sewage sludge. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 11852–11856.
- Liu, J., Chen, S., Ding, J., Xiao, Y., Han, H., and Zhong, G. (2015) Sugarcane bagasse as support for immobilization of *Bacillus pumilus* HZ-2 and its use in bioremediation of mesotrione-contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**: 10839–10851.
- Lu, X.H., Kang, Z.H., Tao, B., Wang, Y.N., Dong, J.G., and Zhang, J.L. (2012) Degradation of nicosulfuron by *Bacillus subtilis* YB1 and *Aspergillus niger* YF1. *Appl. Biochem. Microbiol.* **48**: 460–466.
- Lü, Z.-M., Li, Z.-M., Sang, L.-Y., and Min, H. (2008) Characterization of a strain capable of degrading a herbicide mixture of quinclorac and bensulfuronmethyl. *Pedosphere* **18**: 554–563.
- Luo, W., Zhao, Y., Ding, H., Lin, X., and Zheng, H. (2008) Co-metabolic degradation of bensulfuron-methyl in laboratory conditions. *J. Hazard. Mater.* **158**: 208–214.
- Ma, J.-P., Wang, Z., Lu, P., Wang, H., Waseem Ali, S., Li, S.-P., and Huang, X. (2009) Biodegradation of the sulfonylurea herbicide chlorimuron-ethyl by the strain *Pseudomonas* sp. LW3. *FEMS Microbiol. Lett.* **296**: 203–209.
- Martins, P.F., Martinez, C.O., Carvalho, G. de, Carneiro, P.I.B., Azevedo, R.A., Pileggi, S.A.V., Melo, I.S. de, and Pileggi, M. (2007) Selection of microorganisms degrading S-Metolachlor herbicide. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **50**: 153–159.

- Mitchell, G., Bartlett, D.W., Fraser, T.E., Hawkes, T.R., Holt, D.C., Townson, J.K., and Wichert, R.A. (2001) Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Manag. Sci.* **57**: 120–128.
- Ogunseitan, O.A. and Olson, B.H. (1993) Effect of 2-hydroxybenzoate on the rate of naphthalene mineralization in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 799–807.
- Ortiz-Hernandez, M.L. (2014) Removal of methyl parathion and coumaphos pesticides by a bacterial consortium immobilized in *Luffa cylindrica*. *Rev Int Contam Ambient* **30**: 51–63.
- Osano, O., Admiraal, W., Klamer, H.J.C., Pastor, D., and Bleeker, E.A.J. (2002) Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environ. Pollut.* **119**: 195–202.
- Pileggi, M., Veiga Pileggi, S.A., Olchanheski, L.R., Garbugio da Silva, P.A., Gonzalez, A.M.M., Koskinen, W.C., Barber, B., and Sadowsky, M.J. (2012) Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil. *Chemosphere* **86**: 1127–1132.
- Pino, N. and Peñuela, G. (2011) Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **65**: 827–831.
- Rama Krishna, K. and Philip, L. (2011) Bioremediation of single and mixture of pesticide-contaminated soils by mixed pesticide-enriched cultures. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **164**: 1257–1277.
- Roldán, M.D., Pérez-Reinado, E., Castillo, F., and Moreno-Vivián, C. (2008) Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 474–500.
- Romdhane, S., Devers-Lamrani, M., Martin-Laurent, F., Calvayrac, C., Rocaboy-Faquet, E., Riboul, D., Cooper, J.-F., and Barthelmebs, L. (2015) Isolation and characterization of *Bradyrhizobium* sp. SR1 degrading two  $\beta$ -triketone herbicides. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**: 4138–4148.
- Sarmah, A.K. and Sabadie, J. (2002) Hydrolysis of sulfonylurea herbicides in soils and aqueous solutions: a review. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 6253–6265.
- Schloss, J.V. (1990) Acetolactate synthase, mechanism of action and its herbicide binding site. *Pestic. Sci.* **29**: 283–292.
- Shimazu, M., Mulchandani, A., and Chen, W. (2001) Simultaneous degradation of organophosphorus pesticides and p-nitrophenol by a genetically engineered *Moraxella* sp. with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnol. Bioeng.* **76**: 318–324.
- Song, J., Gu, J., Zhai, Y., Wu, W., Wang, H., Ruan, Z., Shi, Y., and Yan, Y. (2013) Biodegradation of nicosulfuron by a *Talaromyces flavus* LZM1. *Bioresour. Technol.* **140**: 243–248.
- Tixier, C., Sancelme, M., Sancelme, M., Bonnemoy, F., Cuer, A., and Veschambre, H. (2001) Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: Synthesis, ecotoxicity, and biotransformation. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 1381–1389.
- Wang, L., Zhang, X., and Li, Y. (2016) Degradation of nicosulfuron by a novel isolated bacterial strain *Klebsiella* sp. Y1: condition optimization, kinetics and degradation pathway. *Water Sci. Technol.* **73**: 2896–2903.
- Warne, M.S.J. and Hawker, D.W. (1995) The number of components in a mixture determines whether synergistic and antagonistic or additive toxicity predominate: The funnel hypothesis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **31**: 23–28.

- Wieczerek, M., Kudlak, B., Yotova, G., Nedyalkova, M., Tsakovski, S., Simeonov, V., and Namieśnik, J. (2016) Modeling of pharmaceuticals mixtures toxicity with deviation ratio and best-fit functions models. *Sci. Total Environ.* **571**: 259–268.
- Xu, J., Li, X., Xu, Y., Qiu, L., and Pan, C. (2009) Biodegradation of pyrazosulfuron-ethyl by three strains of bacteria isolated from contaminated soils. *Chemosphere* **74**: 682–687.
- Yang, C., Liu, R., Yuan, Y., Liu, J., Cao, X., Qiao, C., and Song, C. (2013) Construction of a green fluorescent protein (GFP)-marked multifunctional pesticide-degrading bacterium for simultaneous degradation of organophosphates and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane. *J. Agric. Food Chem.* **61**: 1328–1334.
- Yang, C., Song, C., Mulchandani, A., and Qiao, C. (2010) Genetic engineering of *Stenotrophomonas* strain YC-1 to possess a broader substrate range for organophosphates. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 6762–6766.
- Yang, Y., Tao, B., Zhang, W., and Zhang, J. (2008) Isolation and screening of microorganisms capable of degrading nicosulfuron in water. *Front. Agric. China* **2**: 224–228.
- Zhang, H., Mu, W., Hou, Z., Wu, X., Zhao, W., Zhang, X., Pan, H., and Zhang, S. (2012) Biodegradation of nicosulfuron by the bacterium *Serratia marcescens* N80. *J. Environ. Sci. Health Part B* **47**: 153–160.
- Zhao, W., Wang, C., Xu, L., Zhao, C., Liang, H., and Qiu, L. (2015a) Biodegradation of nicosulfuron by a novel *Alcaligenes faecalis* strain ZWS11. *J. Environ. Sci.* **35**: 151–162.
- Zhao, W., Xu, L., Li, D., Li, X., Wang, C., Zheng, M., Pan, C., and Qiu, L. (2015b) Biodegradation of thifensulfuron-methyl by *Ochrobactrum* sp. in liquid medium and soil. *Biotechnol. Lett.* **37**: 1385–1392.

Principales conclusions de l'étude :

La souche *B. megaterium* Mes11 est capable de transformer séparément ou simultanément la mésotrione et le nicosulfuron, en présence ou non de *S*-métolachlore.

Les métabolites finaux sont similaires quelles que soient les conditions de dégradation du pesticide (seul ou en mélange), à savoir l'AMBA pour la mésotrione, et l'ADMP, l'ASDM et le N3 pour le nicosulfuron.

La cinétique de biotransformation de la mésotrione est accélérée en présence de *S*-métolachlore (associé ou non au nicosulfuron).

La cinétique de biotransformation du nicosulfuron est ralentie en présence de mésotrione (associée ou non au *S*-métolachlore).

Les mélanges binaires et ternaire des trois herbicides ont des effets synergiques pour la toxicité vis-à-vis de *A. fischeri* (test Microtox®).

La plupart des mélanges de métabolites testés présente soit des effets synergiques, soit des effets antagonistes (test Microtox®).

L'ensemble de ces résultats souligne l'importance de prendre en compte la globalité des molécules associées aux pesticides (substances actives, métabolites, etc.) et leurs interactions potentielles pour évaluer avec précision le devenir et la toxicité de chaque composé dans l'environnement.

Devant la multiplicité des molécules utilisées, des métabolites plus ou moins toxiques produits, des interactions possibles entre les molécules, il apparaît cependant très difficile (et peu réaliste) d'étudier le devenir et l'impact de toutes les molécules/mélanges de molécules épandus en agriculture afin de connaître les risques de l'utilisation de ces pesticides et ainsi interdire les molécules les plus dangereuses pour la santé environnementale et humaine.

L'utilisation des pesticides étant inévitable à l'heure actuelle, une alternative serait donc, au lieu de se retrouver face à des eaux ou des sols pollués et de développer des approches « curatives » de bioremédiation pour décontaminer les écosystèmes, d'envisager de mettre en place des approches « préventives » permettant de limiter la pollution de l'environnement. Afin de limiter les risques de transfert des pesticides (molécules mères et métabolites) dans l'environnement, une solution serait que chaque molécule épandue sur le sol puisse être totalement biodégradée immédiatement après qu'elle ait exercé son rôle pesticide. Ceci

nécessite donc d'avoir à disposition, une (ou des) souche(s) capable(s) de minéraliser le pesticide utilisé.

Les travaux menés sur la mésotrione, le nicosulfuron et le *S*-métolachlore n'ont pas permis d'isoler de souches capables de minéraliser ces molécules. Afin de développer une approche préventive de bioremédiation, j'ai donc été amené à choisir un nouveau couple pesticide – bactérie dégradante comme modèle d'étude. Après une recherche bibliographique, mon choix s'est porté sur la souche *Cupriavidus necator* JMP134, capable de minéraliser l'herbicide 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) (Don and Pemberton, 1981) pour les raisons suivantes :

- le 2,4-D est une molécule qui, à l'heure actuelle, est largement retrouvée dans les écosystèmes aquatiques (SOeS, 2015b; ADES, 2016) et semble donc être un bon candidat pour faire la preuve de concept de l'approche de bioprophyllaxie ;
- les voies de sa biodégradation sont parfaitement décrites, et les gènes de dégradation bien identifiés. Ceci permettait donc d'avoir un maximum d'outils à notre disposition pour étudier le devenir de la molécule et ses effets dans un système « microcosme » relativement complexe ;
- de plus, cette souche était facilement accessible puisque disponible dans la collection de souches DSMZ.

C'est dans ce cadre qu'a été mise au point l'étude en microcosmes ayant pour but d'établir une preuve de concept de la méthode de bioprophyllaxie. Cette étude a été réalisée en toute fin de thèse, et l'ensemble des résultats n'a pas encore été analysé à ce jour. Je ne vous présenterai donc ici que les résultats préliminaires qui seront complétés dans les mois à venir.

# Chapitre 4. La bioprophylaxie : une approche innovante pour réduire la contamination de l'environnement par les pesticides d'origine agricole – preuve de concept

## 1. Introduction

La bioaugmentation est l'une des techniques de bioremédiation les plus étudiées pour la dépollution de nombreux environnements tels que les sols (Lebeau, 2011), les sédiments aquatiques (Perelo, 2010) et les eaux usées (Herrero and Stuckey, 2015). Elle consiste à ajouter au niveau d'une matrice (ex. un sol) contaminée une souche ou un consortium microbien spécifique afin de favoriser la biodégradation des contaminants (El Fantroussi and Agathos, 2005). Cependant, de nombreux facteurs influencent la réussite de cette technique, tels que les caractéristiques des microorganismes utilisés, les facteurs environnementaux et la biodisponibilité des polluants (Lebeau, 2011; Vandermaesen *et al.*, 2016).

Dans le cas de pollution par des pesticides d'origine agricole, il est nécessaire d'agir le plus rapidement possible dès que le pesticide a atteint sa cible moléculaire afin d'éviter la formation de résidus de pesticide liés aux particules de sol (plus récalcitrants à la biodégradation) et avant que le pesticide ne migre vers les eaux de surface ou souterraines. Un moyen d'y parvenir est d'épandre le pesticide simultanément avec le ou les microorganismes capable(s) de le dégrader. Malgré le caractère innovant de cette technique (qualifiée de « bioprophylaxie »), peu d'études s'y sont intéressées jusqu'à présent (Önneby *et al.*, 2009, 2013a; b), et aucune dans le contexte agricole.

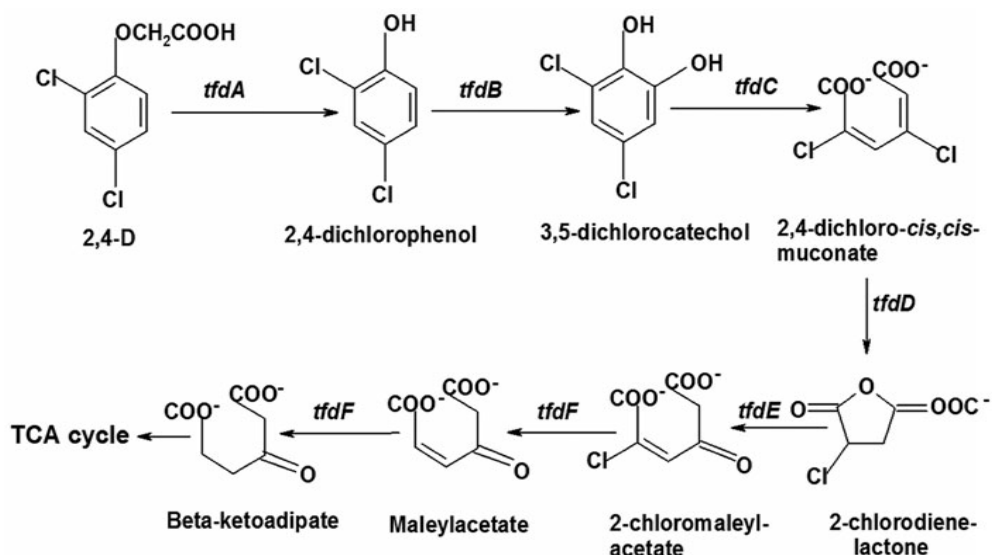
Le 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique), molécule choisie comme modèle de notre étude, est un herbicide de la famille des acides phénoxy décrit initialement en 1944 (Mitchell and Hamner, 1944) et qui est encore actuellement l'un des herbicides les plus utilisés dans le monde (Peterson *et al.*, 2016). Cet herbicide est un analogue de l'acide indolacétique, actif sur les dicotylédones. Son usage est autorisé dans l'Union Européenne et de nombreux autres pays du monde sur les céréales et les gazons, à une dose agronomique de 750 g s.a. ha<sup>-1</sup> (EFSA, 2014). Le 2,4-D est relativement soluble dans l'eau (547 mg L<sup>-1</sup>) et assez peu volatile (constante de Henry de 4.0 10<sup>-6</sup> Pa m<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>) (EFSA, 2014). Les temps de demi-vie de cet herbicide dans le sol sont relativement courts (entre 1,5 et 38 jours) et varient en fonction du



type de sol et de son humidité (EFSA, 2014; Peterson *et al.*, 2016). Les valeurs de  $K_d$  du 2,4-D (1,81 à 4,28 L kg<sup>-1</sup>) varient en fonction notamment du contenu en carbone organique du sol, indiquant une adsorption modérée de cet herbicide dans le sol (Farenhorst *et al.*, 2008). Le 2,4-D a un potentiel modéré de contamination des eaux souterraines (valeurs de GUS entre 2 et 2,7) (Pfeiffer, 2010), confirmé par sa fréquence de détection dans les eaux souterraines (0,9 %) (ADES, 2016). En revanche, la fréquence de détection de cet herbicide dans les eaux de surface est élevée (35 % en 2013) (SOeS, 2015b).

La biodégradation étant le processus principalement impliqué dans la dégradation du 2,4-D (Peterson *et al.*, 2016), de nombreuses études ont été réalisées afin d'identifier ses voies de biodégradation chez les microorganismes et les gènes impliqués (You and Ghosal, 1995; Leveau *et al.*, 1999; Laemmli *et al.*, 2000). La majorité des travaux a porté sur l'étude d'une souche modèle *Cupriavidus necator* JMP134 (anciennement *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* et *Waustersia eutropha*) capable d'utiliser le 2,4-D comme source de carbone et de le minéraliser (Don and Pemberton, 1981). Cette souche possède le plasmide pJP4 porteur du cluster de gènes de dégradation du 2,4-D (*tfd*), codant les enzymes TfdA (2,4-D/ $\alpha$ -cétoglutarate dioxygénase), TfdB (chlorophénol hydroxylase), TfdC (chlorocatéchol dioxygénase), TfdD (chloromuconate cycloisomérase), TfdE (diènelactone hydrolase) et TfdF (maléylacétate réductase) (Plumeier *et al.*, 2002; Trefault *et al.*, 2004) (Figure 36).

L'objectif de l'étude était de faire la preuve de concept de la bioprophyllaxie. Cette étude a été réalisée en microcosmes afin de démontrer que cette technique permettait d'accélérer la minéralisation de l'herbicide tout en conservant l'efficacité de l'herbicide. Afin de se rapprocher des pratiques agricoles, l'expérience a été menée en utilisant le 2,4-D formulé (DAM<sup>®</sup>, Agriphar) à la dose agronomique recommandée.



**Figure 36.** Voie de dégradation du 2,4-D par la souche *C. necator* JMP134. TCA : acide tricarboxylique. Les gènes de dégradation (*tfd*) sont indiqués à chaque étape de la dégradation (Kumar *et al.*, 2014).

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Herbicide et sol

Le 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) a été acheté chez Sigma Aldrich (France) et le 2,4-D formulé (DAM<sup>®</sup>, 2,4-D 391 g L<sup>-1</sup>) a gracieusement été fourni par la société Arysta LifeScience (France). Le sol standard OCDE 5M a été acheté chez LUFA Speyer (Allemagne). Les caractéristiques physico-chimiques du sol 5M sont indiquées dans le Tableau 11.

**Tableau 11.** Propriétés physico-chimiques du sol standard OCDE 5M (LUFA Speyer, Allemagne).

Capacité d'échange cationique (meq / 100 g)	Carbone organique (% C)	Azote (% N)	pH (0.01 M CaCl <sub>2</sub> )	Capacité maximale de rétention en eau (g / 100 g)
17,7 ± 3,7	1,02 ± 0,08	0,13 ± 0,01	7,3 ± 0,1	40,1 ± 2,4

Valeurs moyennes de différentes analyses ± écart-type. Toutes les valeurs sont indiquées pour une masse de sol sec.

### 2.2. Souche bactérienne

La souche *Cupriavidus necator* JMP134 provient de la collection DSMZ (collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires, DSM N° 4058). Une mutation

conférant une résistance chromosomique à la rifampicine (Rif<sup>r</sup>) a été induite chez cette souche afin de la dénombrer sur milieu sélectif. Pour cela, la souche JMP134 a été cultivée en milieu LB (5 mL) pendant 18 h à 28 °C. Après centrifugation, le culot a été lavé avec une solution de NaCl 0,8 %, et étalé sur milieu LB gélosé additionné de 150 µg mL<sup>-1</sup> de rifampicine. Après 48 h d'incubation à 28 °C, un mutant spontané Rif<sup>r</sup> a été obtenu et testé pour sa capacité à minéraliser le 2,4-D de la formulation DAM<sup>®</sup>. L'absence de microorganismes résistants à la rifampicine dans le sol 5M a également été vérifiée avant et au cours de l'étude.

### 2.3. Préparation de l'inoculum

La souche *C. necator* JMP134 Rif<sup>r</sup> a été cultivée pendant 18 h à 28 °C dans 25 mL de milieu LB contenant 50 µg mL<sup>-1</sup> de rifampicine et 50 mg mL<sup>-1</sup> de 2,4-D (DAM<sup>®</sup>) sous agitation (150 rpm) dans un Erlenmeyer de 50 mL. La correspondance entre la densité optique (DO à λ = 600 nm) et le dénombrement sur milieu gélosé en unité formant colonie (ufc mL<sup>-1</sup>) au cours de la croissance du mutant a permis d'établir la relation suivante : une unité de DO<sub>λ=600nm</sub> = 6 10<sup>8</sup> ufc mL<sup>-1</sup>.

Pour l'étude de bioprophylaxie, la souche mutante a été cultivée comme décrit ci-dessus, le culot lavé deux fois à l'aide de NaCl 0,8 % et resuspendu dans de l'eau de Volvic<sup>®</sup> stérile et ajusté à la concentration en cellules désirée. Un dénombrement a été réalisé pour vérifier que la concentration de la suspension bactérienne épanchée sur les microcosmes corresponde à celle attendue (cf. ci-dessous).

Le dénombrement a été réalisé par étalement de dilutions en séries sur milieu LB gélosé additionné de 50 µg mL<sup>-1</sup> de rifampicine et 50 µg mL<sup>-1</sup> de cycloheximide (afin d'éviter le développement de champignons sur la gélose) et comptage des colonies après 2 j d'incubation à 28 °C.

### 2.4. Mise en place des microcosmes

Les microcosmes ont été préparés par ajout de 100 g poids sec de sol 5M dans chaque boîte en polystyrène cristal (longueur 90 mm, largeur 60 mm et hauteur 50 mm), préalablement testée pour leur absence d'interaction avec le 2,4-D. L'humidité du sol a ensuite été ajustée à 20 % (soit 50 % de la capacité maximale de rétention en eau) avant de planter 4 graines de blé (plante non-sensible au 2,4-D, variété Récital, fournie gracieusement

par l'Institut National de la Recherche Agronomique de Crouël, France) par microcosme. Après germination du blé (deux jours plus tard), 24 graines de moutarde blanche (plante sensible au 2,4-D, *Sinapis alba*, Caillard, France) ont été plantées dans chaque microcosme. Les microcosmes ont été placés aléatoirement dans une enceinte de 30 cm de hauteur (Figure 37) recouverte de film plastique poreux permettant les échanges gazeux mais limitant la déshydratation du sol et incubés pendant deux semaines dans une pièce à  $20 \pm 2$  °C avec un cycle jour/nuit (14 / 10) assuré par une lumière artificielle (Osram-L-36W/964, 750 lux).



Figure 37. Photographie de l'ensemble des microcosmes au début de l'expérience.

Les solutions des différents traitements ont été épandues à l'aide d'un aérographe TG-470 (Fraulein 3°8 ; diamètre de buse = 0.3 mm) à la surface de chaque microcosme (5400 mm<sup>2</sup>). Cinq jours après avoir semé le blé, quatre traitements différents ont été réalisés, correspondant à l'épandage de 2 mL d'eau de Volvic® (traitement **Contrôle**), additionnés de l'herbicide à la dose agronomique recommandée (2,4-D 4,23 µg g<sup>-1</sup> sol poids sec, soit 1,08 µL de DAM® par microcosme) (traitement **Herbicide**), additionnés de la souche *C. necator* JMP134 Rif<sup>r</sup> (10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> sol poids sec) (traitement **Bactérie**) ou additionnés de l'herbicide (2,4-D 4,23 µg g<sup>-1</sup> sol poids sec) et de la bactérie (10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> sol poids sec) (traitement **Bioprophylaxie**).

L'humidité du sol a été maintenue à 50 % de la capacité maximale de rétention en eau avec de l'eau de Volvic® tout au long de l'expérience.

Quatre réplicats par traitement ont été sacrifiés aléatoirement (n=4) à chaque date (t = 0 (immédiatement après épandage), 2, 4, 7, 9 et 15 jours). Un dénombrement des plantes viables (observation visuelle de l'effet herbicide) et des photographies des microcosmes ont été réalisés à chaque date de prélèvement. La partie aérienne des plantes et les racines ont été prélevées séparément. Le sol a ensuite été homogénéisé et différents prélèvements ont été effectués pour réaliser les analyses décrites ci-dessous.

## 2.5. Dénombrement de la souche *C. necator* JMP134 Rif<sup>r</sup> dans le sol

Un gramme de sol a été mis en suspension dans 1 mL d'une solution de NaCl 0,8 % stérile. Après homogénéisation (vortex), des dilutions en séries ont été étalées sur milieu LB gélosé (cf. ci-dessus) pour le dénombrement de la souche *C. necator* JMP134 Rif<sup>r</sup> (exprimé en ufc g<sup>-1</sup> sol poids sec).

## 2.6. Quantification du 2,4-D dans le sol

### 2.6.1. Extraction

Cinq grammes de sol ont été mis à extraire dans des tubes à centrifuger avec 20 mL d'un mélange méthanol/eau 4/1 V/V sur un agitateur orbital à 50 rpm et à température ambiante pendant 24 h. Après centrifugation à 10000 g pendant 20 minutes, le surnageant a été filtré sur un filtre seringue en PVDF 0,45 µm (après vérification de la non-adsorption du 2,4-D sur le filtre) puis concentré à sec dans un Speedvac. Le résidu solide a été repris dans 1 mL de méthanol, vortexé et injecté en HPLC.

### 2.6.2. Analyses HPLC

Les analyses HPLC ont été réalisées sur un appareil Agilent 1100 équipé d'un détecteur à barettes de diodes, pilotée par le logiciel Chemstation. Les analyses ont été effectuées en mode gradient (linéaire) sur une colonne C-18 Zorbax Eclipse Plus (Agilent), (75 mm × 4,6 mm, 3,5 µm) thermostatée à 22°C. L'éluant était composé d'un mélange d'eau acidifiée A = H<sub>2</sub>O + 0,01 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 2,6) et d'acétonitrile (B), débit de 1 mL min<sup>-1</sup>, volume d'injection de 30 µL ; Gradient : 0-1 min 20% B ; 1-7 min 20-70% B, 7-8 min 70-100% B ; 8-9 min 100-20%B ; 9-10.5 min 20% B. λ = 222 et 285 nm.

## 2.7. Modélisation des cinétiques de dégradation du 2,4-D

Les cinétiques de dégradation du 2,4-D ont été modélisées avec la fonction DoseResp du logiciel OriginPro 8 (Origin Lab Corporation, USA) décrite par l'équation suivante :

$$C_t = \frac{C_0 - C_f}{1 + 10^{(t-DT_{50})(p)}}$$

où  $t$  est le temps d'incubation,  $C_t$  est la concentration en 2,4-D au temps  $t$ ,  $C_0$  est la concentration initiale en 2,4-D (à  $t = 0$  jour),  $C_f$  est la concentration finale en 2,4-D ( $t = 15$  jours),  $DT_{50}$  est le temps nécessaire pour que la concentration en 2,4-D soit égale à 50 % de la concentration initiale et  $p$  est la constante de dégradation du 2,4-D dans le sol calculée au point d'inflexion.

## 2.8. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel OriginPro 8. Les différences pour chaque paramètre des cinétiques de dissipation, entre conditions, ont été évaluées par ANOVA un facteur. La normalité et l'homogénéité des variances ont été vérifiées avant les analyses ANOVA (tests de Kolmogorov Smirnov et de Levene, respectivement,  $P < 0,05$ ). Les comparaisons deux à deux ont été réalisées par le test *post hoc* de Tukey,  $P < 0,05$ , pour déterminer les différences entre les traitements.

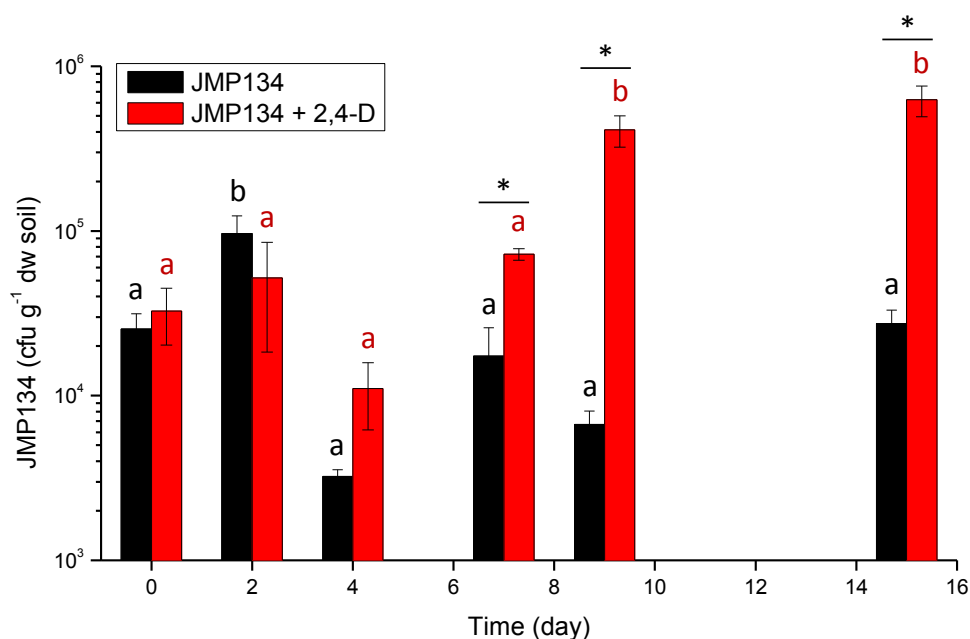
Les analyses statistiques du nombre d'ufc de la souche JMP134 ont été réalisées de la même manière, afin de déterminer les différences significatives entre les temps d'incubation (pour chaque traitement) et entre les traitements (pour chaque temps d'incubation).

## 3. Résultats préliminaires et discussion

### 3.1. Survie de la souche *C. necator* JMP134 Rif dans le sol

D'une manière générale, les résultats du dénombrement ont montré le maintien de la souche JMP134 dans le sol 5M pour le traitement Bactérie autour de  $10^4 - 10^5$  ufc  $g^{-1}$  sol poids sec au cours de l'expérience (15 jours), à l'exception d'une hausse à  $t = 2$  jours (test Tukey,  $P < 0,05$ , Figure 38). Dans le sol ayant reçu le traitement Bioprofylaxie (2,4-D + JMP134), le nombre de bactéries a augmenté à partir de  $t = 9$  jours (test Tukey,  $P < 0,05$ , Figure 38). Cette augmentation du nombre de bactéries JMP134 fait suite à la dégradation du 2,4-D qui s'achève après 4 à 6 jours d'incubation (cf. résultats ci-dessous), reflétant la capacité de la souche à utiliser cet herbicide pour sa croissance. En effet, une différence significative du nombre de bactéries entre le traitement Bactérie et le traitement

Bioprophylaxie apparaît dès 7 jours d'incubation (test Tukey,  $P < 0,05$ , Figure 38). Plusieurs études de bioaugmentation ont mis en évidence l'incapacité de la bactérie introduite à dégrader le polluant en raison de son faible taux de survie ou de sa perte d'activité dans l'environnement (Kumar *et al.*, 2014). La souche JMP134 est décrite comme un prédateur non obligatoire capable de lyser des bactéries dans le sol (Makkar and Casida Jr, 1987) et possède un métabolisme autotrophe et hétérotrophe, lui permettant de s'adapter à des environnements dont la composition en nutriments est variable (Holt *et al.*, 1994). Ceci peut donc expliquer le maintien de la souche JMP134 dans le sol, voire sa prolifération en présence de 2,4-D.

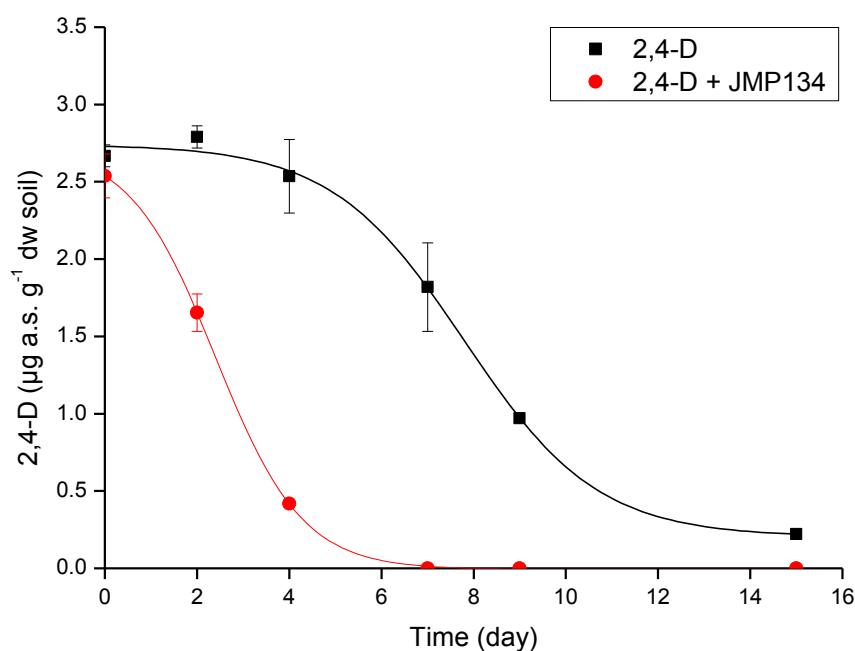


**Figure 38.** Dénombrement de *C. necator* JMP134 Rif<sup>r</sup> dans le sol pour les traitements **Bactérie** (en noir) et **Bioprophylaxie** (en rouge) au cours du temps. Les résultats correspondent à la moyenne  $\pm$  erreur standard ( $n = 4$ ). Les lettres indiquent une différence significative entre les temps d'incubation pour chaque condition ( $a < b$ ) et le signe étoile (\*) indique une différence significative entre les conditions pour chaque temps d'incubation (test de Tukey,  $P < 0,05$ ).

### 3.2. Cinétiques de dégradation du 2,4-D (DAM<sup>®</sup>) dans le sol

La cinétique de dégradation du 2,4-D dans le sol 5M (traitement Herbicide) est caractérisée par une constante de dégradation de  $0,33 \text{ j}^{-1}$  après une phase de latence d'environ 4 jours (Figure 39 et Tableau 12). A la fin de l'expérience ( $t = 15 \text{ j}$ ), le pourcentage résiduel de 2,4-D est de 6 %, tandis qu'en présence de la souche JMP134 (traitement Bioprophylaxie), la totalité du 2,4-D est dégradée en moins de 6 jours sans phase de latence (Figure 39). La présence de la souche JMP134 n'a donc pas modifié la constante de dégradation du 2,4-D ( $0,47 \text{ j}^{-1}$ ) mais a entraîné une forte réduction de son temps de demi-vie (7,37 jours en absence de la souche

contre 2,34 jours en présence de la souche JMP134, test Tukey,  $P < 0,05$ ) en raison de la suppression de la phase de latence en présence de la souche dégradante.



**Figure 39.** Cinétiques de dégradation du 2,4-D (DAM®) dans le sol 5M pour les traitements **Herbicide** et **Bioprophyllaxie**. Les résultats correspondent à la moyenne  $\pm$  erreur standard ( $n = 4$ ).

Certaines études ont montré une toxicité modérée du 2,4-D pour les microorganismes (Polo *et al.*, 2011; Schenone *et al.*, 2015). La réduction d'un facteur 3 de la persistance du 2,4-D dans le sol par le traitement Bioprophyllaxie permet donc de diminuer son impact potentiel pour les microorganismes édaphiques, et aussi de réduire la probabilité de migration de cet herbicide vers les eaux de surface et les eaux souterraines. Ces résultats confirment l'hypothèse initiale de la bioprophyllaxie, qui prévoit une cinétique de dégradation rapide du pesticide ajouté simultanément à la bactérie capable de le dégrader.

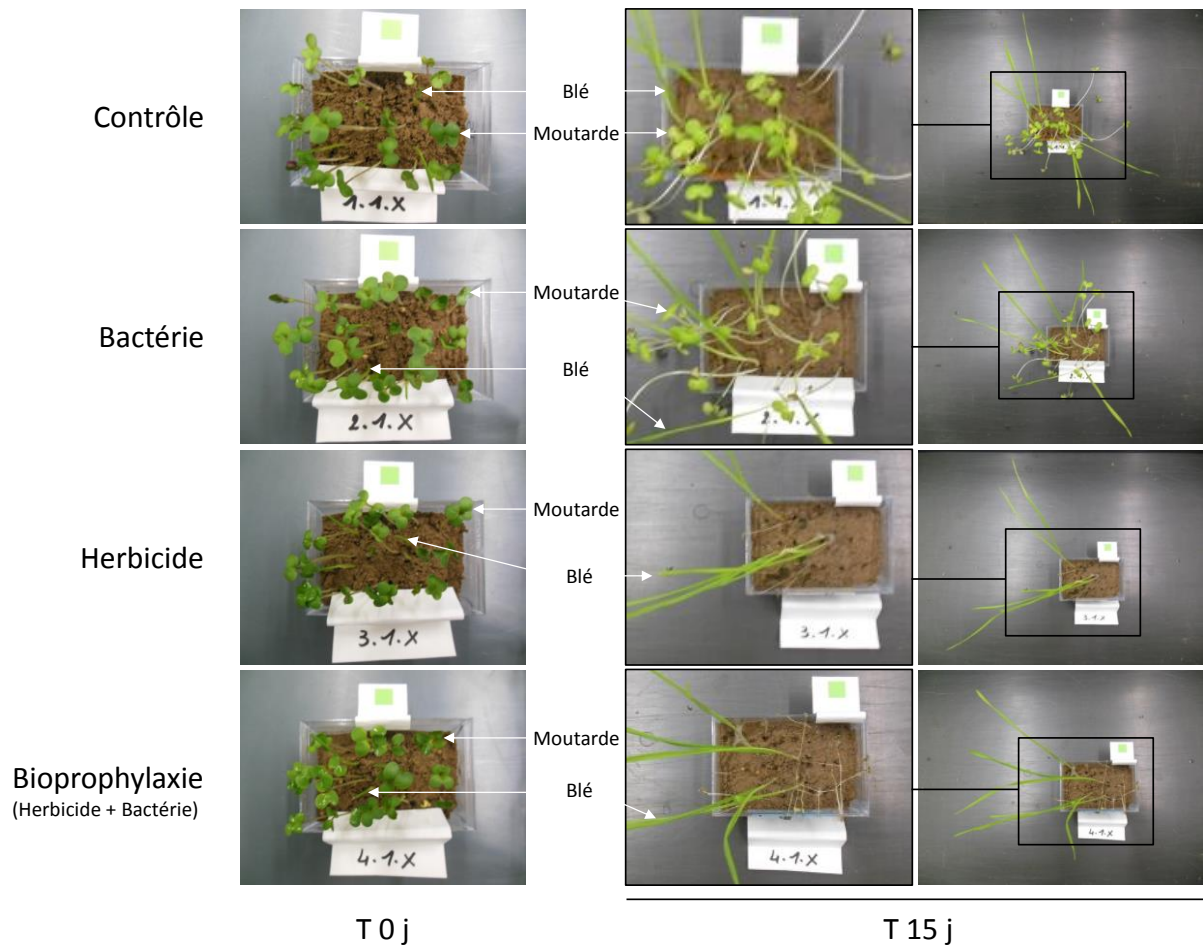
**Tableau 12.** Paramètres cinétiques de la dégradation du 2,4-D (DAM®) dans le sol 5 M pour les traitements **Herbicide** et **Bioprophyllaxie**. Les données expérimentales ont été modélisées à l'aide de la fonction DoseResp de OriginPro 8. Les valeurs des paramètres cinétiques et des coefficients de détermination correspondent à la moyenne  $\pm$  erreur standard ( $n = 4$ ). Les différences significatives pour chaque paramètre entre les deux traitements sont indiquées par des lettres minuscules entre parenthèses,  $a < b$  (test Tukey,  $P < 0,05$ ).

Condition	Paramètres du modèle				$r^2$
	$C_0$ (mM)	$C_f$ (mM)	$p$ (jour <sup>-1</sup> )	$DT_{50}$ (jour)	
2,4-D	$2,92 \pm 0,14$ (a)	$0,17 \pm 0,08$ (a)	$0,33 \pm 0,11$ (a)	$7,37 \pm 0,64$ (b)	$0,979 \pm 0,01$
2,4-D + JMP134	$2,80 \pm 0,19$ (a)	$-0,01 \pm 0,003$ (a)	$0,47 \pm 0,06$ (a)	$2,34 \pm 0,19$ (a)	$0,999 \pm 0,001$



### 3.3. Activité herbicide du DAM®

L'observation visuelle n'a pas permis de mettre en évidence une différence de morphologie des plants de blé entre les conditions Contrôle et Bactérie, indiquant l'absence d'effet de la souche *C. necator* JMP134 sur l'état physiologique du blé (Figure 40). En revanche, une légère différence a pu être mise en évidence entre les conditions traitées ou non avec le DAM® (2,4-D 391 g L<sup>-1</sup>). En effet, un développement moins important et une plus grande tendance à la verse ont été observés dans le cas du blé traité avec l'herbicide (traitements Herbicide et Bioprophylaxie, indépendamment de la présence de la souche JMP134) par rapport au blé n'ayant pas reçu l'herbicide (traitements Contrôle et Bactérie) (Figure 40). Bien que le blé ne soit pas une espèce cible du 2,4-D, il a déjà été montré que cet herbicide pouvait impacter le développement de la plante, en fonction du stade de développement durant lequel le traitement est effectué (Pinthus and Natowitz, 1967). Similairement au blé, la moutarde n'a pas été affectée par la présence de la souche *C. necator* JMP134 (Figure 40). En revanche, comme escompté, le traitement Herbicide a permis d'éliminer la totalité des plants de moutarde en 15 jours (Figure 40). Cet effet a également été observé (dans les mêmes proportions) pour les microcosmes traités en Bioprophylaxie, ce qui indique que la présence de la souche JMP134, qui a considérablement réduit le temps de demi-vie du 2,4-D dans le sol, n'a pas induit de baisse d'efficacité du traitement herbicide (Figure 40).



**Figure 40.** Suivi visuel de l'activité herbicide du 2,4-D (DAM<sup>®</sup>) suite à l'épandage d'eau de Volvic<sup>®</sup> (**Contrôle**), d'eau de Volvic<sup>®</sup> additionnée de *C. necator* JMP134 (**Bactérie**), d'eau de Volvic<sup>®</sup> additionnée de DAM<sup>®</sup> à la dose agronomique (**Herbicide**) et d'eau de Volvic<sup>®</sup> additionnée de *C. necator* JMP134 + DAM<sup>®</sup> (**Bioprophyllaxie**). Exemple de photographies prises à T = 0 et 15 jours, pour un des 4 réplicats de chaque condition. Les flèches blanches indiquent les espèces de plantes présentes dans les microcosmes. Echelle : carré vert de 1 cm de côté.

#### 4. Conclusion et perspectives

Les premiers résultats obtenus lors de l'étude en microcosmes de sol ont permis de montrer que la technique de bioprophyllaxie permettait de réduire la persistance du 2,4-D dans le sol (réduction du temps de demi-vie d'un facteur 3) tout en conservant l'efficacité du traitement herbicide (similaire au traitement classique). Ces résultats font donc de la bioprophyllaxie une technique prometteuse qui pourrait dans l'avenir être utilisée pour faire évoluer les pratiques agricoles vers des méthodes efficaces de lutte contre les adventices tout en assurant une baisse significative (i) de l'impact potentiel des herbicides sur les microorganismes du sol et (ii) du potentiel de contamination de l'environnement par ces molécules.

Comme indiqué précédemment, les données présentées ci-dessus ne sont que des résultats préliminaires qui ne décrivent que partiellement l'étude qui a été menée. Des travaux supplémentaires ont été menés ou sont encore actuellement en cours de réalisation ou d'analyses :

- la quantification du 2,4-D intercepté et/ou absorbé par les plantes,
- la quantification du gène de dégradation du 2,4-D (gène *tfdA*) dans le sol par PCR quantitative, pour chacun des 4 traitements effectués, au cours du temps (collaboration avec Fabrice Martin-Laurent, INRA Dijon),
- la détermination du potentiel de minéralisation du 2,4-D dans le sol, pour chacun des 4 traitements, au cours du temps (collaboration avec Fabrice Martin-Laurent, INRA Dijon),
- la détermination de l'effet herbicide au cours du temps par une technique d'analyse d'images qui permet de déterminer la couverture foliaire. Les résultats devraient permettre de mettre en évidence des différences d'efficacité du traitement herbicide en présence ou non de la bactérie, qui n'auraient pas été décelées lors de l'observation visuelle de l'état des plantes.

L'ensemble de ces résultats viendra compléter les données présentées ci-dessus afin de confirmer l'intérêt de la technique de Bioprophylaxie comme traitement « préventif » des pollutions par les pesticides d'origine agricole.

## **Conclusions, discussion générale et perspectives**



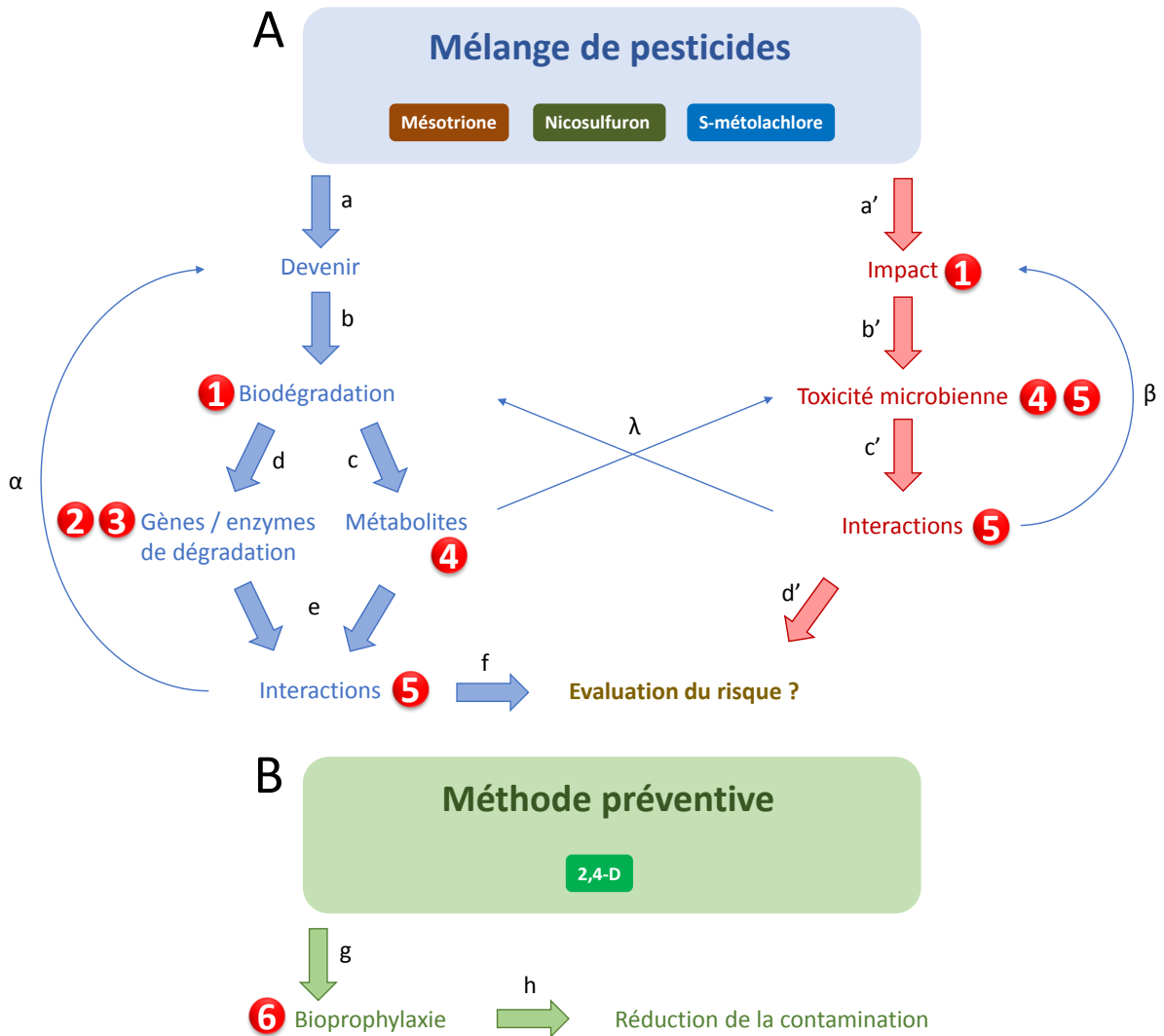
## Conclusions

La problématique actuelle de l'épandage, sur les cultures, de molécules dites de « nouvelle génération » à faibles doses, mais employées en **mélange**, nous a conduits à nous interroger sur les risques potentiels de leur utilisation pour l'environnement. Nous avons ciblé notre étude sur un mélange modèle composé de 3 herbicides : la **mésotrione**, le **nicosulfuron** et le **S-métolachlore**, utilisés quasi-simultanément principalement sur les cultures de maïs et dont les ventes sont en augmentation ces dernières années. Devant le manque de données sur le **devenir** et l'**impact** de chacune des molécules appliquées en mélange, nous avons mis en place des études expérimentales en laboratoire permettant d'approfondir les connaissances dans ce domaine et d'apporter des éléments de réponse.

Le premier axe de mes travaux de thèse, dont les différentes étapes sont présentées sur la Figure 41A, a porté sur l'étude du devenir et de l'impact de ce mélange d'herbicides. La description du devenir de ces pesticides (**a**), seuls ou en mélange, passe nécessairement par la caractérisation des voies de biodégradation de chacun d'eux par des souches dégradantes isolées (**b**), après identification des métabolites produits (**c**) et des gènes et enzymes impliqués (**d**). Une fois ces données acquises, l'étude des interactions entre substances actives et produits de transformation est alors possible (**e**), et permet d'évaluer plus précisément le risque de l'utilisation de ces pesticides en mélange (**f**).

L'impact du mélange de pesticides sur les microorganismes (**a'**) a été évalué à l'aide du test standard de toxicité Microtox<sup>®</sup> (**b'**), pour, *in fine*, mettre en évidence d'éventuelles interactions entre molécules mères et/ou métabolites (**c'**) et apprécier au mieux le risque d'utiliser ces molécules en mélange (**d'**).

Certains paramètres peuvent avoir des effets sur les processus impliqués dans le devenir et l'impact des mélanges de pesticides (Figure 41). C'est notamment le cas de l'effet des molécules mères et/ou métabolites sur les enzymes de dégradation, qui influence le devenir de chaque pesticide (**α**), des interactions entre molécules mères et/ou métabolites influençant l'impact des pesticides (**β**) et des effets réciproques entre devenir des molécules et toxicité (**λ**).



**Figure 41.** Représentation schématique des différents axes abordés et étapes réalisées au cours de mes travaux de thèse. Les numéros correspondent aux articles scientifiques publiés (1 à 4), soumis (5) et en préparation (6). Les lettres latines indiquent les différentes étapes des axes de recherche. Les lettres grecques indiquent des effets potentiels entre les paramètres.

Ces travaux ont permis d'isoler différentes souches capables de transformer 2 des molécules du mélange modèle étudié (mésotrione et/ou nicosulfuron) et de caractériser leurs voies de biodégradation, lorsqu'elles sont seules ou en mélanges binaires ou ternaire avec le *S*-métolachlore. La toxicité des métabolites formés, seuls ou en mélanges, a été déterminée et comparée dans chacune des conditions réalisées en laboratoire.

## - Molécules seules

L'analyse du protéome intracellulaire de la souche *B. megaterium* Mes11, capable de transformer la mésotrione, a révélé des protéines de stress, de stockage ou du métabolisme central différenciellement exprimées en réponse à l'exposition à la mésotrione. Ces protéines ont montré des liens étroits avec plusieurs nitroréductases connues pour être impliquées dans la dégradation de composés nitro-aromatiques.

J'ai ensuite pu montrer que deux nitroréductases de cette souche, nommées NfrA1 et NfrA2, avaient la capacité à transformer totalement la mésotrione et un de ses métabolites (le MNBA). Ces deux enzymes appartiennent à la sous-famille NfsA-FRP des Nitro-FMN réductases, insensibles à l'oxygène, ont une activité optimale à pH 6-6,5 et à 23-25 °C et sont capables de transformer d'autres composés nitro-aromatiques tels que des insecticides et des antibiotiques.

Une souche, nommée *P. fluorescens* SG-1, capable de transformer le nicosulfuron par co-métabolisme a également pu être isolée. Elle transforme majoritairement le nicosulfuron en ADMP et ASDM par clivage de la liaison sulfonylurée, la toxicité de l'ADMP (test Microtox<sup>®</sup>) étant 20 fois supérieure à celle du nicosulfuron. Les adjuvants présents dans la formulation commerciale du nicosulfuron ont un effet inhibiteur sur sa biotransformation par la souche SG-1. Cette souche est également capable de transformer deux autres sulfonylurées (le metsulfuron-méthyle et le tribénuron-méthyle) avec des voies de dégradation originales.

## - Molécules en mélange

Les études réalisées avec les mélanges de pesticides ont permis de montrer que la souche *B. megaterium* Mes11, capable de transformer la mésotrione, était également capable de transformer le nicosulfuron, seul ou en mélange avec la mésotrione, et ce, en présence ou non de *S*-métolachlore. Les métabolites de la mésotrione et du nicosulfuron sont identiques quelles que soient les conditions (herbicide seul ou en mélange). Cependant, les taux de transformation des molécules mères peuvent être modifiés par la présence d'autres molécules du mélange. En effet, les résultats ont montré que le *S*-métolachlore accélérât la transformation de la mésotrione, et que la mésotrione ralentissait celle du nicosulfuron. Ces variations de cinétique de biotransformation influent sur les taux de production des métabolites mais également sur leurs concentrations maximales observées dans le milieu. De



plus, un effet toxique synergique de tous les mélanges de molécules mères testés a été mis en évidence vis-à-vis de *A. fischeri* (test Microtox®). Les métabolites produits ont, quant à eux, montré majoritairement des interactions synergiques ou antagonistes selon les mélanges effectués.

Suite à ces études sur souches isolées, une approche s'intéressant au comportement des communautés microbiennes exposées aux 3 herbicides étudiés, seuls ou en mélange, a été réalisée à partir de litières de feuilles provenant d'eau de rivière. Ces communautés, principalement constituées d'hyphomycètes, ont également montré leur capacité à dégrader le nicosulfuron, seul ou en mélange avec la mésotrione et le *S*-métolachlore. L'impact du nicosulfuron sur la structure de ces communautés microbiennes varie en fonction du mode d'exposition (nicosulfuron seul ou en mélange avec les deux autres herbicides).

Le 2<sup>ème</sup> axe de recherche de ma thèse a porté sur le développement d'une approche innovante de bioremédiation préventive : la bioprophyllaxie (Figure 41B). Devant l'incapacité des souches bactériennes isolées lors de la première partie de mes travaux à minéraliser les herbicides étudiés, ces souches n'ont pas pu être valorisées dans ce contexte de bioremédiation. J'ai alors été amené à choisir le couple 2,4-D (herbicide) – *C. necator* JMP134 (bactérie minéralisante) comme modèle pour faire la preuve de concept de cette technique (**bioprophyllaxie**).

L'action préventive de cette méthode (**g**), qui consiste à épandre simultanément le pesticide et le microorganisme le minéralisant, permet de réduire la contamination du sol par les pesticides et leur diffusion dans les écosystèmes adjacents (**h**) et de limiter la formation de métabolites pouvant être plus toxiques que la molécule mère. J'ai ainsi pu montrer que la technique de bioprophyllaxie permettait de réduire d'un facteur 3 le temps de demi-vie du 2,4-D dans le sol tout en conservant l'efficacité du traitement herbicide.

## Discussion générale

Mes travaux de thèse se sont inscrits dans le contexte global de l'utilisation de mélanges de pesticides en agriculture, qui mène à la contamination multiple et à grande échelle de l'environnement (Schwarzenbach *et al.*, 2010). Afin de prédire le devenir de ces pesticides seuls et/ou en mélanges, et l'impact qu'ils peuvent avoir non seulement sur les écosystèmes, mais également sur la santé animale et humaine, il est nécessaire de s'intéresser aux processus majeurs qui régissent leur devenir dans l'environnement. La biodégradation est considérée comme l'un de ces processus, et est même le processus majeur quand les conditions environnementales sont défavorables à la dégradation abiotique (ex. absence de rayonnement lumineux qui induit la photolyse du pesticide) (Nawaz *et al.*, 2011).

L'étude d'un processus biologique tel que la biodégradation de xénobiotiques (dans notre cas les herbicides mésotrione, nicosulfuron et *S*-métolachlore) peut être réalisée *in situ* ou *in vitro*, ou encore à l'aide d'outils de modélisation. Quelle que soit l'approche choisie, différentes échelles sont ensuite envisageables pour étudier cette biodégradation (depuis l'échelle moléculaire jusqu'à l'échelle écosystémique). Les techniques applicables à chaque échelle d'étude sont interdépendantes, comme le montrent les deux exemples suivants : (i) une étude *in situ* montrant la co-occurrence de certains pesticides dans un environnement donné peut amener à les étudier *in vitro* afin de déceler d'éventuels effets synergiques générant des perturbations de l'écosystème ou impactant la santé animale et humaine, ou au contraire, montrer leur antagonisme qui limite les risques de leur utilisation pour l'environnement; (ii) l'identification des mécanismes de dégradation d'un pesticide *in vitro* (ex. identification des gènes de dégradation, identification des métabolites) permet de fournir des outils supplémentaires pour les études de suivi de dégradation *in situ*, au moyen notamment de biomarqueurs ou de tests d'activité enzymatique.

Dans le cadre de mes travaux de thèse, la compréhension des processus de dégradation des trois herbicides étudiés a été effectuée suite à des études *in vitro*, à l'aide de cultures de microorganismes isolés. Afin d'obtenir ces microorganismes, des cultures d'enrichissements ont été réalisées à partir d'échantillons environnementaux (sol, litière de feuilles), mais n'ont pas permis d'isoler des souches capables de dégrader le *S*-métolachlore. Cet échec peut

résulter du fait que les techniques culturales sont limitées car elles ne permettent de cultiver qu'une petite partie (environ 1 %) de la diversité totale des microorganismes (Stewart, 2012; López-Reyes *et al.*, 2015). Ainsi, bien que les techniques culturales aient considérablement évolué ces 30 dernières années, de nombreux obstacles subsistent pour accéder à l'ensemble de la diversité microbienne d'un échantillon environnemental, tels que la méthode de préparation de milieu gélosé (Tanaka *et al.*, 2014) ou le fait que certaines espèces soient interdépendantes, ce qui ne permet donc de les obtenir qu'en co-culture, et non pas en culture pure (Stewart, 2012).

Les cultures d'enrichissement ne nous ont pas non plus permis d'isoler des microorganismes capables de minéraliser la mésotrione ou le nicosulfuron. En effet, la souche *P. fluorescens* SG-1 isolée à partir de sol agricole de la plaine de la Limagne transforme le nicosulfuron par co-métabolisme. A l'opposé de la dégradation de composés organiques permettant la croissance d'un microorganisme, la transformation d'une molécule par co-métabolisme résulte de l'action d'enzymes assurant d'autres fonctions dans la cellule mais pouvant aussi fortuitement métaboliser le xénobiotique (Luo *et al.*, 2014). Ce processus est fréquemment décrit dans les études de transformation de composés organiques tels que les pesticides (Wang *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2014) et les antibiotiques (Kassotaki *et al.*, 2016). La dégradation de composés organiques par co-métabolisme rend plus difficile les études qui visent à caractériser les souches impliquées dans cette dégradation, que ce soit pour (i) les approches culturales, pour lesquelles il faut alors diversifier la composition des milieux de culture notamment en apportant différentes sources de carbone pour couvrir la plus grande gamme possible de métabolismes, et pour (ii) les approches non culturales, telles que les techniques de marquage par isotope stable (SIP, *Stable Isotope Probing*), qui permettent d'identifier au sein d'une communauté, l(es) espèce(s) impliquée(s) dans la dégradation d'un composé organique, à condition que ce composé serve de source de carbone (cas du marquage au  $^{13}\text{C}$ ) ou d'azote (cas du marquage au  $^{15}\text{N}$ ) (Neufeld *et al.*, 2007), ce qui n'est pas le cas dans les processus de co-métabolisme. Cette dernière technique est d'ailleurs assez peu utilisée dans le cas des pesticides en raison du coût très élevé des molécules marquées.

La démarche souvent utilisée dans les études de biodégradation/biotransformation de pesticides est la suivante : (i) cultures d'enrichissement, (ii) isolement d'une souche dégradant/transformant le pesticide d'intérêt, (iii) caractérisation des voies de biodégradation/transformation de ce pesticide (plus ou moins avancée selon les études), et dans certains cas (iv) détermination du spectre d'autres pesticides dégradés/transformés par cette souche. Cependant, la plupart du temps, les autres pesticides testés appartiennent à la

même famille chimique que la molécule d'intérêt et les tests de dégradation/transformation sont réalisés avec les molécules prises individuellement, comme par exemple dans le cas de souches capables de transformer le nicosulfuron (Yang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2015a; b; Carles *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016b) et la mésotrione (Romdhane *et al.*, 2015). Bien que ces études apportent des informations importantes sur la capacité de dégradation/transformation des pesticides par la souche isolée, elles ne permettent pas d'appréhender leur potentiel de dégradation dans un contexte *in situ* de multi-contamination. Nous avons donc mené des travaux dans ce sens en réalisant, parallèlement aux isolements de souches effectués avec les molécules individuelles, des isolements de microorganismes capables de dégrader simultanément plusieurs herbicides du mélange étudié, mais sans succès. Des travaux ont pu montrer la dégradation/transformation simultanée de plusieurs pesticides (appartenant ou non à la même famille chimique) par des consortia microbiens naturels (Kengara *et al.*, 2010; Kulshrestha and Kumari, 2010; Pino and Peñuela, 2011; Ortiz-Hernandez, 2014) ou artificiels (Rama Krishna and Philip, 2011; Abraham *et al.*, 2014), mais peu d'études ont mis en évidence la capacité d'une souche microbienne isolée de l'environnement à dégrader simultanément plusieurs pesticides de familles différentes (Lü *et al.*, 2008; Karas *et al.*, 2010; Kulshrestha and Kumari, 2010). Pour pallier au fait qu'il est difficile d'identifier des microorganismes issus de l'environnement capables de dégrader simultanément plusieurs pesticides, certains auteurs se sont alors tournés vers la construction de souches génétiquement modifiées, permettant ainsi à des souches capables de dégrader un composé, d'acquérir la capacité à en dégrader d'autres (Shimazu *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010, 2013; Cao *et al.*, 2013). Cependant, même si elle peut être envisagée dans le cas de méthodes de traitements biologiques de sol *ex situ* comme les bioréacteurs et les biopiles (Pavel and Gavrilescu, 2008), l'utilisation de souches génétiquement modifiées pour la remédiation de sites pollués n'est pas envisageable à l'heure actuelle, en raison du risque de contamination de l'environnement.

Cependant, la plupart des études s'intéressant à la dégradation des pesticides par les microorganismes (ex. dans les systèmes de potabilisation de l'eau) ne mettent en évidence que la dissipation des molécules, sans vérifier systématiquement que ces molécules ont été minéralisées (Vandermaesen *et al.*, 2016), alors que la dégradation partielle des pesticides (et donc la formation de métabolites) est un phénomène non négligeable, voire majoritaire (Hedegaard and Albrechtsen, 2014). L'obtention de souches capables de minéraliser le polluant à éliminer est donc une étape incontournable pour la mise au point de systèmes de bioremédiation basés sur l'utilisation de microorganismes. En effet, il n'est pas envisageable

d'apporter dans un système de traitement une souche qui peut potentiellement transformer une molécule mère en métabolites pouvant être plus toxiques, comme c'est le cas pour l'ADMP par rapport au nicosulfuron (Carles *et al.*, 2017) et l'AMBA par rapport à la mésotrione (Bonnet *et al.*, 2008).

La caractérisation des voies de biotransformation de chaque pesticide est donc indispensable pour permettre d'identifier le maximum de métabolites potentiellement produits et d'évaluer leur toxicité, principalement dans le contexte de multi-contamination observée dans l'environnement. Les travaux que nous avons menés dans ce sens ont permis de mettre en évidence que des effets synergiques étaient observés pour la toxicité vis-à-vis du microorganisme modèle *A. fischeri* (test standard Microtox<sup>®</sup>), aussi bien dans le cas du mélange des trois herbicides étudiés que de leurs métabolites respectifs. D'autres cas de synergie des pesticides pour *A. fischeri* ont déjà été reportés dans la littérature (Fernández-Alba *et al.*, 2001; Cedergreen *et al.*, 2006; Mansour *et al.*, 2015). Malgré tout, l'évaluation du risque des mélanges de pesticides (ex. réglementation européenne) n'est basée que sur les données des substances actives testées individuellement et ne prend pas en compte les effets non intentionnels de mélanges de pesticides dans l'environnement (Kienzler *et al.*, 2016). Cette dernière étude, réalisée par la Commission Européenne, souligne également le manque d'informations sur les concentrations environnementales des polluants, leur nature, leurs effets, ainsi que sur la relation qui existe entre concentration et effet. Les courbes dose-réponse sont communément employées pour mesurer l'effet d'un composé sur un organisme, mais la connaissance de la toxicité de chaque molécule d'un mélange ne permet pas de déterminer la toxicité globale de leur mélange dans le cas de synergie ou d'antagonisme (Cedergreen, 2014). Un niveau supplémentaire de complexité s'ajoute si on ne considère pas uniquement les pesticides, mais aussi d'autres catégories de polluants régulés par d'autres directives, et donc difficilement intégrables dans le processus d'évaluation du risque tel qu'il existe aujourd'hui. Un exemple a ainsi été récemment mis en évidence avec un pesticide organochloré et un œstrogène, qui, pris individuellement n'ont pas d'effet, mais montrent un effet synergique conduisant à l'activation des récepteurs PXR (*Pregnane X Receptors*) humains suite à l'augmentation de l'affinité du ligand, quand ils sont présents simultanément (Delfosse *et al.*, 2015).

Au regard du très grand nombre de molécules à tester (en incluant toutes les substances actives, leurs métabolites potentiels et les adjuvants présents dans les formulations commerciales), il n'est pas raisonnable d'envisager de pouvoir tester toutes les combinaisons

possibles de mélange. En revanche, les études devraient être orientées vers les molécules ayant la plus forte probabilité de se retrouver simultanément dans l'environnement, et vers celles appartenant à des familles chimiques connues pour avoir des effets synergiques telles que les triazines et les carbamates (Belden *et al.*, 2007; Cedergreen, 2014). Au regard de nos travaux qui, bien que restreints aux mélanges étudiés, font clairement apparaître la nécessité de renforcer les recherches sur les molécules en mélange, il apparaît également indispensable d'élargir ces investigations en prenant en compte le « pesticidome » (ensemble de substances actives, métabolites et adjuvants) dans les études de devenir et de toxicité des pesticides afin d'améliorer nos connaissances sur les processus impliqués et sur le risque de leur utilisation pour l'environnement et la santé animale et humaine.

Devant le phénomène quasi généralisé de multi-contamination des écosystèmes, il devient urgent d'essayer de trouver des solutions pour remédier et limiter la diffusion des pollutions dans l'environnement. Les deux techniques de bioremédiation les plus employées à l'heure actuelle sont la biostimulation et la bioaugmentation. Dans la première, le potentiel de dégradation des microorganismes autochtones du sol est stimulé par ajout de nutriments. Le coût de cette technique est limité mais sa réussite nécessite des études préliminaires pour déterminer la quantité et le type de nutriments nécessaires favorisant la croissance et l'activité de dégradation des microorganismes d'intérêt. Dans le processus de bioaugmentation, des microorganismes allochtones sélectionnés pour dégrader un composé donné sont ajoutés au sol. Cependant, ces microorganismes peuvent ne pas se maintenir ou perdre leur activité de dégradation. La réussite de ces techniques est également dépendante de la biodisponibilité du pesticide dans le sol, cette dernière diminuant au cours du temps et entraînant par conséquent un traitement de durée importante (Önneby, 2013). De plus, la mise en place d'une action de remédiation des sols nécessite différentes étapes (diagnostic, exécution d'un programme d'études techniques permettant d'évaluer les risques de dispersion des contaminants dans l'environnement, choix du procédé de traitement, travaux de réhabilitation) et souvent des essais préliminaires en laboratoire (Mougin *et al.*, 1996). Devant le nombre important de contraintes pour l'utilisation de ces procédés, nous avons fait le choix d'orienter nos recherches vers le développement d'une technique préventive (la bioprophylaxie) qui permet d'optimiser l'activité de dégradation des microorganismes, d'agir quand le polluant est le plus biodisponible et de réduire la diffusion de la pollution. Cependant, les limites actuelles de cette technique sont de déterminer le couple « microorganisme minéralisant-herbicide », de mettre au point des formulations galéniques permettant aux microorganismes de conserver

leur activité de dégradation, de s'assurer que l'efficacité de l'herbicide soit conservée en présence de la souche dégradante, et le coût encore indéterminé du fait que cette technique ne soit pas couramment utilisée. Malgré ces limites, nos résultats ont montré que la bioprophylaxie appliquée à l'herbicide 2,4-D permettait de réduire considérablement son temps de demi-vie dans le sol, sans altérer son activité herbicide, montrant ainsi l'efficacité d'une telle technique. Des tests de lyophilisation nous ont notamment permis de montrer que la souche *C. necator* JMP134 pouvait être conservée plusieurs mois, tout en conservant son activité de dégradation du 2,4-D. Reste maintenant à mettre au point l'enrobage des microorganismes, à valider nos résultats par des expériences à plus grande échelle, à la tester sur d'autres pesticides (par exemple des insecticides) et à évaluer le coût de cette méthode avant de pouvoir envisager sa mise en application potentielle dans les pratiques agricoles.

## Perspectives

Les perspectives envisagées suite à mes travaux de thèse s'inscrivent d'une part, dans la continuité directe en cherchant à compléter les études réalisées pour une meilleure compréhension des processus de biodégradation dans des situations de multi-contamination et d'autre part, dans une approche plus globale sur l'utilisation des mélanges de pesticides en agriculture et sur la manière d'évaluer et de traiter la pollution de l'environnement par des composés organiques issus de l'activité humaine.

Les **perspectives de recherche en laboratoire** concernent :

- *les voies de biodégradation des molécules seules*

Les cultures d'enrichissements réalisées n'ont pas permis d'isoler de microorganismes capables de dégrader le *S*-métolachlore. Un moyen d'étudier ses voies de biotransformation serait de tester les souches isolées connues pour dégrader le métolachlore, celles décrites dans la littérature comme capables de dégrader le *S*-métolachlore n'ayant pas conservé leur activité. Les résultats pourraient ainsi mettre en évidence une éventuelle biodégradation énantiosélective de cet herbicide.

Concernant le nicosulfuron, les résultats de nos tests de transformation par les souches *P. fluorescens* SG-1 et *B. megaterium* Mes11, ainsi que les données des études antérieures, montrent que ses voies de biotransformation sont relativement bien conservées, conduisant systématiquement à la formation d'ADMP après un clivage de la liaison sulfonylurée. Il serait donc intéressant d'identifier les métabolites produits par la souche fongique isolée à partir de communautés microbiennes associées à la litière de feuille en rivière, afin de vérifier s'ils sont identiques à ceux décrits jusqu'à présent. Le fait que les voies de biotransformation du nicosulfuron soient particulièrement conservées au sein de plusieurs genres microbiens laisse aussi supposer que les enzymes impliquées sont les mêmes. Il serait donc intéressant de les identifier afin de pouvoir développer dans le futur un biomarqueur permettant d'évaluer le potentiel de dégradation du nicosulfuron dans un environnement donné.



○ *les voies de biodégradation des molécules en mélange*

Concernant l'étude de la biotransformation du mélange des trois herbicides, la prochaine étape serait d'identifier les processus à l'origine des effets observés sur la biotransformation de la mésotrione et du nicosulfuron. L'accélération de la biotransformation de la mésotrione en présence de *S*-métolachlore pourrait être due à une activation de l'expression des gènes codant les nitroréductases par cet herbicide. En effet, les premiers résultats des analyses d'expression ont confirmé le caractère inductible des gènes *nfrA1* et *nfrA2* en présence de mésotrione. Cette étude a d'ores et déjà été mise en place dans le contexte de mélange de pesticides pour vérifier l'influence du *S*-métolachlore sur cette expression. L'inhibition de la transformation du nicosulfuron en présence de mésotrione semble, quant à elle, due à des interactions entre les deux molécules et/ou à des effets sur les cellules bactériennes influençant les processus d'adsorption/absorption à l'origine de la dissipation rapide du nicosulfuron au cours du premier jour d'incubation. Ceci devra être confirmé.

○ *les enzymes impliquées dans la dégradation*

L'AMBA est le métabolite de la mésotrione classiquement retrouvé dans l'environnement et est commun à toutes les souches capables de dégrader la mésotrione décrites jusqu'à présent. Nous avons mis en évidence le rôle des nitroréductases NfrA1 et NfrA2 de la souche Mes11 dans la transformation de la mésotrione en AMBA. Ces deux enzymes, appartenant à la même sous-famille de nitroréductases (NfsA-FRP), possèdent des domaines conservés qui peuvent être ciblés par des amorces ou des sondes spécifiques. Elles pourraient alors être utilisées comme biomarqueurs pour évaluer le potentiel de dégradation de la mésotrione dans un environnement donné. Ces enzymes pourraient également être utilisées pour le développement de biocapteurs microbiens (avec un gène rapporteur sous le contrôle du système de régulation des nitroréductases) ou enzymatiques (avec un couplage électrochimique) permettant de détecter spécifiquement la mésotrione.

L'étude de l'expression des gènes codant les nitroréductases NfrA1 et NfrA2 a révélé une surexpression des deux gènes chez la souche Mes11 en présence de mésotrione par rapport à la condition sans mésotrione. Il existe donc très certainement un système de régulation des deux gènes, directement ou indirectement sous le contrôle de composés nitro-aromatiques (ici, la mésotrione). Ces systèmes de régulation sont partiellement décrits chez *E. coli*, mais sont

encore inconnus pour le genre *Bacillus*. Une perspective plus fondamentale de notre étude serait donc d'investiguer le système de régulation des nitroréductases de la souche Mes11.

Nous avons également montré que la souche *B. megaterium* Mes11 possédait une grande diversité de nitroréductases (9 gènes situés sur le chromosome, représentant 5 sous-familles de nitroréductases). Le criblage initial que nous avons réalisé était focalisé sur l'activité de transformation de la mésotrione, mais j'ai aussi testé l'activité de certaines nitroréductases sur d'autres composés nitroaromatiques. Les tests préliminaires ont ainsi permis de mettre en évidence une activité supérieure de la nitroréductase YfkO pour la transformation de la prodrogue CB1954 par rapport à celle de NfrA1 et NfrA2. YfkO serait donc potentiellement une bonne candidate pour une application dans le domaine médical : par ex. pour l'activation de prodrogue par nitroréduction dans le cas du traitement de tumeurs cancéreuses (Williams *et al.*, 2015).

Enfin, le séquençage du génome de la souche Mes11 a permis de mettre en évidence la présence d'une troisième nitroréductase appartenant à la famille NfsA-FRP, celle-ci étant localisée sur un des plasmides de la souche. Les nitroréductases ayant été décrites jusqu'à présent sont localisées sur le chromosome de la souche. Il serait donc intéressant de déterminer la raison de la présence de ce gène sur un plasmide (est-il issu d'un transfert horizontal de gènes conférant à la souche un avantage comme la résistance à des composés nitro-aromatiques toxiques ?), et de caractériser l'activité de cette nitroréductase sur la mésotrione.

#### ○ *la minéralisation des molécules*

Dans la perspective de trouver des solutions de bioremédiation des écosystèmes, il serait primordial d'avoir à disposition des souches capables de minéraliser les pesticides. Même si certaines souches sont capables de minéraliser un pesticide à elle seule (Sørensen *et al.*, 2001; Lerch *et al.*, 2007), la plupart du temps, les voies de minéralisation d'une molécule sont dispersées au sein d'une communauté microbienne. Ainsi, la dégradation complète du polluant nécessite la coopération métabolique d'un consortium microbien. Lors de nos travaux, nous avons isolé deux souches (Mes11 et SG-1) capables de transformer la mésotrione et le nicosulfuron, seuls ou en mélange, en produisant plusieurs métabolites qui s'accumulent dans le milieu dans nos conditions, mais sans pouvoir les minéraliser. Il serait

donc intéressant d'isoler des souches capables de dégrader les métabolites pour ensuite former des consortia artificiels efficaces avec l'ensemble de ces souches, et, *in fine*, conduire à la minéralisation de chacun de ces pesticides.

### **Perspectives sociétales et environnementales**

Les travaux menés en écotoxicologie doivent contribuer à répondre *in fine* à la demande sociétale en matière de gestion environnementale et de développement durable. Ils doivent donc permettre de fournir des éléments, voire des outils, afin de mieux appréhender les risques environnementaux et/ou de mieux évaluer la qualité écologique des milieux exposés aux pesticides. Pour ce faire, l'idéal serait de posséder une souche bactérienne ou un consortium capable de minéraliser chaque pesticide utilisé en agriculture. L'utilisation de ces couples « pesticides-microorganismes minéralisants » en traitement préventif (bioprophylaxie) permettrait alors d'éviter une éventuelle pollution environnementale. Le cas échéant, les microorganismes minéralisants pourraient aussi être utilisés pour éliminer une pollution par bioaugmentation. Ainsi tout pesticide, pour lequel aucune méthode de dégradation n'a été démontrée, ne devrait être mis sur le marché. Ce principe aurait ainsi permis d'éviter la pollution de plus de 20 000 hectares de sol dans les Antilles françaises par la chlordécone, un insecticide utilisé dans les bananeraies pour éradiquer les populations de charançon noir entre 1972 et 1993. Encore de nos jours, il n'existe aucun moyen de le dégrader, que ce soit par photolyse, hydrolyse ou biodégradation. Pourtant interdit dès 1977 aux Etats-Unis, son utilisation a été poursuivie en France jusqu'en 1990. Cet exemple montre bien la nécessité d'harmoniser la législation, la réglementation et les méthodes d'évaluation des risques pour l'utilisation des pesticides au niveau mondial afin d'éviter que certaines molécules dont la dangerosité pour l'environnement et/ou la santé animale et humaine est avérée, ne soient interdites que dans certains pays.

Il faudrait également reconsidérer les méthodes d'évaluation des risques (éco)toxicologiques réalisées en amont de l'autorisation de la mise sur le marché des pesticides de manière à prendre en compte non seulement la persistance et la toxicité de la substance active, mais également celles de la formulation commerciale et des métabolites, seuls ou en mélanges avec les pesticides susceptibles d'être présents simultanément dans un environnement donné (mélange non intentionnel). Pour que cela soit possible, il est évident que les voies de dégradation de chaque molécule doivent être connues, ce qui implique de

mettre davantage de moyens dans les études qui vont dans ce sens. Bien que de nature très fondamentale, ces travaux constituent un préalable incontournable au développement d'outils permettant d'évaluer le devenir et l'impact des pesticides dans l'environnement.

Pour faire face à la recrudescence des maladies qui affectent les cultures et en impactent les rendements, l'Homme a jusqu'à présent privilégié la lutte chimique, ce qui a permis, avec la modernisation des pratiques agricoles, d'augmenter les rendements et ainsi de répondre à l'augmentation de la consommation mondiale. Cependant, les leçons du passé devraient être tirées pour optimiser les moyens de lutte tout en réduisant leur impact environnemental. L'utilisation massive de molécules de synthèse (pesticides, antibiotiques, médicaments, cosmétiques, etc.) a en effet conduit à la contamination de bon nombre d'écosystèmes. A côté de cela, l'apparition chez les adventices de résistance aux herbicides et chez les microorganismes pathogènes pour l'Homme et l'animal de multi-résistances aux antibiotiques laisse penser que nous sommes dans une course aux armements, comme le décrit très bien la théorie de la reine rouge : d'un côté, l'Homme développe constamment des nouvelles stratégies de lutte, et de l'autre, les adventices, les ravageurs ou encore les pathogènes évoluent et finissent par résister, et ainsi de suite. Les techniques évoluent : après les OGM (organismes génétiquement modifiés), arrivent les NBT (*New Breeding Techniques*), symboles des biotechnologies au service de l'agriculture. Quand s'arrêtera cette course sans fin ? Qui en sortira vainqueur ? La question est ouverte. Nous sommes désormais entrés dans l'ère de l'Anthropocène<sup>1</sup>...

---

<sup>1</sup> Terme de chronologie géologique proposé pour caractériser l'époque de l'histoire de la Terre qui a débuté lorsque les activités humaines ont eu un impact global significatif sur l'écosystème terrestre. Fait suite à l'Holocène. C'est le météorologue et chimiste de l'atmosphère Paul Crutzen qui a popularisé ce terme à la fin du XX<sup>e</sup> siècle.



## **Références bibliographiques**



- Aboul Eish, M.Y.Z. and Wells, M.J.M. (2008) Monitoring stereoselective degradation of metolachlor in a constructed wetland: use of statistically valid enantiomeric and diastereomeric fractions as opposed to ratios. *J. Chromatogr. Sci.* **46**: 269–275.
- Abraham, J., Silambarasan, S., and Logeswari, P. (2014) Simultaneous degradation of organophosphorus and organochlorine pesticides by bacterial consortium. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **45**: 2590–2596.
- ADES (2016) Portail national d'accès aux données sur les eaux souterraines. <http://www.adeseaufrance.fr/ExportData.aspx?paramFrance=ok>. Consulté le 02 08 2016.
- AGRESTE (2013) Enquête Pratiques culturales grande cultures et prairies 2011. *AGRESTE Aquitaine* **77**: 4–72.
- AGRESTE (2016) Données de vente des produits phytosanitaires 2011 à 2014. <http://agreste.agriculture.gouv.fr/thematiques-872/productions-vegetales-874/grandes-cultures-fourrages-875>. Consulté le 05 05 2016.
- Alekseeva, T., Kolyagin, Y., Sancelme, M., and Besse-Hoggan, P. (2014) Effect of soil properties on pure and formulated mesotrione adsorption onto vertisol (Limagne plane, Puy-de-Dôme, France). *Chemosphere* **111**: 177–183.
- Alferness, P. and Wiebe, L. (2002) Determination of mesotrione residues and metabolites in crops, soil, and water by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 3926–3934.
- Aliferis, K.A., Materzok, S., Pazioutou, G.N., and Chrysayi-Tokousbalides, M. (2009) *Lemna minor* L. as a model organism for ecotoxicological studies performing <sup>1</sup>H NMR fingerprinting. *Chemosphere* **76**: 967–973.
- Alletto, L., Benoit, P., Bolognesi, B., Couffignal, M., Bergheaud, V., Dumény, V., Longueval, C., and Barriuso, E. (2013) Sorption and mineralisation of S-metolachlor in soils from fields cultivated with different conservation tillage systems. *Soil Tillage Res.* **128**: 97–103.
- Alletto, L., Coquet, Y., Benoit, P., Heddadj, D., and Barriuso, E. (2011) Tillage management effects on pesticide fate in soils. In, *Sustainable Agriculture Volume 2*. Springer, pp. 787–831.
- Alves, P.A.T. (2012) Behavior of ametryn and glyphosate herbicides applied in association in soil of cultivation of sugar cane. Thesis, Universidade de Sao Paulo, Piracicaba.
- Anhalt, J.C., Arthur, E.L., Anderson, T.A., and Coats, J.R. (2000) Degradation of atrazine, metolachlor, and pendimethalin in pesticide-contaminated soils: Effects of aged residues on soil respiration and plant survival. *J. Environ. Sci. Health Part B-Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* **35**: 417–438.
- Ashburn Poppell, C., Hayes, R.M., and Mueller, T.C. (2002) Dissipation of nicosulfuron and rimsulfuron in surface soil. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 4581–4585.
- Aslam, S., Garnier, P., Rumpel, C., Parent, S.E., and Benoit, P. (2013) Adsorption and desorption behavior of selected pesticides as influenced by decomposition of maize mulch. *Chemosphere* **91**: 1447–1455.
- Aslam, S., Iqbal, A., Deschamps, M., Recous, S., Garnier, P., and Benoit, P. (2015) Effect of rainfall regimes and mulch decomposition on the dissipation and leaching of S-metolachlor and glyphosate: a soil column experiment. *Pest Manag. Sci.* **71**: 278–291.
- Audus, L.J. (1946) A new soil perfusion apparatus. *Nature* **158**: 3.
- Augustijn-Beckers, P.W.M., Hornsby, A.G., and Wauchope, R.D. (1994) The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. II. Additional compounds. In, *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer, pp. 1–82.



- Ayansina, A.D.V. and Oso, B.A. (2006) Effect of two commonly used herbicides on soil microflora at two different concentrations. *Afr. J. Biotechnol.* **5**: 129–132.
- Azcarate, M.P., Montoya, J.C., and Koskinen, W.C. (2015) Sorption, desorption and leaching potential of sulfonyleurea herbicides in Argentinean soils. *J. Environ. Sci. Health Part B* **50**: 229–237.
- Baćmaga, M., Borowik, A., Kucharski, J., Tomkiel, M., and Wyszowska, J. (2015) Microbial and enzymatic activity of soil contaminated with a mixture of diflufenican + mesosulfuron-methyl + iodosulfuron-methyl-sodium. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**: 643–656.
- Bailey, A.M. and Coffey, M.D. (1986) Characterization of microorganisms involved in accelerated biodegradation of metalaxyl and metolachlor in soils. *Can. J. Microbiol.* **32**: 562–569.
- Baldrian, P. (2006) Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**: 215–242.
- Banshtu, T., Patyal, S.K., and Devi, N. (2015) A comparative study on the persistence of pre-mix formulation of endosulfan and cypermethrin in tomato, *Solanum lycopersicum*. *Int. J. Farm Sci.* **5**: 114–128.
- Baran, N. and Gourcy, L. (2013) Sorption and mineralization of S-metolachlor and its ionic metabolites in soils and vadose zone solids: Consequences on groundwater quality in an alluvial aquifer (Ain Plain, France). *J. Contam. Hydrol.* **154**: 20–28.
- Barchanska, H., Kluza, A., Krajczewska, K., and Maj, J. (2015) Degradation study of mesotrione and other triketone herbicides on soils and sediments. *J. Soils Sediments* **16**: 125–133.
- Bardot, C., Besse-Hoggan, P., Carles, L., Le Gall, M., Clary, G., Chafey, P., Federici, C., Broussard, C., and Batisson, I. (2015) How the edaphic *Bacillus megaterium* strain Mes11 adapts its metabolism to the herbicide mesotrione pressure. *Environ. Pollut.* **199**: 198–208.
- Batisson, I., Crouzet, O., Besse-Hoggan, P., Sancelme, M., Mangot, J.-F., Mallet, C., and Bohatier, J. (2009) Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp. from soil. *Environ. Pollut.* **157**: 1195–1201.
- Batisson, I., Sancelme, M., Mallet, C., and Besse-Hoggan, P. (2010) Fate and environmental impact of the recently marketed herbicide Mesotrione: coupling biological and chemical studies for a global overview. *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* 287–294.
- Battaglin, W.A., Furlong, E.T., Burkhardt, M.R., and Peter, C.J. (2000) Occurrence of sulfonyleurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. *Sci. Total Environ.* **248**: 123–133.
- Battaglin, W.A., Rice, K.C., Focazio, M.J., Salmons, S., and Barry, R.X. (2009) The occurrence of glyphosate, atrazine, and other pesticides in vernal pools and adjacent streams in Washington, DC, Maryland, Iowa, and Wyoming, 2005–2006. *Environ. Monit. Assess.* **155**: 281–307.
- Beaudegnies, R., Edmunds, A.J.F., Fraser, T.E.M., Hall, R.G., Hawkes, T.R., Mitchell, G., Schaetzer, J., Wendeborn, S., and Wibley, J. (2009) Herbicidal 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors—A review of the triketone chemistry story from a Syngenta perspective. *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 4134–4152.
- Bedmar, F., Daniel, P.E., Costa, J.L., and Gimenez, D. (2011) Sorption of acetochlor, s-metolachlor, and atrazine in surface and subsurface soil horizons of Argentina. *Environ. Toxicol. Chem.* **30**: 1990–1996.

- Belden, J.B., Gilliom, R.J., and Lydy, M.J. (2007) How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integr. Environ. Assess. Manag.* **3**: 364–372.
- Benzi, M., Robotti, E., and Gianotti, V. (2011) HPLC-DAD-MSn to investigate the photodegradation pathway of nicosulfuron in aqueous solution. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**: 1705–1714.
- Beraud, J.-M., Compagnon, J.-M., and Kay, F. (2001) La mésotrione: Herbicide sélectif du maïs. *Phytoma- Déf. Végétaux* 41–44.
- Berger, B.M. and Wolfe, N.L. (1996) Hydrolysis and biodegradation of sulfonylurea herbicides in aqueous buffers and anaerobic water-sediment systems: Assessing fate pathways using molecular descriptors. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**: 1500–1507.
- Berry, D.F. and Boyd, S.A. (1985) Decontamination of soil through enhanced formation of bound residues. *Environ. Sci. Technol.* **19**: 1132–1133.
- Blaser, H.U. and Spindler, F. (1997) Enantioselective catalysis for agrochemicals. The case histories of (S)-metolachlor, (R)-metalaxyl and clozylacon. *Top. Catal.* **4**: 275–282.
- Bliss, C.I. (1939) The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* **26**: 585–615.
- Boithias, L., Sauvage, S., Taghavi, L., Merlina, G., Probst, J.-L., and Perez, J.M.S. (2011) Occurrence of metolachlor and trifluralin losses in the Save river agricultural catchment during floods. *J. Hazard. Mater.* **196**: 210–219.
- Bonfleur, E.J., Lavorenti, A., and Tornisielo, V.L. (2010) Mineralization and degradation of glyphosate and atrazine applied in combination in a Brazilian Oxisol. *J. Environ. Sci. Health Part B* **46**: 69–75.
- Bonnet, J.L., Bonnemoy, F., Dusser, M., and 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.
- Brethead, S., Toutant, J.-P., and Saglio, P. (2000) Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **47**: 117–124.
- Bromilow, R.H., Evans, A.A., and Nicholls, P.H. (2003) The influence of lipophilicity and formulation on the distribution of pesticides in laboratory-scale sediment/water systems. *Pest Manag. Sci.* **59**: 238–244.
- Brown, B.J. and Carlton, B.C. (1980) Plasmid-mediated transformation in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* **142**: 508–512.
- Bryant, C. and Deluca, M. (1991) Purification and characterization of an oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. *J. Biol. Chem.* **266**: 4119–4125.
- Bryant, D.W., McCalla, D.R., Leeksa, M., and Laneville, P. (1981) Type I nitroreductases of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **27**: 81–86.
- Buser, H.-R. and Mueller, M.D. (1995) Environmental behavior of acetamide pesticide stereoisomers. 1. Stereo- and enantioselective determination using chiral high-resolution gas chromatography and chiral HPLC. *Environ. Sci. Technol.* **29**: 2023–2030.
- Buser, H.R., Poiger, T., and Muller, M.D. (2000) Changed enantiomer composition of metolachlor in surface water following the introduction of the enantiomerically enriched product to the market. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 2690–2696.
- Byer, J.D., Struger, J., Sverko, E., Klawunn, P., and Todd, A. (2011) Spatial and seasonal variations in atrazine and metolachlor surface water concentrations in Ontario (Canada) using ELISA. *Chemosphere* **82**: 1155–1160.
- Caballero, A., Lázaro, J.J., Ramos, J.L., and Esteve-Núñez, A. (2005) PnrA, a new nitroreductase-family enzyme in the TNT-degrading strain *Pseudomonas putida* JLR11. *Environ. Microbiol.* **7**: 1211–1219.

- Cabrera, A., Papiernik, S.K., Koskinen, W.C., and Rice, P.J. (2012) Sorption and dissipation of aged metolachlor residues in eroded and rehabilitated soils. *Pest Manag. Sci.* **68**: 1272–1277.
- Cabrera, D., López-Piñeiro, A., Albarrán, Á., and Peña, D. (2010) Direct and residual effects on diuron behaviour and persistence following two-phase olive mill waste addition to soil: Field and laboratory experiments. *Geoderma* **157**: 133–141.
- Cai, W.-D., Liu, H.-J., and Fang, Z.-G. (2012) Toxicity effects of Rac- and S-metolachlor on two algae. *Huan Jing Ke Xue* **33**: 448–53.
- Campbell, G.R., Taga, M.E., Mistry, K., Lloret, J., Anderson, P.J., Roth, J.R., and Walker, G.C. (2006) *Sinorhizobium meliloti* bluB is necessary for production of 5, 6-dimethylbenzimidazole, the lower ligand of B12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 4634–4639.
- Cao, X., Yang, C., Liu, R., Li, Q., Zhang, W., Liu, J., Song, C., Qiao, C., and Mulchandani, A. (2013) Simultaneous degradation of organophosphate and organochlorine pesticides by *Sphingobium japonicum* UT26 with surface-displayed organophosphorus hydrolase. *Biodegradation* **24**: 295–303.
- Carles, L., Besse-Hoggan, P., Joly, M., Vigouroux, A., Morera, S., and Batisson, I. (2016) Functional and structural characterization of two *Bacillus megaterium* nitroreductases biotransforming the herbicide mesotrione. *Biochem. J.* **473**: 1443–1453.
- Carles, L., Joly, M., Bonnemoy, F., Lereboure, M., Batisson, I., and Besse-Hoggan, P. (2017) Identification of sulfonylurea biodegradation pathways enabled by a novel nicosulfuron-transforming strain *Pseudomonas fluorescens* SG-1: toxicity assessment and effect of formulation. *J. Hazard. Mater.* **324**: 184–193.
- Carrizosa, M.J., del Carmen Hermosin, M., Koskinen, W.C., and Cornejo, J. (2004) Interactions of two sulfonylurea herbicides with organoclays. *Clays Clay Miner.* **52**: 643–649.
- Cedergreen, N. (2014) Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *Plos One* **9**: e96580.
- Cedergreen, N., Kamper, A., and Streibig, J.C. (2006) Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants. *Aquat. Toxicol.* **78**: 243–252.
- Cessna, A.J., Donald, D.B., Bailey, J., and Waiser, M. (2015) Persistence of the sulfonylurea herbicides sulfosulfuron, rimsulfuron, and nicosulfuron in farm dugouts (ponds). *J. Environ. Qual.* **44**: 1948–1955.
- Chaabane, H., Vulliet, E., Calvayrac, C., Coste, C.-M., and Cooper, J.-F. (2008) Behaviour of sulcotrione and mesotrione in two soils. *Pest Manag. Sci.* **64**: 86–93.
- Charnay, M.-P., Tarabelli, L., Beigel, C., and Barriuso, E. (2000) Modifications of soil microbial activity and triticonazole biodegradation by pesticide formulation additives. *J. Environ. Qual.* **29**: 1618–1624.
- Chen, T., Yin, C., Hu, Y., Cui, L., Quan, G., Ding, C., and Yan, J. (2014) Adsorption of mesotrione in soils: kinetic and thermodynamic parameters. *Fresenius Environ. Bull.* **23**: 2578–2585.
- Chen, X., Li, W., Wu, Q., Chen, W., and Han, L. (2012) Dissipation and residues of the herbicide mesotrione in maize and soil in open field. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **88**: 772–775.
- Chowdhury, A., Pradhan, S., Saha, M., and Sanyal, N. (2008) Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian J. Microbiol.* **48**: 114–127.

- Chu, X., Fang, H., Pan, X., Wang, X., Shan, M., Feng, B., and Yu, Y. (2008) Degradation of chlorpyrifos alone and in combination with chlorothalonil and their effects on soil microbial populations. *J. Environ. Sci.* **20**: 464–469.
- Clair, E., Linn, L., Travert, C., Amiel, C., Séralini, G.-E., and Panoff, J.-M. (2012) Effects of Roundup® and glyphosate on three food microorganisms: *Geotrichum candidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Curr. Microbiol.* **64**: 486–491.
- Coleman, S., Linderman, R., Hodgson, E., and Rose, R.L. (2000) Comparative metabolism of chloroacetamide herbicides and selected metabolites in human and rat liver microsomes. *Environ. Health Perspect.* **108**: 1151–1157.
- Cook, M.E. and Moore, P.A. (2008) The effects of the herbicide metolachlor on agonistic behavior in the crayfish, *Orconectes rusticus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **55**: 94–102.
- Copin, P.-J., Perronet, L., and Chèvre, N. (2016) Modelling the effect of exposing algae to pulses of S-metolachlor: How to include a delay to the onset of the effect and in the recovery. *Sci. Total Environ.* **541**: 257–267.
- Coroi, I.G., De Wilde, T., Cara, M.S., Jitareanu, G., and Steurbaut, W. (2011) Influence of surfactants on the sorption of two chloroacetanilide in an Romanian chernozem soil. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **76**: 939–947.
- Crouzet, O., Batisson, I., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Bardot, C., Poly, F., Bohatier, J., and Mallet, C. (2010) Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: A dose-effect microcosm approach. *Soil Biol. Biochem.* **42**: 193–202.
- Crouzet, O., Poly, F., Bonnemoy, F., Bru, D., Batisson, I., Bohatier, J., Philippot, L., and Mallet, C. (2015) Functional and structural responses of soil N-cycling microbial communities to the herbicide mesotrione: a dose-effect microcosm approach. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **5**: 4207–4217.
- Crouzet, O., Wiszniowski, J., Donnadiou, F., Bonnemoy, F., Bohatier, J., and Mallet, C. (2013) Dose-dependent effects of the herbicide mesotrione on soil cyanobacterial communities. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **64**: 23–31.
- Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z., and Kozdrój, J. (2010) Responses of indigenous microorganisms to a fungicidal mixture of mancozeb and dimethomorph added to sandy soils. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **64**: 316–323.
- Dalton, S.R., Miller, R.T., and Meyer, S.A. (2003) The herbicide metolachlor induces liver cytochrome P450s 2B1/2 and 3A1/2, but not thyroxine-uridine dinucleotide phosphate glucuronosyltransferase and associated thyroid gland activity. *Int. J. Toxicol.* **22**: 287–295.
- Davila-Vazquez, G., Tinoco, R., Pickard, M.A., and Vazquez-Duhalt, R. (2005) Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Enzyme Microb. Technol.* **36**: 223–231.
- Day, K.E. (1993) Short-term effects of herbicides on primary productivity of periphyton in lotic environments. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* **2**: 123–138.
- Dayan, F.E., Duke, S.O., Sauldubois, A., Singh, N., McCurdy, C., and Cantrell, C. (2007) p-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is a herbicidal target site for  $\beta$ -triketones from *Leptospermum scoparium*. *Phytochemistry* **68**: 2004–2014.
- De Oliveira, I.M., Bonatto, D., and Henriques, J.A.P. (2010) Nitroreductases: enzymes with environmental, biotechnological and clinical importance. *Reactions* **3**: 1008–1019.
- Debenest, T., Pinelli, E., Coste, M., Silvestre, J., Mazzella, N., Madigou, C., and Delmas, F. (2009) Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. *Aquat. Toxicol.* **93**: 11–17.

- Deborah, Bv., Madhuri, Rj., and Mohiddin, Mj. (2013) Interaction effects of selected pesticides on soil enzymes. *Toxicol. Int.* **20**: 195–200.
- Dec, J. and Bollag, J.-M. (1997) Determination of covalent and noncovalent binding interactions between xenobiotic chemicals and soil. *Soil Sci.* **162**: 858–874.
- Delfosse, V., Dendele, B., Huet, T., Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Gerbal-Chaloin, S., Beucher, B., Roecklin, D., Muller, C., Rahmani, R., Cavaillès, V., Daujat-Chavanieu, M., Vivat, V., Pascussi, J.-M., Balaguer, P., and Bourguet, W. (2015) Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. *Nat. Commun.* **6**: 1–10.
- DeLorenzo, M.E. and Serrano, L. (2003) Individual and mixture toxicity of three pesticides; atrazine, chlorpyrifos, and chlorothalonil to the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *J. Environ. Sci. Health Part B* **38**: 529–538.
- Deng, L.-G., Li, Z.-M., Zhao, S.-C., Chen, Y.-B., Guo, C.-Y., and Lu, F.-S. (2013) Determination of mesotrione and its metabolite residues in maize by ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Chin. J. Anal. Chem. Chin. Version* **41**: 1269–1273.
- Dimou, A.D., Sakkas, V.A., and Albanis, T.A. (2005) Metolachlor photodegradation study in aqueous media under natural and simulated solar irradiation. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 694–701.
- Dinelli, G., Accinelli, C., Vicari, A., and Catizone, P. (2000) Comparison of the persistence of atrazine and metolachlor under field and laboratory conditions. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 3037–3043.
- Don, R.H. and Pemberton, J.M. (1981) Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **145**: 681–686.
- Durand, S., Amato, P., Sancelme, M., Delort, A.-M., Combourieu, B., and Besse-Hoggan, P. (2006) First isolation and characterization of a bacterial strain that biotransforms the herbicide mesotrione. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**: 222–228.
- Durand, S., Sancelme, M., Besse-Hoggan, P., and Combourieu, B. (2010) Biodegradation pathway of mesotrione: Complementarities of NMR, LC–NMR and LC–MS for qualitative and quantitative metabolic profiling. *Chemosphere* **81**: 372–380.
- Dyson, J.S., Beulke, S., Brown, C.D., and Lane, M.C.G. (2002) Adsorption and degradation of the weak acid mesotrione in soil and environmental fate implications. *J. Environ. Qual.* **31**: 613–618.
- Ebenezer, V. and Ki, J.-S. (2013) Quantification of toxic effects of the herbicide metolachlor on marine microalgae *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae), *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae), and *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae). *J. Microbiol.* **51**: 136–139.
- Echeverrigaray, S., Gomes, L.H., and Tavares, F.C.A. (1999) Isolation and characterization of Metolachlor-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 679–681.
- EFSA (2004) Review report for the active substance S-Metolachlor - Commission working document. *SANCO/1426/2001*.
- EFSA (2007) Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance nicosulfuron. *EFSA J.* **120**: 1–91.
- EFSA (2008) Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fluazinam. *EFSA J.* **137**: 1–82.
- EFSA (2014) Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance 2,4-D. *EFSA J.* **12(9)**: 1–78.

- EFSA (2016) Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance mesotrione. *EFSA J.* **14(3)**: 1–103.
- El Fantroussi, S. and Agathos, S.N. (2005) Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 268–275.
- Elias, D. and Bernot, M.J. (2014) Effects of atrazine, metolachlor, carbaryl and chlorothalonil on benthic microbes and their nutrient dynamics. *Plos One* **9**: e109190.
- Elsayed, O.F., Maillard, E., Vuilleumier, S., Millet, M., and Imfeld, G. (2015) Degradation of chloroacetanilide herbicides and bacterial community composition in lab-scale wetlands. *Sci. Total Environ.* **520**: 222–231.
- E-Phy (2016a) Catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages, des matières fertilisantes et des supports de culture autorisés en France. <https://ephy.anses.fr/>. Consulté le 11 07 2016.
- E-Phy (2016b) Définition et informations concernant les mélanges de produits phytopharmaceutiques. [https://ephy.anses.fr/produits-substances-usages/mélanges](https://ephy.anses.fr/produits-substances-usages/melanges). Consulté le 14 08 2016.
- European Commission (2016) EU Pesticides database. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database>. Consulté le 14 08 2016.
- Fairchild, J.F., Ruessler, D.S., Haverland, P.S., and Carlson, A.R. (1997) Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **32**: 353–357.
- FAO (1947) The state of food and agriculture : 1947.
- FAO (1965) The state of food and agriculture : 1965.
- Farenhorst, A., Londry, K.L., Nahar, N., and Gaultier, J. (2008) In-field variation in 2,4-D mineralization in relation to sorption and soil microbial communities. *J. Environ. Sci. Health Part B* **43**: 113–119.
- Fernandez, G., Pitelli, R.A., and Cadenazzi, M. (2009) CO<sub>2</sub> Evolution and Enzymatic Activities in Herbicide-treated Soil Samples. *Planta Daninha* **27**: 601–608.
- Fernández-Alba, A.R., Guil, L.H., López, G.D., and Chisti, Y. (2001) Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. *Anal. Chim. Acta* **426**: 289–301.
- Ferrer, I., Thurman, E.M., and Barcelo, D. (1997) Identification of ionic chloroacetanilide-herbicide metabolites in surface water and groundwater by HPLC/MS using negative ion spray. *Anal. Chem.* **69**: 4547–4553.
- Fogg, P., Boxall, A.B.A., and Walker, A. (2003) Degradation of pesticides in biobeds: the effect of concentration and pesticide mixtures. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 5344–5349.
- Földényi, R., Tóth, Z., Samu, G., and Érsek, C. (2013) Study of sorption of two sulfonylurea type of herbicides and their additives on soils and soil components. *J. Environ. Sci. Health Part B* **48**: 758–766.
- Fort, D.J., Rogers, R., Copley, H., Bruning, L., Stover, E.L., and Rapaport, D. (1999) Effect of sulfometuron methyl and nicosulfuron on development and metamorphosis in *Xenopus laevis*: impact of purity. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**: 2934–2940.
- Fujii, K., Takagi, K., Hiradate, S., Iwasaki, A., and Harada, N. (2007) Biodegradation of methylthio-s-triazines by *Rhodococcus* sp. strain FJ1117YT, and production of the corresponding methylsulfinyl, methylsulfonyl and hydroxy analogues. *Pest Manag. Sci.* **63**: 254–260.
- Gálvez-Valdivieso, G., Pineda, M., and Aguilar, M. (2010) Functional characterization and expression analysis of p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (chlorophyta) 1. *J. Phycol.* **46**: 297–308.

- Gannon, T.W., Hixson, A.C., Weber, J.B., Shi, W., Yelverton, F.H., and Rufty, T.W. (2013) Sorption of simazine and S-metolachlor to soils from a chronosequence of turfgrass systems. *Weed Sci.* **61**: 508–514.
- Gatidou, G., Stasinakis, A.S., and Iatrou, E.I. (2015) Assessing single and joint toxicity of three phenylurea herbicides using *Lemna minor* and *Vibrio fischeri* bioassays. *Chemosphere* **119**: S69–S74.
- Gaynor, J.D., Hamill, A.S., and MacTavish, D.C. (1993) Efficacy, fruit residues, and soil dissipation of the herbicide metolachlor in processing tomato. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **118**: 68–72.
- Gerber, H.R., Muller, G., and Ebner, L. (1974) CGA 24705, a new grasskiller herbicide. In, *Proceedings*.
- Gish, T.J., Prueger, J.H., Kustas, W.P., Daughtry, C.S.T., McKee, L.G., Russ, A., and Hatfield, J.L. (2009) Soil moisture and metolachlor volatilization observations over three years. *J. Environ. Qual.* **38**: 1785–1795.
- Gledhill, A.J., Jones, B.K., and Laird, W.J.D. (2001) Metabolism of 2-(4-methylsulphonyl-2-nitrobenzoyl)-1, 3-cyclohexanedione (mesotrione) in rat and mouse. *Xenobiotica* **31**: 733–747.
- Gonzalez, J. and Ukrainczyk, L. (1999) Transport of nicosulfuron in soil columns. *J. Environ. Qual.* **28**: 101–107.
- Gonzalez, J.M. and Ukrainczyk, L. (1996) Adsorption and desorption of nicosulfuron in soils. *J. Environ. Qual.* **25**: 1186–1192.
- Gonzalez-Lopez, J., Martinez-Toledo, M.V., Rodelas, B., and Salmeron, V. (1999) Effect of some herbicides on the production of lysine by *Azotobacter chroococcum*. *Amino Acids* **17**: 165–173.
- Gotz, T. and Boger, P. (2004) The very-long-chain fatty acid synthase is inhibited by chloroacetamides. *Z. Naturforschung C* **59**: 549–553.
- Gozzi, F., Sirés, I., Thiam, A., de Oliveira, S.C., Junior, A.M., and Brillas, E. (2016) Treatment of single and mixed pesticide formulations by solar photoelectro-Fenton using a flow plant. *Chem. Eng. J.* DOI 10.1016/j.cej.2016.02.026.
- Graham, W.H., Graham, D.W., Denoyelles, F., Smith, V.H., Larive, C.K., and Thurman, E.M. (1999) Metolachlor and alachlor breakdown product formation patterns in aquatic field mesocosms. *Environ. Sci. Technol.* **33**: 4471–4476.
- Greenlee, A.R., Ellis, T.M., and Berg, R.L. (2004) Low-dose agrochemicals and lawn-care pesticides induce developmental toxicity in murine preimplantation embryos. *Environ. Health Perspect.* **112**: 703–709.
- Grigg, B.C., Bischoff, M., and Turco, R.F. (1997) Cocontaminant effects on degradation of triazine herbicides by a mixed microbial culture. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 995–1000.
- Gundi, V.A.K.B., Viswanath, B., Chandra, M.S., Kumar, V.N., and Reddy, B.R. (2007) Activities of cellulase and amylase in soils as influenced by insecticide interactions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **68**: 278–285.
- Gutowski, L., Olsson, O., Leder, C., and Kümmerer, K. (2015) A comparative assessment of the transformation products of S-metolachlor and its commercial product Mercantor Gold® and their fate in the aquatic environment by employing a combination of experimental and *in silico* methods. *Sci. Total Environ.* **506–507**: 369–379.
- Haney, R.L., S., S., L., K., and F., H. (2002) Soil carbon and nitrogen mineralization as affected by atrazine and glyphosate. *Biol. Fertil. Soils* **35**: 35–40.
- Hang, B.-J., Hong, Q., Xie, X.-T., Huang, X., Wang, C.-H., He, J., and Li, S.-P. (2012) SulE, a sulfonylurea herbicide de-esterification esterase from *Hansschlegelia zihuaiaae* s113. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 1962–1968.

- Hassan, H.M. and Fridovich, I. (1978) Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **253**: 8143–8148.
- Hedegaard, M.J. and Albrechtsen, H.-J. (2014) Microbial pesticide removal in rapid sand filters for drinking water treatment–Potential and kinetics. *Water Res.* **48**: 71–81.
- Heipieper, H.J., Weber, F.J., Sikkema, J., Keweloh, H., and de Bont, J.A.M. (1994) Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol.* **12**: 409–415.
- Herrero, M. and Stuckey, D.C. (2015) Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. *Chemosphere* **140**: 119–128.
- Heys, K.A., Shore, R.F., Pereira, M.G., Jones, K.C., and Martin, F.L. (2016) Risk assessment of environmental mixture effects. *RSC Adv* **6**: 47844–47857.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T., and Williams, S.T. (1994) *Bergey's Manual of determinate bacteriology*.
- Hull, R.N., Kleywegt, S., and Schroeder, J. (2015) Risk-based screening of selected contaminants in the Great Lakes Basin. *J. Gt. Lakes Res.* **41**: 238–245.
- Hung, T.P., Truong, L.V., Binh, N.D., Frutos, R., Quiquampoix, H., and Staunton, S. (2016) Fate of insecticidal *Bacillus thuringiensis* Cry protein in soil: differences between purified toxin and biopesticide formulation: Fate of biopesticide and purified Cry toxins in soil. *Pest Manag. Sci.* DOI 10.1002/ps.4262.
- Huston, P.L. and Pignatello, J.J. (1999) Degradation of selected pesticide active ingredients and commercial formulations in water by the photo-assisted Fenton reaction. *Water Res.* **33**: 1238–1246.
- Hutson, D.H. (1998) *Metabolic pathways of agrochemicals: herbicides and plant growth regulators*. Royal Society of Chemistry. Cambridge: UK.
- Ismail, B.S., Omar, O., and Ingon, D. (1996) Effects of metolachlor on the activities of four soil enzymes. *Microbios* **87**: 239–248.
- Iwasaki, A., Takagi, K., Yoshioka, Y., Fujii, K., Kojima, Y., and Harada, N. (2007) Isolation and characterization of a novel simazine-degrading  $\beta$ -proteobacterium and detection of genes encoding s-triazine-degrading enzymes. *Pest Manag. Sci.* **63**: 261–268.
- Jiang, J., Zhang, R., Li, R., Gu, J.-D., and Li, S. (2007) Simultaneous biodegradation of methyl parathion and carbofuran by a genetically engineered microorganism constructed by mini-Tn5 transposon. *Biodegradation* **18**: 403–412.
- Johnson, H.M., Domagalski, J.L., and Saleh, D.K. (2011) Trends in pesticide concentrations in streams of the western United States, 1993–2005. *J. Am. Water Resour. Assoc.* **47**: 265–286.
- Joly, P., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Batisson, I., Bohatier, J., and Mallet, C. (2012) Impact of maize formulated herbicides mesotrione and S-metolachlor, applied alone and in mixture, on soil microbial communities. *ISRN Ecol.* **2012**: 1–9.
- Joly, P., Bonnemoy, F., Besse-Hoggan, P., Perrière, F., Crouzet, O., Cheviron, N., and Mallet, C. (2015) Responses of limagne “clay/organic matter-rich” soil microbial communities to realistic formulated herbicide mixtures, including S-metolachlor, mesotrione, and nicosulfuron. *Water. Air. Soil Pollut.* **226**: 1–15.
- Joly, P., Bonnemoy, F., Charvy, J.-C., Bohatier, J., and Mallet, C. (2013) Toxicity assessment of the maize herbicides S-metolachlor, benoxacor, mesotrione and nicosulfuron, and their corresponding commercial formulations, alone and in mixtures, using the Microtox® test. *Chemosphere* **93(10)**: 2444–2450.
- Joly, P., Misson, B., Perrière, F., Bonnemoy, F., Joly, M., Donnadiou-Bernard, F., Aguer, J.-P., Bohatier, J., and Mallet, C. (2014) Soil surface colonization by phototrophic indigenous organisms, in two contrasted soils treated by formulated maize herbicide mixtures. *Ecotoxicology* **23**: 1648–1658.



- Juneau, P., Dewez, D., Matsui, S., Kim, S.G., and Popovic, R. (2001) Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metolachlor by PAM-fluorometry. *Chemosphere* **45**: 589–598.
- Kalkhoff, S.J., Kolpin, D.W., Thurman, E.M., Ferrer, I., and Barcelo, D. (1998) Degradation of chloroacetanilide herbicides: The prevalence of sulfonic and oxanilic acid metabolites in Iowa groundwaters and surface waters. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 1738–1740.
- Kalkhoff, S.J., Vecchia, A.V., Capel, P.D., and Meyer, M.T. (2012) Eleven-year trend in acetanilide pesticide degradates in the Iowa river, Iowa. *J. Environ. Qual.* **41**: 1566–1579.
- Kang, Z., Dong, J., and Zhang, J. (2012) Optimization and Characterization of Nicosulfuron-Degrading Enzyme from *Bacillus subtilis* Strain YB1. *J. Integr. Agric.* **11**: 1485–1492.
- Kang, Z.H., Ren, C.C., Zhang, J.L., Dong, J.G., Li, X., and Wei, X.J. (2013) Purification and cloning of nicosulfuron-degrading enzymes from *Bacillus subtilis* YB1. *Appl. Biochem. Microbiol.* **50**: 30–34.
- Karant, N.G.K., Anderson, J.P.E., and Domsch, K.H. (1984) Degradation of the herbicide diclofop-methyl in soil and influence of pesticide mixtures on its persistence. *J. Biosci.* **6**: 829–837.
- Karas, P.A., Perruchon, C., Exarhou, K., Ehaliotis, C., and Karpouzas, D.G. (2010) Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi. *Biodegradation* **22**: 215–228.
- Karpouzas, D.G., Kandeler, E., Bru, D., Friedel, I., Auer, Y., Kramer, S., Vasileiadis, S., Petric, I., Udikovic-Kolic, N., Djuric, S., and Martin-Laurent, F. (2014a) A tiered assessment approach based on standardized methods to estimate the impact of nicosulfuron on the abundance and function of the soil microbial community. *Soil Biol. Biochem.* **75**: 282–291.
- Karpouzas, D.G., Papadopoulou, E., Ipsilantis, I., Friedel, I., Petric, I., Udikovic-Kolic, N., Djuric, S., Kandeler, E., Menkissoglu-Spiroudi, U., and Martin-Laurent, F. (2014b) Effects of nicosulfuron on the abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi used as indicators of pesticide soil microbial toxicity. *Ecol. Indic.* **39**: 44–53.
- Karpuzcu, M.E., McCabe, A.J., and Arnold, W.A. (2016) Phototransformation of pesticides in prairie potholes: effect of dissolved organic matter in triplet-induced oxidation. *Environ. Sci.-Process. Impacts* **18**: 237–245.
- Karupiah, M., Liggins, G., and Gupta, G. (1997) Effect of river and wetland sediments on toxicity of metolachlor. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **36**: 180–182.
- Kassotaki, E., Buttiglieri, G., Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Roda, I., and Pijuan, M. (2016) Enhanced sulfamethoxazole degradation through ammonia oxidizing bacteria co-metabolism and fate of transformation products. *Water Res.* **94**: 111–119.
- Katagi, T. (2008) Surfactant effects on environmental behavior of pesticides, in: D.M. Whitacre (Ed.), Springer New York. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **194**: 171–177.
- Kearney, P.C. and Kaufman, D.D. (1975) Herbicides: chemistry, degradation and mode of action. Marcel Dekker, Inc.
- Ke-Bin, L.I., Cheng, J.-T., Xiao-Fang, W., Ying, Z., and Wei-Ping, L.I.U. (2008) Degradation of herbicides atrazine and bentazone applied alone and in combination in soils. *Pedosphere* **18**: 265–272.
- Kengara, F.O., Schramm, K.-W., Doerfler, U., Munch, J.C., Henkelmann, B., Welzl, G., Bernhoeft, S., Hense, B., and Schroll, R. (2010) Degradation capacity of a 1,2,4-trichlorobenzene mineralizing microbial community for traces of organochlorine pesticides. *Sci. Total Environ.* **408**: 3359–3366.

- Kienzler, A., Bopp, S., van der Linden, S., Berggren, E., and Worth, A. (2016) Regulatory assessment of chemical mixtures: Requirements, current approaches and future perspectives. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **80**: 321–334.
- Kingsbury, J.M., Yang, Z., Ganous, T.M., Cox, G.M., and McCusker, J.H. (2004) *Cryptococcus neoformans* Ilv2p confers resistance to sulfometuron methyl and is required for survival at 37 C and *in vivo*. *Microbiology* **150**: 1547–1558.
- Kinney, C.A., Mandernack, K.W., and Mosier, A.R. (2005) Laboratory investigations into the effects of the pesticides mancozeb, chlorothalonil, and prosulfuron on nitrous oxide and nitric oxide production in fertilized soil. *Soil Biol. Biochem.* **37**: 837–850.
- Kinney, C.A., Mosier, A.R., Ferrer, I., Furlong, E.T., and Mandernack, K.W. (2004) Effects of the herbicides prosulfuron and metolachlor on fluxes of CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, and CH<sub>4</sub> in a fertilized Colorado grassland soil. *J. Geophys. Res.-Atmospheres* **109**: 1–12.
- Klein, C., Schneider, R.J., Meyer, M.T., and Aga, D.S. (2006) Enantiomeric separation of metolachlor and its metabolites using LC-MS and CZE. *Chemosphere* **62**: 1591–1599.
- Kochany, J. and Maguire, R.J. (1994) Sunlight photodegradation of metolachlor in water. *J. Agric. Food Chem.* **42**: 406–412.
- Koder, R.L., Oyedele, O., and Miller, A.-F. (2001) Retro-nitroreductase, a putative evolutionary precursor to *Enterobacter cloacae* strain 96-3 nitroreductase. *Antioxid. Redox Signal.* **3**: 747–755.
- Kolpin, D.K., Schnoebelen, D.J., and Thurman, E.M. (2004) Degradates provide insight to spatial and temporal trends of herbicides in ground water. *Ground Water* **42**: 601–608.
- Konopka, A. (1994) Anaerobic degradation of chloroacetanilide herbicides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 440–445.
- Koog, H.J. (1966) Netherlands Patent. 121788.
- KotoulaSyka, E., Hatzios, K.K., Berry, D.F., and Wilson, H.P. (1997) Degradation of acetanilide herbicides in history and nonhistory soils from eastern Virginia. *Weed Technol.* **11**: 403–409.
- Krause, A., Hancock, W.G., Minard, R.D., Freyer, A.J., Honeycutt, R.C., LeBaron, H.M., Paulson, D.L., Liu, S., and Bollag, J.M. (1985) Microbial transformation of the herbicide metolachlor by a soil actinomycete. *J. Agric. Food Chem.* **33**: 584–589.
- Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., Silva, T.O., Anziliero, D., Martins, D., Lorenson, M., Marteninghe, A., and Silva, L.B. da (2008) Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. *Ciênc. Rural* **38**: 1050–1055.
- Krogh, K., Halling-Sørensen, B., Mogensen, B., and Vejrup, K. (2003) Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere* **50**: 871–901.
- Krutz, L.J., Senseman, S.A., and Haney, R.L. (2003) Effect of Roundup Ultra on atrazine degradation in soil. *Biol. Fertil. Soils* **38**: 115–118.
- Kucharski, M. and Sadowski, J. (2009) Influence of adjuvants on behavior of phenmedipham in plant and soil environment. *Pol. J. Agron.* **1**: 32–36.
- Kucharski, M., Sadowski, J., Wujek, B., and Trajdos, J. (2011) Influence of adjuvants addition on lenacil residues in plant and soil. *Pol J Agron* **5**: 39–49.
- Kulshrestha, G. and Kumari, A. (2010) Simultaneous degradation of mixed insecticides by mixed fungal culture isolated from sewage sludge. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 11852–11856.
- Kumar, A., Trefault, N., and Olaniran, A.O. (2014) Microbial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Insight into the enzymes and catabolic genes involved, their regulation and biotechnological implications. *Crit. Rev. Microbiol.* **42**: 1–15.

- Kungolos, A., Emmanouil, C., Tsiridis, V., and Tsiropoulos, N. (2009) Evaluation of toxic and interactive toxic effects of three agrochemicals and copper using a battery of microbiotests. *Sci. Total Environ.* **407**: 4610–4615.
- Kurt-Karakus, P.B., Bidleman, T.F., Muir, D.C.G., Cagampan, S.J., Struger, J., Sverko, E., Small, J.M., and Jantunen, L.M. (2008) Chiral current-use herbicides in Ontario streams. *Environ. Sci. Technol.* **42**: 8452–8458.
- Kurt-Karakus, P.B., Bidleman, T.F., Muir, D.C.G., Struger, J., Sverko, E., Cagampan, S.J., Small, J.M., and Jantunen, L.M. (2010) Comparison of concentrations and stereoisomer ratios of mecoprop, dichlorprop and metolachlor in Ontario streams, 2006-2007 vs. 2003-2004. *Environ. Pollut.* **158**: 1842–1849.
- Kuster, M., de Alda, M.J.L., Barata, C., Raldua, D., and Barcelo, D. (2008) Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* **75**: 390–401.
- Laemmli, C.M., Leveau, J.H., Zehnder, A.J., and van der Meer, J.R. (2000) Characterization of a second tfd gene cluster for chlorophenol and chlorocatechol metabolism on plasmid pJP4 in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). *J. Bacteriol.* **182**: 4165–4172.
- de Lafontaine, Y., Beauvais, C., Cessna, A.J., Gagnon, P., Hudon, C., and Poissant, L. (2014) Sulfonylurea herbicides in an agricultural catchment basin and its adjacent wetland in the St. Lawrence River basin. *Sci. Total Environ.* **479**: 1–10.
- Lancaster, S.H., Haney, R.L., Senseman, S.A., Hons, F.M., and Chandler, J.M. (2006) Soil microbial activity is affected by Roundup WeatherMax and pesticides applied to cotton (*Gossypium hirsutum*). *J. Agric. Food Chem.* **54**: 7221–7226.
- Lancaster, S.H., Haney, R.L., Senseman, S.A., Kenerley, C.M., and Hons, F.M. (2008) Microbial Degradation of Fluometuron Is Influenced by Roundup WeatherMAX. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 8588–8593.
- Larras, F., Bouchez, A., Rimet, F., and Montuelle, B. (2012) Using bioassays and species sensitivity distributions to assess herbicide toxicity towards benthic diatoms. *Plos One* **7**: e44458.
- Larras, F., Montuelle, B., and Bouchez, A. (2013) Assessment of toxicity thresholds in aquatic environments: Does benthic growth of diatoms affect their exposure and sensitivity to herbicides? *Sci. Total Environ.* **463**: 469–477.
- Lavieille, D., Ter Halle, A., Bussiere, P.-O., and Richard, C. (2009) Effect of a spreading adjuvant on mesotrione photolysis on wax films. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 9624–9628.
- Lavieille, D., Ter Halle, A., and Richard, C. (2008) Understanding mesotrione photochemistry when applied on leaves. *Environ. Chem.* **5**: 420–425.
- Lebeau, T. (2011) Bioaugmentation for in situ soil remediation: how to ensure the success of such a process. In, Singh, A., Parmar, N., and Kuhad, R.C. (eds), *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 129–186.
- Leboulanger, C., Rimet, F., Hème de Lacotte, M., and Bérard, A. (2001) Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae. *Environ. Int.* **26**: 131–135.
- Lee, C.-M., Yeo, Y.-S., Lee, J.-H., Kim, S.-J., Kim, J.-B., Han, N.S., Koo, B.-S., and Yoon, S.-H. (2008) Identification of a novel 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the soil metagenome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **370**: 322–326.
- Lee, D.L., Knudsen, C.G., Michaely, W.J., Chin, H.-L., Nguyen, N.H., Carter, C.G., Cromartie, T.H., Lake, B.H., Shribbs, J.M., and Fraser, T. (1998) The structure–activity relationships of the triketone class of HPPD herbicides. *Pestic. Sci.* **54**: 377–384.

- Lei, B., Liu, M., Huang, S., and Tu, S.-C. (1994) *Vibrio harveyi* NADPH-flavin oxidoreductase: cloning, sequencing and overexpression of the gene and purification and characterization of the cloned enzyme. *J. Bacteriol.* **176**: 3552–3558.
- Lerch, T.Z., Dignac, M.-F., Barriuso, E., Bardoux, G., and Mariotti, A. (2007) Tracing 2,4-D metabolism in *Cupriavidus necator* JMP134 with <sup>13</sup>C-labelling technique and fatty acid profiling. *J. Microbiol. Methods* **71**: 162–174.
- Leveau, J.H., König, F., Fuchslin, H., Werlen, C., Der Meer, V., and Roelof, J. (1999) Dynamics of multigene expression during catabolic adaptation of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) to the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetate. *Mol. Microbiol.* **33**: 396–406.
- Lightfoot, R.T., Shuman, D., and Ischiropoulos, H. (2000) Oxygen-insensitive nitroreductases of *Escherichia coli* do not reduce 3-nitrotyrosine. *Free Radic. Biol. Med.* **28**: 1132–1136.
- Lin, H., Zhou, H., Xu, L., Zhu, H., and Huang, H. (2016) Effect of surfactant concentration on the spreading properties of pesticide droplets on Eucalyptus leaves. *Biosyst. Eng.* **143**: 42–49.
- Lin, Y.J., Karuppiah, M., Shaw, A., and Gupta, G. (1999) Effect of simulated sunlight on atrazine and metolachlor toxicity of surface waters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **43**: 35–37.
- Lins, V.S., Santos, H.R., and Gonçalves, M.C. (2007) The effect of the glyphosate, 2,4-D, atrazine and nicosulfuron herbicides upon the edaphic collembola (*Arthropoda: Ellipura*) in a no tillage system. *Neotrop. Entomol.* **36**: 261–267.
- Liochev, S.I., Hausladen, A., and Fridovich, I. (1999) Nitroreductase A is regulated as a member of the soxRS regulon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 3537–3539.
- Liu, D., Maguire, R.J., Pacepavicius, G.J., Aoyama, I., and Okamura, H. (1995) Microbial transformation of metolachlor. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **10**: 249–258.
- Liu, H. and Xiong, M. (2009) Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metolachlor to *Chlorella pyrenoidosa*. *Aquat. Toxicol.* **93**: 100–106.
- Liu, H.J., Cai, W.D., Huang, R.N., Xia, H.L., and Wen, Y.Z. (2012) Enantioselective toxicity of metolachlor to *Scenedesmus obliquus* in the presence of cyclodextrins. *Chirality* **24**: 181–187.
- Liu, H.J., Ye, W.H., Zhan, X.M., and Liu, W.P. (2006) A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **63**: 451–455.
- Liu, J., Chen, S., Ding, J., Xiao, Y., Han, H., and Zhong, G. (2015) Sugarcane bagasse as support for immobilization of *Bacillus pumilus* HZ-2 and its use in bioremediation of mesotrione-contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**: 10839–10851.
- Liu, S.Y., Freyer, A.J., and Bollag, J.M. (1991) Microbial dechlorination of the herbicide metolachlor. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 631–636.
- Liu, S.-Y., Lu, M.-H., and Bollag, J.-M. (1990) Transformation of metolachlor in soil inoculated with a *Streptomyces* sp. *Biodegradation* **1**: 9–17.
- Liu, S.-Y., Zhang, R., and Bollag, J.-M. (1988) Biodegradation of metolachlor in a soil perfusion experiment. *Biol. Fertil. Soils* **5**: 276–281.
- Loewe, S. and Muischnek, H. (1926) Combined effects I Announcement-Implements to the problem. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **114**: 313–326.
- Long, Y.H., Li, R.Y., and Wu, X.M. (2014) Degradation of S-metolachlor in soil as affected by environmental factors. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **14**: 189–198.
- Lopez-Alvarez, B., Villegas-Guzman, P., Peñuela, G.A., and Torres-Palma, R.A. (2016) Degradation of a toxic mixture of the pesticides carbofuran and iprodione by

- UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: evaluation of parameters and implications of the degradation pathways on the synergistic effects. *Water. Air. Soil Pollut.* **227**: 215–225.
- López-Reyes, L., Carcaño-Montiel, M.G., Sánchez-Alonso, P., and Vazquez-Cruz, C. (2015) The bacterial diversity in *Zea mays* L: A critical review. *Maydica* **60**: Open Access.
- Lu, X.H., Kang, Z.H., Tao, B., Wang, Y.N., Dong, J.G., and Zhang, J.L. (2012) Degradation of nicosulfuron by *Bacillus subtilis* YB1 and *Aspergillus niger* YF1. *Appl. Biochem. Microbiol.* **48**: 460–466.
- Lü, Z.-M., Li, Z.-M., Sang, L.-Y., and Min, H. (2008) Characterization of a strain capable of degrading a herbicide mixture of quinclorac and bensulfuronmethyl. *Pedosphere* **18**: 554–563.
- Luiz, V., Grossi, R., de Toledo Alves, P.A., Janice, E., and Henrique, S. (2013) Pesticide Tank Mixes: An Environmental Point of View. In, Price, A. (ed), *Herbicides - Current Research and Case Studies in Use*. InTech.
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., and Wang, X.C. (2014) A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* **473**: 619–641.
- Ma, Y., Liu, W.-P., and Wen, Y.-Z. (2006) Enantioselective degradation of rac-metolachlor and S-metolachlor in soil. *Pedosphere* **16**: 489–494.
- Maeghe, L., Eelen, H., and Bulcke, R. (2001) Soil persistence of 4-HPPD-inhibitors in different soil types. *Mededelingen* **67**: 383–391.
- Magnusson, M., Heimann, K., Quayle, P., and Negri, A.P. (2010) Additive toxicity of herbicide mixtures and comparative sensitivity of tropical benthic microalgae. *Mar. Pollut. Bull.* **60**: 1978–1987.
- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H., and Morin, B. (2012) Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar. Pollut. Bull.* **64**: 2663–2670.
- Mai, H., Gonzalez, P., Pardon, P., Tapie, N., Budzinski, H., Cachot, J., and Morin, B. (2014) Comparative responses of sperm cells and embryos of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to exposure to metolachlor and its degradation products. *Aquat. Toxicol.* **147**: 48–56.
- Maillard, E., Lange, J., Schreiber, S., Dollinger, J., Herbstritt, B., Millet, M., and Imfeld, G. (2016) Dissipation of hydrological tracers and the herbicide S-metolachlor in batch and continuous-flow wetlands. *Chemosphere* **144**: 2489–2496.
- Makkar, N.S. and Casida Jr, L.E. (1987) *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.; a Nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **37**: 323–326.
- Mansour, S.A., Abdel-Hamid, A.A., Ibrahim, A.W., Mahmoud, N.H., and Moselhy, W.A. (2015) Toxicity of some pesticides, heavy metals and their mixtures to *Vibrio fischeri* bacteria and *Daphnia magna*: comparative study. *J. Biol. Life Sci.* **6**: 221–240.
- Mantzou, N., Karakitsou, A., Hela, D., and Konstantinou, I. (2016) Environmental fate of the insecticide cypermethrin applied as microgranular and emulsifiable concentrate formulations in sunflower cultivated field plots. *Sci. Total Environ.* **541**: 542–550.
- Martinazzo, R., Dick, D.P., Hirsch, M.M., Leite, S.B., and Peralba, M. do C.R. (2011) Sorption of atrazine and mesotrione in oxisols and estimation of contamination potential. *Quím. Nova* **34**: 1378–1384.
- Martinez-Toledo, M.V. and Gonzalez-Lopez, J. (1989) Effect of metolachlor on *Azotobacter* nitrogen fixation in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**: 789–792.
- Martins, P.F., Carvalho, G., Gratao, P.L., Dourado, M.N., Pileggi, M., Araujo, W.L., and Azevedo, R.A. (2011) Effects of the herbicides acetochlor and metolachlor on antioxidant enzymes in soil bacteria. *Process Biochem.* **46**: 1186–1195.

- Martins, P.F., Martinez, C.O., Carvalho, G. de, Carneiro, P.I.B., Azevedo, R.A., Pileggi, S.A.V., Melo, I.S. de, and Pileggi, M. (2007) Selection of microorganisms degrading S-Metolachlor herbicide. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **50**: 153–159.
- Massa, R., Blevins, S., and Chao, S.L. (2008) Role of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase following exposure to nicosulfuron and diazinon in *Helicoverpa zea*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **71**: 230–235.
- Mata-Sandoval, J.C., Karns, J., and Torrents, A. (2001) Influence of rhamnolipids and triton X-100 on the biodegradation of three pesticides in aqueous phase and soil slurries. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 3296–3303.
- Mathew, R. and Khan, S.U. (1996) Photodegradation of metolachlor in water in the presence of soil mineral and organic constituents. *J. Agric. Food Chem.* **44**: 3996–4000.
- Mathias, F.T., Romano, R.M., Sleiman, H.K., de Oliveira, C.A., and Romano, M.A. (2012) Herbicide metolachlor causes changes in reproductive endocrinology of male wistar rats. *ISRN Toxicol.* **2012**: 130846.
- Matsuo, M., Endo, T., and Asada, K. (1998) Isolation of a novel NAD (P) H-quinone oxidoreductase from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Plant Cell Physiol.* **39**: 751–755.
- Mattiazzi Ušaj, M., Kaferle, P., Toplak, A., Trebše, P., and Petrovič, U. (2014) Determination of toxicity of neonicotinoids on the genome level using chemogenomics in yeast. *Chemosphere* **104**: 91–96.
- Mayer, A.M. and Staples, R.C. (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**: 551–565.
- McGahen, L.L. and Tiedje, J.M. (1978) Metabolism of two new acylanilide herbicides, Antor herbicide (H-22234) and Dual (metolachlor) by the soil fungus *Chaetomium globosum*. *J. Agric. Food Chem.* **26**: 414–419.
- Melo, A.A., Usano-Aleman, J., Guedes, J.V.C., and Hunsche, M. (2015) Impact of tank-mix adjuvants on deposit formation, cuticular penetration and rain-induced removal of chlorantraniliprole. *Crop Prot.* **78**: 253–262.
- Mendes, K.F., Reis, M.R. dos, Inoue, M.H., Pimpinato, R.F., and Tornisielo, V.L. (2016) Sorption and desorption of mesotrione alone and mixed with S-metolachlor+terbuthylazine in Brazilian soils. *Geoderma* **280**: 22–28.
- de Menezes, C.W., Soares, M.A., Fonseca, A.J., dos Santos, J.B., Camilo, S. da S., and Zanuncio, J.C. (2014) *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) as an indicator of toxicity of herbicides registered for corn in Brazil. *Chil. J. Agric. Res.* **74**: 361–365.
- Mersie, W., McNamee, C., Seybold, C., Wu, J.G., and Tierney, D. (2004) Degradation of metolachlor in bare and vegetated soils and in simulated water-sediment systems. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**: 2627–2632.
- Miller, J.L., Wollum, A.G., and Weber, J.B. (1997) Degradation of carbon-14-atrazine and carbon-14-metolachlor in soil from four depths. *J. Environ. Qual.* **26**: 633–638.
- Mitchell, G., Bartlett, D.W., Fraser, T.E.M., Hawkes, T.R., Holt, D.C., Townson, J.K., and Wichert, R.A. (2001) Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Manag. Sci.* **57**: 120–128.
- Mitchell, J.W. and Hamner, C.L. (1944) Polyethylene glycols as carriers for growth-regulating substances. *Bot. Gaz.* **105**: 474–483.
- Morton, M.D., Walters, F.H., Aga, D.S., Thurman, E.M., and Larive, C.K. (1997) Nuclear magnetic resonance identification of new sulfonic acid metabolites of chloroacetanilide herbicides. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 1240–1243.
- Moser, H., Rihs, G., and Sauter, H. (1982) The influence of atropisomerism and chiral center on the biological-activity of metolachlor. *Z. Naturforschung Sect. B* **37**: 451–462.

- Mougin, C., Chaplain, V., Gaillardon, P., Sohier, L., Mercier, R., Sigoillot, J.-C., Laugero, C., and Asther, M. (1996) Le traitement biologique des sols pollués par des composés organiques: l'intérêt des champignons filamenteux. *Courr. Environ. INRA* **28**: 49–56.
- Mueller, M.D. and Buser, H.-R. (1995) Environmental behavior of acetamide pesticide stereoisomers. 2. Stereo- and enantioselective degradation in sewage sludge and soil. *Environ. Sci. Technol.* **29**: 2031–2037.
- Muller, F. (1991) Free flavins: syntheses, chemical and physical properties. *Chem. Biochem. Flavoenzymes* **1**: 1–71.
- Mullin, C.A., Chen, J., Fine, J.D., Frazier, M.T., and Frazier, J.L. (2015) The formulation makes the honey bee poison. *Pestic. Biochem. Physiol.* **120**: 27–35.
- Munoz, A., Koskinen, W.C., Cox, L., and Sadowsky, M.J. (2011) Biodegradation and mineralization of metolachlor and alachlor by *Candida xestobii*. *J. Agric. Food Chem.* **59**: 619–627.
- Nalewaja, J.D., Woznica, Z., and Manthey, F.A. (1991) DPX-V9360 efficacy with adjuvants and environment. *Weed Technol.* 92–96.
- Nawaz, K., Hussain, K., Choudary, N., Majeed, A., Ilyas, U., Ghani, A., Lin, F., Ali, K., Afghan, S., Raza, G., and others (2011) Eco-friendly role of biodegradation against agricultural pesticides hazards. *Afr. J. Microbiol. Res.* **5**: 177–183.
- Nélieu, S., Perreau, F., Guichon, R., Seguin, F., Bry, C., and Einhorn, J. (2005) Monitoring and effects of nicosulfuron in aquatic mesocosms: development of a simple analytical procedure and evidence for low toxicity to phytoplankton communities. *Anal. Bioanal. Chem.* **382**: 108–114.
- Neufeld, J.D., Vohra, J., Dumont, M.G., Lueders, T., Manefield, M., Friedrich, M.W., and Murrell, J.C. (2007) DNA stable-isotope probing. *Nat. Protoc.* **2**: 860–866.
- Neves, M., Castro, B.B., Vidal, T., Vieira, R., Marques, J.C., Coutinho, J.A.P., Gonçalves, F., and Gonçalves, A.M.M. (2015) Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecol. Indic.* **53**: 220–230.
- Ni, Y., Lai, J., Wan, J., and Chen, L. (2014) Photosynthetic responses and accumulation of mesotrione in two freshwater algae. *Environ. Sci. Process. Impacts* **16**: 2288–2294.
- Ni, Y., Zhang, F., and Kokot, S. (2012) Enantioselective binding interaction of the metolachlor pesticide enantiomers with bovine serum albumin - A spectroscopic analysis study. *Spectrochim. Acta Part -Mol. Biomol. Spectrosc.* **97**: 753–761.
- Nicol, E., Genty, C., Bouchonnet, S., and Bourcier, S. (2015) Structural elucidation of metolachlor photoproducts by liquid chromatography/high-resolution tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **29**: 2279–2286.
- Nicolas, V., Oestreicher, N., and Vélot, C. (2016) Multiple effects of a commercial Roundup® formulation on the soil filamentous fungus *Aspergillus nidulans* at low doses: evidence of an unexpected impact on energetic metabolism. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**: 14393.
- Nixon, J.E., Wang, A., Field, J., Morrison, H.G., McArthur, A.G., Sogin, M.L., Loftus, B.J., and Samuelson, J. (2002) Evidence for lateral transfer of genes encoding ferredoxins, nitroreductases, NADH oxidase, and alcohol dehydrogenase 3 from anaerobic prokaryotes to *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot. Cell* **1**: 181–190.
- Nkedi-Kizza, P. and Brown, K.D. (1998) Sorption, degradation, and mineralization of carbaryl in soils, for single-pesticide and multiple-pesticide systems. *J. Environ. Qual.* **27**: 1318–1324.

- Nobels, I., Spanoghe, P., Haesaert, G., Robbens, J., and Blust, R. (2011) Toxicity ranking and toxic mode of action evaluation of commonly used agricultural adjuvants on the basis of bacterial gene expression profiles. *Plos One* **6**: e24139.
- Nokhbeh, M.R., Boroumandi, S., Pokorny, N., Koziarz, P., Paterson, E.S., and Lambert, I.B. (2002) Identification and characterization of SnrA, an inducible oxygen-insensitive nitroreductase in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA1535. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **508**: 59–70.
- Nunes, A.L. and Vidal, R.A. (2008) Persistence of S-metolachlor associated to glyphosate or paraquat under no-tillage. *Planta Daninha* **26**: 385–393.
- O’Connell, P.J., Harms, C.T., and Allen, J.R. (1998) Metolachlor, S-metolachlor and their role within sustainable weed-management. *Crop Prot.* **17**: 207–212.
- Olchanheski, L.R., Dourado, M.N., Beltrame, F.L., Zielinski, A.A.F., Demiate, I.M., Pileggi, S.A.V., Azevedo, R.A., Sadowsky, M.J., and Pileggi, M. (2014) Mechanisms of tolerance and high degradation capacity of the herbicide mesotrione by *Escherichia coli* strain DH5- $\alpha$ . *Plos One* **9**: e99960.
- Olekhnovich, I.N., Goodwin, A., and Hoffman, P.S. (2009) Characterization of the NAD(P)H oxidase and metronidazole reductase activities of the RdxA nitroreductase of *Helicobacter pylori*. *FEBS J.* **276**: 3354–3364.
- Oliveira, R.S., Koskinen, W.C., and Ferreira, F.A. (2001) Sorption and leaching potential of herbicides on Brazilian soils. *Weed Res.* **41**: 97–110.
- de Oliveira, T.A., dos Santos, J.B., Camelo, G.N., Botelho, R.G., and de Lázari, T.M. (2009) Effect of sequential nicosulfuron and chlorpyrifos application on seed bank and soil microbial characteristics. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* **33**: 563–570.
- Önneby, K. (2013) Bioaugmentation for reduction of diffuse pesticide contamination - A bioprophylactic concept. Thesis, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences-Department of Microbiology, Uppsala, Sweden.
- Önneby, K., Håkansson, S., Pizzul, L., and Stenström, J. (2013a) Reduced leaching of the herbicide MCPA after bioaugmentation with a formulated and stored *Sphingobium* sp. *Biodegradation* **25**: 291–300.
- Önneby, K., Jonsson, A., and Stenström, J. (2009) A new concept for reduction of diffuse contamination by simultaneous application of pesticide and pesticide-degrading microorganisms. *Biodegradation* **21**: 21–29.
- Önneby, K., Pizzul, L., Bjerketorp, J., Mahlin, D., Håkansson, S., and Wessman, P. (2013b) Effects of di- and polysaccharide formulations and storage conditions on survival of freeze-dried *Sphingobium* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 1399–1408.
- Ortiz-Hernandez, M.L. (2014) Removal of methyl parathion and coumaphos pesticides by a bacterial consortium immobilized in *Luffa cylindrica*. *Rev Int Contam Ambient* **30**: 51–63.
- Osano, O., Admiraal, W., Klamer, H.J.C., Pastor, D., and Bleeker, E.A.J. (2002a) Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environ. Pollut.* **119**: 195–202.
- Osano, O., Admiraal, W., and Otieno, D. (2002b) Developmental disorders in embryos of the frog *Xenopus laevis* induced by chloroacetanilide herbicides and their degradation products. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**: 375–379.
- Papadakis, E.N., Vryzas, Z., Kotopoulou, A., Kintzikoglou, K., Makris, K.C., and Papadopoulou-Mourkidou, E. (2015) A pesticide monitoring survey in rivers and lakes of northern Greece and its human and ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **116**: 1–9.



- Parween, T., Bhandari, P., Jan, S., and Raza, S.K. (2016) Interaction between pesticide and soil microorganisms and their degradation: a molecular approach. In, Hakeem, K.R. and Akhtar, M.S. (eds), *Plant, Soil and Microbes*. Springer International Publishing, Cham, pp. 23–43.
- Pathiratne, A. and Kroon, F.J. (2016) Using species sensitivity distribution approach to assess the risks of commonly detected agricultural pesticides to Australia's tropical freshwater ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* **35**: 419–428.
- Pavel, L.V. and Gavrilescu, M. (2008) Overview of *ex situ* decontamination techniques for soil cleanup. *Environ. Eng. Manag. J.* **7**: 815–834.
- Pena, D., Albarran, A., Lopez-Pineiro, A., Rato-Nunes, J.M., Sanchez-Llerena, J., and Becerra, D. (2013) Impact of oiled and de-oiled olive mill waste amendments on the sorption, leaching, and persistence of S-metolachlor in a calcareous clay soil. *J. Environ. Sci. Health Part B-Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* **48**: 767–775.
- Pereira, J., da Silva, A., Picanço, M., Barros, E., and Jakelaitis, A. (2005) Effects of herbicide and insecticide interaction on soil entomofauna under maize crop. *J. Environ. Sci. Health B* **40**: 45–54.
- Pereira, J.L., Picanço, M.C., Silva, A.A., Santos, E.A., Tomé, H.V.V., and Olarte, J.B. (2008) Effects of glyphosate and endosulfan on soil microorganisms in soybean crop. *Planta Daninha* **26**: 825–830.
- Pereira, S.P., Fernandes, M.A.S., Martins, J.D., Santos, M.S., Moreno, A.J.M., Vicente, J.A.F., Videira, R.A., and Jurado, A.S. (2009) Toxicity assessment of the herbicide metolachlor comparative effects on bacterial and mitochondrial model systems. *Toxicol. In Vitro* **23**: 1585–1590.
- Perelo, L.W. (2010) Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J. Hazard. Mater.* **177**: 81–89.
- Perez, J., Domingues, I., Soares, A.M.V.M., and Loureiro, S. (2011) Growth rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to herbicides found in surface waters in the Alqueva reservoir (Portugal): a bottom-up approach using binary mixtures. *Ecotoxicology* **20**: 1167–1175.
- Perez-Reinado, E., Blasco, R., Castillo, F., Moreno-Vivian, C., and Roldan, M.D. (2005) Regulation and characterization of two nitroreductase genes, *nprA* and *nprB*, of *Rhodobacter capsulatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7643–7649.
- Peterson, F.J., Mason, R.P., Hovsepian, J., and Holtzman, J.L. (1979) Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *J. Biol. Chem.* **254**: 4009–4014.
- Peterson, H.G., Boutin, C., Martin, P.A., Freemark, K.E., Ruecker, N.J., and Moody, M.J. (1994) Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. *Aquat. Toxicol.* **28**: 275–292.
- Peterson, M.A., McMaster, S.A., Riechers, D.E., Skelton, J., and Stahlman, P.W. (2016) 2,4-D past, present, and future: A review. *Weed Technol.* **30**: 303–345.
- Petric, I., Karpouzas, D.G., Bru, D., Udikovic-Kolic, N., Kandeler, E., Djuric, S., and Martin-Laurent, F. (2016) Nicosulfuron application in agricultural soils drives the selection towards NS-tolerant microorganisms harboring various levels of sensitivity to nicosulfuron. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**: 4320–4333.
- Pfeiffer, M. (2010) Groundwater Ubiquity score (GUS). *Pestic. Train. Resour.*
- Piancini, L.D.S., Guiloski, I.C., de Assis, H.S., and Cestari, M.M. (2015) Mesotrione herbicide promotes biochemical changes and DNA damage in two fish species. *Toxicol. Rep.* **2**: 1157–1163.

- Pileggi, M., Pileggi, S.A.V., Olchanheski, L.R., da Silva, P.A.G., Munoz Gonzalez, A.M., Koskinen, W.C., Barber, B., and Sadowsky, M.J. (2012) Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil. *Chemosphere* **86**: 1127–1132.
- Pinna, M.V., Roggero, P.P., Seddaiu, G., and Pusino, A. (2014) Soil sorption and leaching of active ingredients of Lumax® under mineral or organic fertilization. *Chemosphere* **111**: 372–378.
- Pino, N. and Peñuela, G. (2011) Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **65**: 827–831.
- Pinthus, M.J. and Natowitz, Y. (1967) Response of spring wheat to the application of 2,4-D at various growth stages. *Weed Res.* **7**: 95–101.
- Plackett, R.L. and Hewlett, P.S. (1948) Statistical aspects of the independent joint action of poisons, particularly insecticides. *Ann. Appl. Biol.* **35**: 347–358.
- Plackett, R.L. and Hewlett, P.S. (1952) Quantal responses to mixtures of poisons. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 141–163.
- Plumeier, I., Perez-Pantoja, D., Heim, S., Gonzalez, B., and Pieper, D.H. (2002) Importance of different tfd genes for degradation of chloroaromatics by *Ralstonia eutropha* JMP134. *J. Bacteriol.* **184**: 4054–4064.
- Poiger, T., Muller, M.D., and Buser, H.R. (2002) Verifying the chiral switch of the pesticide metolachlor on the basis of the enantiomer composition of environmental residues. *Chimia* **56**: 300–303.
- Polo, A.M., Tobajas, M., Sanchis, S., Mohedano, A.F., and Rodríguez, J.J. (2011) Comparison of experimental methods for determination of toxicity and biodegradability of xenobiotic compounds. *Biodegradation* **22**: 751–761.
- Poprawski, T.J. and Majchrowicz, I. (1995) Effects of herbicides on *in vitro* vegetative growth and sporulation of entomopathogenic fungi. *Crop Prot.* **14**: 81–87.
- Pose-Juan, E., Sánchez-Martín, M.J., Herrero-Hernández, E., and Rodríguez-Cruz, M.S. (2015) Application of mesotrione at different doses in an amended soil: Dissipation and effect on the soil microbial biomass and activity. *Sci. Total Environ.* **536**: 31–38.
- Pothuluri, J.V., Evans, F.E., Doerge, D.R., Churchwell, M.I., and Cerniglia, C.E. (1997) Metabolism of metolachlor by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **32**: 117–125.
- Prione, L.P., Olchanheski, L.R., Tullio, L.D., Santo, B.C.E., Reche, P.M., Martins, P.F., Carvalho, G., Demiate, I.M., Pileggi, S.A.V., Dourado, M.N., Prestes, R.A., Sadowsky, M.J., Azevedo, R.A., and Pileggi, M. (2016) GST activity and membrane lipid saturation prevents mesotrione-induced cellular damage in *Pantoea ananatis*. *AMB Express* **6**: 70.
- Procopio, S.O., Fernandes, M.F., Teles, D.A., Sena Filho, J.G., Cargnelutti Filho, A., Vargas, L., and Sant'anna, S. a. C. (2011) Toxicity of herbicides applied on sugarcane to the diazotrophic bacterium *Azospirillum brasilense*. *Planta Daninha* **29**: 1079–1089.
- Prueger, J.H., Gish, T.J., McConnell, L.L., McKee, L.G., Hatfield, J.L., and Kustas, W.P. (2005) Solar radiation, relative humidity, and soil water effects on metolachlor volatilization. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 5219–5226.
- Puglisi, E. (2012) Response of microbial organisms (aquatic and terrestrial) to pesticides. *EFSA Eur. Food Saf. Auth. Support. Publ. EN-359*.
- Pusino, A., Liu, W., and Gessa, C. (1992) Influence of organic matter and its clay complexes on metolachlor adsorption on soil. *Pestic. Sci.* **36**: 283–286.
- Race, P.R., Lovering, A.L., Green, R.M., Ossor, A., White, S.A., Searle, P.F., Wrighton, C.J., and Hyde, E.I. (2005) Structural and mechanistic studies of *Escherichia coli* nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone. *J. Biol. Chem.* **280**: 13256–13264.

- Rama Krishna, K. and Philip, L. (2011) Bioremediation of single and mixture of pesticide-contaminated soils by mixed pesticide-enriched cultures. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **164**: 1257–1277.
- RECORD (2011) Mélanges de polluants, toxicité, écotoxicité et évaluation des risques. n°08-0668/1A.
- Reddy, K.N. and Singh, M. (1993) Effect of acrylic polymer adjuvants on leaching of bromacil, diuron, norflurazon, and simazine in soil columns. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **50**: 449–457.
- Regitano, J.B. and Koskinen, W.C. (2008) Characterization of nicosulfuron availability in aged soils. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 5801–5805.
- Rice, P.J., Anderson, T.A., and Coats, J.R. (2002) Degradation and persistence of metolachlor in soil: Effects of concentration, soil moisture, soil depth, and sterilization. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**: 2640–2648.
- Robert, S., Mansour, M.P., and Blackburn, S.I. (2007) Metolachlor-mediated selection of a microalgal strain producing novel polyunsaturated fatty acids. *Mar. Biotechnol.* **9**: 146–153.
- Rodríguez-Cruz, M.S., Sánchez-Martín, M.J., Andrades, M.S., and Sánchez-Camazano, M. (2007) Retention of pesticides in soil columns modified *in situ* and *ex situ* with a cationic surfactant. *Sci. Total Environ.* **378**: 104–108.
- Roldán, M.D., Pérez-Reinado, E., Castillo, F., and Moreno-Vivián, C. (2008) Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 474–500.
- Romdhane, S., Devers-Lamrani, M., Martin-Laurent, F., Calvayrac, C., Rocaboy-Faquet, E., Riboul, D., Cooper, J.-F., and Barthelmebs, L. (2015) Isolation and characterization of *Bradyrhizobium* sp. SR1 degrading two  $\beta$ -triketone herbicides. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**: 4138–4148.
- Roubeix, V., Mazzella, N., Mechin, B., Coste, M., and Delmas, F. (2011) Impact of the herbicide metolachlor on river periphytic diatoms: Experimental comparison of descriptors at different biological organization levels. *Ann. Limnol.-Int. J. Limnol.* **47**: 239–249.
- Rouchaud, J., Neus, O., Cools, K., and Bulcke, R. (1999) Flupyriflufenuron soil dissipation and mobility in winter wheat crops. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 3872–3878.
- Rouchaud, J., Neus, O., Eelen, H., and Bulcke, R. (2001) Mobility and adsorption of the triketone herbicide mesotrione in the soil of corn crops. *Toxicol. Environ. Chem.* **79**: 211–222.
- Russell, M.H., Saladini, J.L., and Lichtner, F. (2002) Sulfonylurea herbicides. *Pestic. Outlook* **13**: 166–173.
- Ryberg, K.R. and Gilliom, R.J. (2015) Trends in pesticide concentrations and use for major rivers of the United States. *Sci. Total Environ.* **538**: 431–444.
- Sabadie, J. (2002) Nicosulfuron: alcoholysis, chemical hydrolysis, and degradation on various minerals. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 526–531.
- Saglio, P., Bretaud, S., Rivot, E., and Olsén, K.H. (2003) Chemobehavioral changes induced by short-term exposures to prochloraz, nicosulfuron, and carbofuran in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **45**: 515–524.
- Saglio, P., Olsén, K.H. and Bretaud, S. (2001) Behavioral and olfactory responses to prochloraz, bentazone, and nicosulfuron-contaminated flows in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **41**: 192–200.
- Sahid, I.B. and Yap, M.Y. (1994) Effects of two acetanilide herbicides on microbial populations and their cellulolytic activities. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **52**: 61–68.

- Saison, C., Waller, N.J., Kumar, A., and Kookana, R.S. (2009) Effects of thiobencarb in combinations with molinate and chlorpyrifos on selected soil microbial processes. *J. Environ. Sci. Health Part B* **44**: 226–234.
- Salmeron, V., Martineztoledo, M., and Gonzalezlopez, J. (1991) Effects of alachlor and metolachlor on the biological-activity of *Azospirillum brasilense* grown in chemically defined and dialyzed-soil media. *Environ. Toxicol. Chem.* **10**: 493–499.
- Saltzman, S. and Brates, N. (1990) Effects of pesticides and CO<sub>2</sub> stress on ammonium oxidation in soil. *J. Environ. Sci. Health Part B* **25**: 689–711.
- Šantrić, L., Radivojević, L., Stanković-Kalezić, R., and Đorđević, S. (2004) Microbiological activity of soil treated with nicosulfuron. *Pestic. Fitomedicina* **19**: 55–60.
- Sanyal, D. and Kulshrestha, G. (1999) Effects of repeated metolachlor applications on its persistence in field soil and degradation kinetics in mixed microbial cultures. *Biol. Fertil. Soils* **30**: 124–131.
- Sanyal, D. and Kulshrestha, G. (2002) Metabolism of metolachlor by fungal cultures. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 499–505.
- Sanyal, D. and Kulshrestha, G. (2004) Degradation of metolachlor in crude extract of *Aspergillus flaavus*. *J. Environ. Sci. Health Part B-Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* **39**: 653–664.
- Sarmah, A.K. and Sabadie, J. (2002) Hydrolysis of sulfonylurea herbicides in soils and aqueous solutions: a review. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 6253–6265.
- Saxena, A., Zhang, R.W., and Bollag, J.-M. (1987) Microorganisms capable of metabolizing the herbicide metolachlor. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 390–396.
- Schenone, A.V., Conte, L.O., Botta, M.A., and Alfano, O.M. (2015) Modeling and optimization of photo-Fenton degradation of 2,4-D using ferrioxalate complex and response surface methodology (RSM). *J. Environ. Manage.* **155**: 177–183.
- Schloss, J.V. (1990) Acetolactate synthase, mechanism of action and its herbicide binding site. *Pestic. Sci.* **29**: 283–292.
- Schwarzenbach, R.P., Egli, T., Hofstetter, T.B., Von Gunten, U., and Wehrli, B. (2010) Global water pollution and human health. *Annu. Rev. Environ. Resour.* **35**: 109–136.
- Scoriza, R.N., Silva, A. de P., Correia, M.E.F., Leles, P.S. dos S., and Resende, A.S. de (2015) Efeito de herbicidas sobre a biota de invertebrados do solo em área de restauração florestal. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* **39**: 1576–1584.
- Scrano, L., Bufo, S.A., Perucci, P., Meallier, P., and Mansour, M. (1999) Photolysis and hydrolysis of rimsulfuron. *Reactions* **7**: 8.
- Scribner, E.A., Battaglin, W.A., Goolsby, D.A., and Thurman, E.M. (2000) Changes in herbicide concentrations in Midwestern streams in relation to changes in use, 1989-1998. *Sci. Total Environ.* **248**: 255–263.
- Seghers, D., Siciliano, S.D., Top, E.M., and Verstraete, W. (2005) Combined effect of fertilizer and herbicide applications on the abundance, community structure and performance of the soil methanotrophic community. *Soil Biol. Biochem.* **37**: 187–193.
- Seguin, F., Druart, J.-C., and Le Cohu, R. (2001a) Effects of atrazine and nicosulfuron on periphytic diatom communities in freshwater outdoor lentic mesocosms. *Ann. Limnol. - Int. J. Limnol.* **37**: 3–8.
- Seguin, F., Leboulanger, C., Rimet, F., Druart, J.C., and Bérard, A. (2001b) Effects of atrazine and nicosulfuron on phytoplankton in systems of increasing complexity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **40**: 198–208.
- Shaner, D., Brunk, G., Nissen, S., Westra, P., and Chen, W. (2012) Role of soil sorption and microbial degradation on dissipation of mesotrione in plant-available soil water. *J. Environ. Qual.* **41**: 170–178.

- Sharma, T., Rajor, A., and Toor, A.P. (2014) Degradation of imidacloprid in liquid by *Enterobacter* sp strain ATA1 using co-metabolism. *Bioremediation J.* **18**: 227–235.
- Shelton, D.R., Khader, S., Karns, J.S., and Pogell, B.M. (1996) Metabolism of twelve herbicides by *Streptomyces*. *Biodegradation* **7**: 129–136.
- Shimazu, M., Mulchandani, A., and Chen, W. (2001) Simultaneous degradation of organophosphorus pesticides and p-nitrophenol by a genetically engineered *Moraxella* sp. with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnol. Bioeng.* **76**: 318–324.
- Si, Y., Takagi, K., Iwasaki, A., and Zhou, D. (2009) Adsorption, desorption and dissipation of metolachlor in surface and subsurface soils. *Pest Manag. Sci.* **65**: 956–962.
- Singh, B. and Singh, K. (2016) Microbial degradation of herbicides. *Crit. Rev. Microbiol.* **42**: 245–261.
- Singh, B.K., Walker, A., and Wright, D.J. (2002) Degradation of chlorpyrifos, fenamiphos, and chlorothalonil alone and in combination and their effects on soil microbial activity. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**: 2600–2605.
- SOeS (2015a) Contamination globale des cours d'eau et des eaux souterraines par les pesticides en France en 2013. [www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/fileadmin/documents/Produits\\_editoriaux/L\\_essentiel\\_sur/Environnement/Eau/Les\\_pesticides\\_dans\\_les\\_eaux/2016/pesticides1c-2016-b.xls](http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/fileadmin/documents/Produits_editoriaux/L_essentiel_sur/Environnement/Eau/Les_pesticides_dans_les_eaux/2016/pesticides1c-2016-b.xls). Consulté le 20 05 2016.
- SOeS (2015b) Liste des pesticides recherchés dans les cours d'eau de France métropolitaine en 2013. [www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/fileadmin/documents/Produits\\_editoriaux/L\\_essentiel\\_sur/Environnement/Eau/Les\\_pesticides\\_dans\\_les\\_eaux/2016/pesticides1c-2016-b.xls](http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/fileadmin/documents/Produits_editoriaux/L_essentiel_sur/Environnement/Eau/Les_pesticides_dans_les_eaux/2016/pesticides1c-2016-b.xls). Consulté le 20 05 2016.
- Song, J., Gu, J., Zhai, Y., Wu, W., Wang, H., Ruan, Z., Shi, Y., and Yan, Y. (2013) Biodegradation of nicosulfuron by a *Talaromyces flavus* LZM1. *Bioresour. Technol.* **140**: 243–248.
- Sørensen, S.R., Ronen, Z., and Aamand, J. (2001) Isolation from agricultural soil and characterization of a *Sphingomonas* sp. able to mineralize the phenylurea herbicide isoproturon. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5403–5409.
- Spain, J.C. (1995) Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 523–555.
- Srinivasulu, M., Mohiddin, G.J., Madakka, M., and Rangaswamy, V. (2012a) Effect of pesticides on the population of *Azospirillum* sp. and on ammonification rate in two soils planted to groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Trop. Ecol.* **53**: 93–104.
- Srinivasulu, M., Mohiddin, G.J., Subramanyam, K., and Rangaswamy, V. (2012b) Effect of insecticides alone and in combination with fungicides on nitrification and phosphatase activity in two groundnut (*Arachis hypogaea* L.) soils. *Environ. Geochem. Health* **34**: 365–374.
- Staley, Z.R., Harwood, V.J., and Rohr, J.R. (2015) A synthesis of the effects of pesticides on microbial persistence in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Toxicol.* **45**: 813–836.
- Stamper, D.M. and Tuovinen, O.H. (1998) Biodegradation of the acetanilide herbicides alachlor, metolachlor, and propachlor. *Crit. Rev. Microbiol.* **24**: 1–22.
- Statistique Mondiale (2016) Croissance de la population mondiale. [http://www.statistiques-mondiales.com/croissance\\_population.htm](http://www.statistiques-mondiales.com/croissance_population.htm). Consulté le 22 07 2016.
- Steinheimer, T. and Scoggin, K. (2003) Leaching of post-emergence herbicides into shallow groundwater during transition from conventional-tillage to no-tillage on des moines lobe soils of central Iowa. In *American Chemical Society Symposium Series*.
- Stewart, E.J. (2012) Growing unculturable bacteria. *J. Bacteriol.* **194**: 4151–4160.

- Streker, K., Freiberg, C., Labischinski, H., Hacker, J., and Ohlsen, K. (2005) *Staphylococcus aureus* NfrA (SA0367) is a flavin mononucleotide-dependent NADPH oxidase involved in oxidative stress response. *J. Bacteriol.* **187**: 2249–2256.
- Sun, Y., Xu, Y., Sun, Y., Qin, X., and Wang, Q. (2013) Dissipation and dynamics of mesotrione in maize and soil under field ecosystem. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **90**: 242–247.
- Swarcewicz, M.K. and Gregorczyk, A. (2012) The effects of pesticide mixtures on degradation of pendimethalin in soils. *Environ. Monit. Assess.* **184**: 3077–3084.
- Takagi, K., Fujii, K., Yamazaki, K., Harada, N., and Iwasaki, A. (2012) Biodegradation of melamine and its hydroxy derivatives by a bacterial consortium containing a novel *Nocardioides* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**: 1647–1656.
- Takagi, K., Iwasaki, A., Kamei, I., Satsuma, K., Yoshioka, Y., and Harada, N. (2009) Aerobic mineralization of hexachlorobenzene by newly isolated pentachloronitrobenzene-degrading *Nocardioides* sp. strain PD653. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 4452–4458.
- Takeda, K., Iizuka, M., Watanabe, T., Nakagawa, J., Kawasaki, S., and Niimura, Y. (2007) *Synechocystis* DrgA protein functioning as nitroreductase and ferric reductase is capable of catalyzing the Fenton reaction: DrgA protein catalyzing the Fenton reaction. *FEBS J.* **274**: 1318–1327.
- Tanaka, T., Kawasaki, K., Daimon, S., Kitagawa, W., Yamamoto, K., Tamaki, H., Tanaka, M., Nakatsu, C.H., and Kamagata, Y. (2014) A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 7659–7666.
- Tejada, M. (2009) Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides. *Chemosphere* **76**: 365–373.
- Ter Halle, A., Lavieille, D., and Richard, C. (2010) The effect of mixing two herbicides mesotrione and nicosulfuron on their photochemical reactivity on cuticular wax film. *Chemosphere* **79**: 482–487.
- Ter Halle, A. and Richard, C. (2006) Simulated solar light irradiation of mesotrione in natural environment water. *Environ. Sci. Technol.* **40**: 3842–3847.
- Thakkar, M., Randhawa, V., and Wei, L. (2013) Comparative responses of two species of marine phytoplankton to metolachlor exposure. *Aquat. Toxicol.* **126**: 198–206.
- Thurman, E.M., Bastian, K.C., and Mollhagen, T. (2000) Occurrence of cotton herbicides and insecticides in playa lakes of the High Plains of West Texas. *Sci. Total Environ.* **248**: 189–200.
- Toccalino, P.L., Gilliom, R.J., Lindsey, B.D., and Rupert, M.G. (2014) Pesticides in groundwater of the United States: decadal-scale changes, 1993-2011. *Groundwater* **52**: 112–125.
- Trefault, N., De la Iglesia, R., Molina, A.M., Manzano, M., Ledger, T., Perez-Pantoja, D., Sanchez, M.A., Stuardo, M., and Gonzalez, B. (2004) Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. *Environ. Microbiol.* **6**: 655–668.
- Trigo, C., Spokas, K.A., Hall, K.E., Cox, L., and Koskinen, W.C. (2016) Metolachlor sorption and degradation in soil amended with fresh and aged biochars. *J. Agric. Food Chem.* **64**: 3141–3149.
- Trigo, C., Spokas, K., Cox, L., and Koskinen, W.C. (2014) Influence of soil biochar aging on sorption of the herbicides MCPA, nicosulfuron, terbuthylazine, indaziflam, and fluoroethyldiaminotriazine. *J. Agric. Food Chem.* **62**: 10855–10860.
- Tu, C.M. (1992) Effect of some herbicides on activities of microorganisms and enzymes in soil. *J. Environ. Sci. Health Part B* **27**: 695–709.

- Ueji, M., Kobara, Y., Shiyomi, M., and Koizumi, H. (2001) Environmental fate of pesticides. *Struct. Funct. Agroecosystem Des. Manag.* 275.
- Valiente Moro, C., Bricheux, G., Portelli, C., and Bohatier, J. (2012) Comparative effects of the herbicides chlortoluron and mesotrione on freshwater microalgae. *Environ. Toxicol. Chem.* **31**: 778–786.
- Vallotton, N., Moser, D., Eggen, R.I.L., Junghans, M., and Chèvre, N. (2008) S-metolachlor pulse exposure on the alga *Scenedesmus vacuolatus*: Effects during exposure and the subsequent recovery. *Chemosphere* **73**: 395–400.
- Valverde, J.R., Marín, S., and Mellado, R.P. (2014) Effect of herbicide combinations on bt-maize rhizobacterial diversity. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 1473–1483.
- Vandermaesen, J., Horemans, B., Bers, K., Vandermeeren, P., Herrmann, S., Sekhar, A., Seuntjens, P., and Springael, D. (2016) Application of biodegradation in mitigating and remediating pesticide contamination of freshwater resources: state of the art and challenges for optimization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**: 7361–7376.
- Vialaton, D., Bagli, D., Richard, C., Skejo-Andresen, H., Paya-Perez, A.B., and Larsen, B. (2001) Photochemical transformation of priority organic chemicals and pesticides in water. *Fresenius Environ. Bull.* **10**: 554–560.
- Viegas, C.A., Costa, C., André, S., Viana, P., Ribeiro, R., and Moreira-Santos, M. (2012) Does S-metolachlor affect the performance of *Pseudomonas* sp. strain adp as bioaugmentation bacterium for atrazine-contaminated soils? *Plos One* **7**: e37140.
- Vlădoiu, D.L., Filimon, M.N., Ostafe, V., and Isvoran, A. (2015a) Effects of herbicides and fungicides on the soil chitinolytic activity. A molecular docking approach. *Ecol. Chem. Eng. S* **22**: 439–450.
- Vlădoiu, D.L., Filimon, M.N., Ostafe, V., and Isvoran, A. (2015b) Assessment of pesticides interactions with *Bacillus pasteurii* urease. A computational study. *Rom J Phys* **60**: 583–592.
- Vryzas, Z., Papadakis, E.N., Oriakli, K., Moysiadis, T.P., and Papadopoulou-Mourkidou, E. (2012) Biotransformation of atrazine and metolachlor within soil profile and changes in microbial communities. *Chemosphere* **89**: 1330–1338.
- Vryzas, Z., Tسابoula, A., and Papadopoulou-Mourkidou, E. (2007) Determination of alachlor, metolachlor, and their acidic metabolites in soils by microwave-assisted extraction (MAE) combined with solid phase extraction (SPE) coupled with GC-MS and HPLC-UV analysis. *J. Sep. Sci.* **30**: 2529–2538.
- Wang, C., Wang, F., Zhang, Q., and Liang, W. (2016a) Individual and combined effects of tebuconazole and carbendazim on soil microbial activity. *Eur. J. Soil Biol.* **72**: 6–13.
- Wang, G., Zhang, J., Wang, L., Liang, B., Chen, K., Li, S., and Jiang, J. (2010) Co-metabolism of DDT by the newly isolated bacterium, *Pseudoxanthomonas*. *Braz. J. Microbiol.* **41**: 431–438.
- Wang, L., Zhang, X., and Li, Y. (2016b) Degradation of nicosulfuron by a novel isolated bacterial strain *Klebsiella* sp. Y1: condition optimization, kinetics and degradation pathway. *Water Sci. Technol.* **73**: 2896–2903.
- Wang, Y.-S., Liu, J.-C., Chen, W.-C., and Yen, J.-H. (2008) Characterization of acetanilide herbicides degrading bacteria isolated from tea garden soil. *Microb. Ecol.* **55**: 435–443.
- Watanabe, M., Ishidate Jr, M., and Nohmi, T. (1990) Nucleotide sequence of *Salmonella typhimurium* nitroreductase gene. *Nucleic Acids Res.* **18**: 1059.
- Weber, J.B., McKinnon, E.J., and Swain, L.R. (2003) Sorption and mobility of C-14-labeled imazaquin and metolachlor in four soils as influenced by soil properties. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 5752–5759.

- Wen, Y.Z., Yuan, Y.L., Chen, H., Wang, H.L., Liu, H.J., Kang, X.D., and Fu, L.S. (2010) Spectroscopic investigations of the chiral interactions of metolachlor and its (S)-isomer with lipase and phosphatase. *J. Environ. Sci. Health Part B-Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* **45**: 249–253.
- White, P.M., Potter, T.L., and Culbreath, A.K. (2010) Fungicide dissipation and impact on metolachlor aerobic soil degradation and soil microbial dynamics. *Sci. Total Environ.* **408**: 1393–1402.
- Williams, E.M., Little, R.F., Mowday, A.M., Rich, M.H., Chan-Hyams, J.V.E., Copp, J.N., Smaill, J.B., Patterson, A.V., and Ackerley, D.F. (2015) Nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy: insights and advances toward clinical utility. *Biochem. J.* **471**: 131–153.
- Wilson, R.I. and Mabury, S.A. (2000) Photodegradation of metolachlor: Isolation, identification, and quantification of monochloroacetic acid. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 944–950.
- Wolf, M.C. and Moore, P.A. (2002) Effects of the herbicide metolachlor on the perception of chemical stimuli by *Orconectes rusticus*. *J. North Am. Benthol. Soc.* **21**: 457–467.
- WSSA (2007) Herbicide Handbook. 9th ed. Weed Science Society of America, Lawrence, KS.
- Wu, X., Long, Y., Li, J., Li, R., Liu, R., and Li, M. (2015) Degradation of metolachlor in tobacco field soil. *Soil Sediment Contam.* **24**: 398–410.
- Wu, X.M., Li, M., Long, Y.H., Liu, R.X., Yu, Y.L., Fang, H., and Li, S.N. (2011) Effects of adsorption on degradation and bioavailability of metolachlor in soil. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **11**: 83–97.
- Xu, D., Wen, Y., and Wang, K. (2010) Effect of chiral differences of metolachlor and its (S)-isomer on their toxicity to earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **73**: 1925–1931.
- Yang, C., Liu, R., Yuan, Y., Liu, J., Cao, X., Qiao, C., and Song, C. (2013) Construction of a green fluorescent protein (GFP)-marked multifunctional pesticide-degrading bacterium for simultaneous degradation of organophosphates and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane. *J. Agric. Food Chem.* **61**: 1328–1334.
- Yang, C., Song, C., Mulchandani, A., and Qiao, C. (2010) Genetic engineering of *Stenotrophomonas* strain YC-1 to possess a broader substrate range for organophosphates. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 6762–6766.
- Yang, Y., Tao, B., Zhang, W., and Zhang, J. (2008) Isolation and screening of microorganisms capable of degrading nicosulfuron in water. *Front. Agric. China* **2**: 224–228.
- Ye, J., Zhao, M., Liu, J., and Liu, W. (2010) Enantioselectivity in environmental risk assessment of modern chiral pesticides. *Environ. Pollut.* **158**: 2371–2383.
- You, I.-S. and Ghosal, D. (1995) Genetic and molecular analysis of a regulatory region of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetate catabolic plasmid pJP4. *Mol. Microbiol.* **16**: 321–331.
- Youness, M. (2013) Impact de la formulation et du mélange de deux pesticides (mésotrione et tébuconazole) sur leur biodégradation et la croissance de microorganismes. *Thesis DU2378 Univ. Blaise Pascal Clermont-Ferrand Fr.*
- Zablotowicz, R.M., Krutz, L.J., Weaver, M.A., Accinelli, C., and Reddy, K.N. (2008) Glufosinate and ammonium sulfate inhibit atrazine degradation in adapted soils. *Biol. Fertil. Soils* **45**: 19–26.
- Zablotowicz, R.M., Locke, M.A., Hoagland, R.E., Knight, S.S., and Cash, B. (2001) Fluorescent *Pseudomonas* isolates from Mississippi Delta oxbow lakes: In vitro herbicide biotransformations. *Environ. Toxicol.* **16**: 9–19.



- Zemolin, C.R., Avila, L.A., Cassol, G.V., Massey, J.H., and Camargo, E.R. (2014) Environmental fate of S-Metolachlor: a review. *Planta Daninha* **32**: 655–664.
- Zenno, S., Koike, H., Kumar, A.N., Jayaraman, R., Tanokura, M., and Saigo, K. (1996a) Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* major nitroreductase exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a *Vibrio harveyi* flavin oxidoreductase. *J. Bacteriol.* **178**: 4508–4514.
- Zenno, S., Koike, H., Tanokura, M., and Saigo, K. (1996b) Gene cloning, purification, and characterization of NfsB, a minor oxygen-insensitive nitroreductase from *Escherichia coli*, similar in biochemical properties to FRase I, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*. *J. Biochem. (Tokyo)* **120**: 736–744.
- Zenno, S., Saigo, K., Kanoh, H., and Inouye, S. (1994) Identification of the gene encoding the major NAD(P)H-flavin oxidoreductase of the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* ATCC 7744. *J. Bacteriol.* **176**: 3536–3543.
- Zhan, X., Liu, H., Miao, Y., and Liu, W. (2006) A comparative study of rac- and S-metolachlor on some activities and metabolism of silkworm, *Bombyx mori* L. *Pestic. Biochem. Physiol.* **85**: 133–138.
- Zhang, G., Zhang, S., Liu, Y., and Tan, Z. (2011a) Isolation and identification of a nicosulfuron-degrading strain J5-2 and its degradation characteristics. *Environ. Pollut. Control* **5**: 3.
- Zhang, H., Mu, W., Hou, Z., Wu, X., Zhao, W., Zhang, X., Pan, H., and Zhang, S. (2012) Biodegradation of nicosulfuron by the bacterium *Serratia marcescens* N80. *J. Environ. Sci. Health Part B* **47**: 153–160.
- Zhang, J., Zheng, J.-W., Liang, B., Wang, C.-H., Cai, S., Ni, Y.-Y., He, J., and Li, S.-P. (2011b) Biodegradation of chloroacetamide herbicides by *Paracoccus* sp FLY-8 in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **59**: 4614–4621.
- Zhao, W., Wang, C., Xu, L., Zhao, C., Liang, H., and Qiu, L. (2015a) Biodegradation of nicosulfuron by a novel *Alcaligenes faecalis* strain ZWS11. *J. Environ. Sci.* **35**: 151–162.
- Zhao, W., Xu, L., Li, D., Li, X., Wang, C., Zheng, M., Pan, C., and Qiu, L. (2015b) Biodegradation of thifensulfuron-methyl by *Ochrobactrum* sp. in liquid medium and soil. *Biotechnol. Lett.* **37**: 1385–1392.
- Zhou, Y., Liu, W., and Wang, T. (2005) Effects of pesticides metolachlor and S-metolachlor on soil microorganisms in aquisols of Southern China. I. Catalase activity. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* **16**: 895–898.
- Zhou, Y., Liu, W., and Ye, H. (2006) Effects of pesticides metolachlor and S-metolachlor on soil microorganisms in aquisols. II. Soil respiration. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* **17**: 1305–1309.

## **Annexes**



## Annexe I

Article publié dans la revue *Environmental Science and Pollution Research*



# Biotransformation of herbicides by aquatic microbial communities associated to submerged leaves

Louis Carles<sup>1,2,3,4</sup> · Florent Rossi<sup>1,2</sup> · Muriel Joly<sup>1,2</sup> · Pascale Besse-Hoggan<sup>3,4</sup> · Isabelle Batisson<sup>1,2</sup> · Joan Artigas<sup>1,2</sup>

Received: 30 June 2016 / Accepted: 1 November 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

**Abstract** Leaf microbial communities possess a large panel of enzymes permitting the breakdown of leaf polymers as well as the transformation of organic xenobiotic compounds present in stream waters. This study aims to assess the potential of leaf microbial communities, exhibiting different exposure histories to pesticides (upstream versus downstream), to biotransform three maize herbicides (mesotrione, S-metolachlor, and nicosulfuron) in single and cocktail molecule exposures. The results showed a high dissipation of nicosulfuron (sulfonylurea herbicide) (from  $29.1 \pm 10.8\%$  to  $66 \pm 16.2\%$ , day 40) in both single and cocktail exposures, respectively, but not of mesotrione and S-metolachlor. The formation of nicosulfuron metabolites such as ASDM (2-(aminosulfonyl)-N,N-dimethyl-3-pyridinecarboxamide) and ADMP (2-amino-4,6-dimethoxypyrimidine) and the weak sorption ( $<0.4\%$ ) on the leaf matrix confirmed the

transformation of this molecule by leaf microorganisms. In addition, the downstream communities showed a greater ability to transform nicosulfuron than the upstream communities suggesting that the exposure history to pesticides is an important parameter and can enhance the biotransformation potential of leaf microorganisms. After 40-day single exposure to nicosulfuron, the downstream communities were also those experiencing the greatest shifts in fungal and bacterial community diversity suggesting a potential adaptation of microorganisms to this herbicide. Our study emphasizes the importance of leaf microbial communities for herbicide biotransformation in polluted stream ecosystems where fungi could play a crucial role.

**Keywords** Leaf-associated microorganisms · Biodegradation · Mesotrione · Nicosulfuron · S-metolachlor · Herbicide mixture

Isabelle Batisson and Joan Artigas contributed equally to the work

Responsible Editor: Philippe Garrigues

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s11356-016-8035-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Louis Carles  
louis.carles64@gmail.com

<sup>1</sup> CNRS, UMR 6023, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement (LMGE), F-63178 Aubière, France

<sup>2</sup> Clermont Université, LMGE, Université Blaise Pascal-Université d'Auvergne, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>3</sup> CNRS, UMR 6296, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), BP 80026, F-63178 Aubière, France

<sup>4</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, ICCF, F-63000 Clermont-Ferrand, France

## Introduction

Microbial heterotrophic communities in forested streams play a central role in leaf litter decomposition (Kaushik and Hynes 1971) and its conditioning for further consumption by macro-invertebrate shredders (Gessner et al. 2007). Leaf-associated microbial communities are essentially dominated by aquatic hyphomycetes (98.4 to 99.8% of leaf microbial biomass), and to a lesser extent by bacteria (Gulis and Suberkropp 2003), both having the ability to produce extracellular enzymes capable to degrade complex leaf polymers (i.e., cellulose, hemicellulose, lignin) into readily absorbable monomers (Artigas et al. 2011). Fungal extracellular laccases and some peroxidases are involved in lignin degradation from leaf tissues, but can also oxidatively attack organic xenobiotics (Mayer and Staples 2002; Davila-Vazquez et al. 2005; Baldrian 2006).

Apart from extracellular enzymatic oxidation, organic xenobiotics can also be transformed by fungal intracellular enzymes into hydroxylated, methylated, and conjugated degradation products or be mineralized to CO<sub>2</sub> (Junghanns et al. 2005; Augustin et al. 2006; Prenafeta-Boldu et al. 2006; Martin et al. 2009). Up to date, few studies have assessed the ability of aquatic hyphomycetes to metabolize organic xenobiotics (e.g., pesticides) in stream ecosystems (Krauss et al. 2011).

Our study focused on the herbicide cocktail composed by S-metolachlor (chloroacetanilide), mesotrione ( $\beta$ -triketone), and nicosulfuron (sulfonylurea) often used together to ensure maize, alfalfa, and soybean crop yields (Whaley et al. 2006; Joly et al. 2013) and susceptible to reach stream ecosystems and their inhabiting aquatic microbial communities. Indeed, S-metolachlor, mesotrione and nicosulfuron are relatively mobile and bioavailable in soil, as attested by their water solubilities (488, 160, and 7500 mg L<sup>-1</sup>, respectively) and sorption coefficients (1.08 to 9.32 L kg<sup>-1</sup>, 0.13 to 5.0 L kg<sup>-1</sup>, and 0.14 to 2.15 L kg<sup>-1</sup> according to the soil characteristics, respectively) (Oliveira et al. 2001; Dyson et al. 2002; Chaabane et al. 2008; Zemolin et al. 2014; Agritox 2016). The presence of these three herbicides has been detected in French surface waters (SOeS 2013). In 2014, annual pesticide surveys in 84 river sites from the Auvergne's region (Centre France) also revealed that the detection of S-metolachlor (0.9–1.5  $\mu$ g L<sup>-1</sup> in April–May), used as pre-emergence herbicide, tends to be earlier than mesotrione and nicosulfuron (0.03–0.05  $\mu$ g L<sup>-1</sup> in May–June), both used as post-emergence herbicides (Phyt'auvergne 2015).

Some studies have reported the impact of mesotrione (Joly et al. 2012), nicosulfuron (Šantrić et al. 2004; de Oliveira et al. 2009; Karpouzias et al. 2014a, b; Petric et al. 2016), S-metolachlor (Joly et al. 2014) and of the cocktail of these three herbicides (Joly et al. 2015) on the activity, structure, and diversity of soil microbial communities. Concerning the aquatic compartment, the impact of herbicides has been shown toward fishes (Saglio et al. 2003; Kreutz et al. 2008), amphibians (Fort et al. 1999), crayfishes (Cook and Moore 2008), *Daphnia* (Neves et al. 2015), and *Lemna minor* (Aliferis et al. 2009). Some other studies also revealed an impact of mesotrione (Valiente Moro et al. 2012; Ni et al. 2014), nicosulfuron (Seguin et al. 2001; Nélieu et al. 2005) and S-metolachlor (Debenest et al. 2009; Elias and Bernot 2014) on aquatic microbial communities, but no data are available concerning the toxicity of these three herbicides in cocktail toward aquatic microorganisms.

Several microorganisms have shown the potential to biotransform these three compounds separately. Some mesotrione (e.g., *Bacillus* sp. and *Pantoea* sp.) (Durand et al. 2006; Batisson et al. 2009; Pileggi et al. 2012; Youness 2013; Romdhane et al. 2015; Liu et al. 2015), S-metolachlor (e.g. *Klebsiella* sp.) (Martins et al. 2007) and nicosulfuron-

degrading strains (e.g. *Serratia* sp., *Talaromyces* sp. and *Alcaligenes* sp.) (Zhang et al. 2012; Lu et al. 2012; Song et al. 2013; Zhao et al. 2015) have already been isolated from aquatic and terrestrial environments. As a sulfonylurea herbicide, nicosulfuron is removed from soil mainly via microbial activity and chemical hydrolysis, the second way becoming preponderant in acidic soils (Berger and Wolfe 1996; Sarmah and Sabadie 2002). The microbial degradation of pesticides has been mostly associated to the capacity of microorganisms for acquiring alternative nutrient sources (Alexander 1994), such as nitrogen in the case of nicosulfuron (Zhang et al. 2012; Song et al. 2013), but also carbon and/or phosphorus in the case of organophosphorus compounds (e.g., glyphosate) (Singh and Walker 2006). Although nutrient acquisition activities (extracellular enzymes) in leaf-associated microbial communities have been mostly associated to the utilization of leaf polymers (Artigas et al. 2008), it cannot be ruled out that pesticides available in water and/or adsorbed onto the leaf matrix are used by these microorganisms.

The repeated exposure of microbial communities to pesticides has been observed to enhance their pesticide-degradation potential because of microbial acclimation (Topp et al. 1996; Arthur et al. 1997). Shorter acclimation times will be observed when appropriate degradative enzymes are already present in the microbial community, while longer acclimation is expected when development of new traits permitting biodegradation are required (i.e., evolution of catabolic genes by either a relaxation of substrate specificity or inducer specificity of existing enzymes) (van der Meer 1994). Apart from the appropriate enzymatic potential for an effective pesticide biodegradation, other factors such as (i) sub-optimal environmental conditions, (ii) co-metabolism (fortuitous degradation of a pesticide by enzymes generated for other substrate degradation, the pesticide being not used as carbon and energy source for microbial growth), (iii) limited availability of contaminants, (iv) low concentrations of contaminants in the environment, and (v) protozoan predation of degrading microorganisms, can limit biodegradation (Providenti et al. 1993; Liu et al. 2000). However, there is no report of the impact of pesticides (alone or in cocktail) on the biodegradation abilities of microbial communities associated to submerged leaves. In streams, microbial adaptations to pesticide degradation would be naturally expected in downstream sections (close to the watershed outlet) because of the increase of concentration and diversity of herbicide molecules coming from the entire watershed compared to upstream sections (headwaters), as observed in various studies (e.g., Pesce et al. (2010)). The intensity and frequency in which these herbicides are found in stream waters is expected to favor microbial acclimation and enhance their degradation potential.

The present study aimed to assess the capacity of leaf-associated microbial communities to transform and/or degrade three maize herbicides (mesotrione, S-metolachlor, and



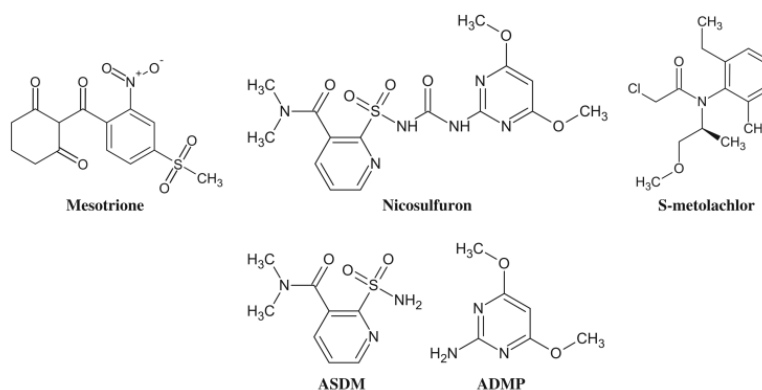
nicosulfuron) often found in streams draining agricultural areas of the Auvergne's region (Phyt'eauvergne 2015). The impact of these molecules on microbial community structure was also investigated. Considering that the three herbicides can be found simultaneously and/or separately in stream waters, our study was designed to compare single versus cocktail molecule exposures. The importance of exposure history to contaminants will also be assessed in the impact (microbial community structure) and biotransformation capacity of upstream versus downstream communities (less and more exposed to contaminants, respectively). Our hypothesis is that the leaf-associated microbial communities with greater exposure history to contaminants, belonging to the downstream site in our study, would present a more resistant microbial structure and greater capacity to biotransform the three maize herbicides.

## Materials and methods

### Chemicals and media

Nicosulfuron (Pestanal, purity 99.6%), mesotrione (Pestanal, purity 99.9%), S-metolachlor (Pestanal, purity 98.4%), and ADMP (2-amino-4,6-dimethoxypyrimidine, purity 98.0%) were purchased from Sigma Aldrich (France), and ASDM (2-(aminosulfonyl)-N,N-dimethyl-3-pyridinecarboxamide, purity 98%) was purchased from J and K Scientific (Germany). The structure of these compounds is described in the Fig. 1. Mineral salt medium (MSM), pH 6.5, was composed of ( $L^{-1}$ ) 1 g  $(NH_4)_2HPO_4$ , 1 g  $KH_2PO_4$ , 1 g  $KNO_3$ , 0.2 g  $MgSO_4$ , 0.1 g  $NaCl$ , 20 mg  $CaCl_2$ , 5 mg  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 mL of a salt stock solution, and 1 mL of a vitamin stock solution. The salt stock solution contained ( $L^{-1}$ ) 20 g boric acid, 18 g  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 2 g  $ZnSO_4$ , 1 g  $CuSO_4$ , 2.5 g  $Na_2MoO_4$ , and 10 mg  $Co(NO_3)_2$ . The vitamin stock solution contained ( $L^{-1}$ ) 2 mg biotin and 5 mg thiamine-HCl.

**Fig. 1.** Structure of the three herbicides studied and the two nicosulfuron metabolites detected (ADMP (2-amino-4,6-dimethoxypyrimidine) and ASDM (2-(aminosulfonyl)-N,N-dimethyl-3-pyridinecarboxamide))

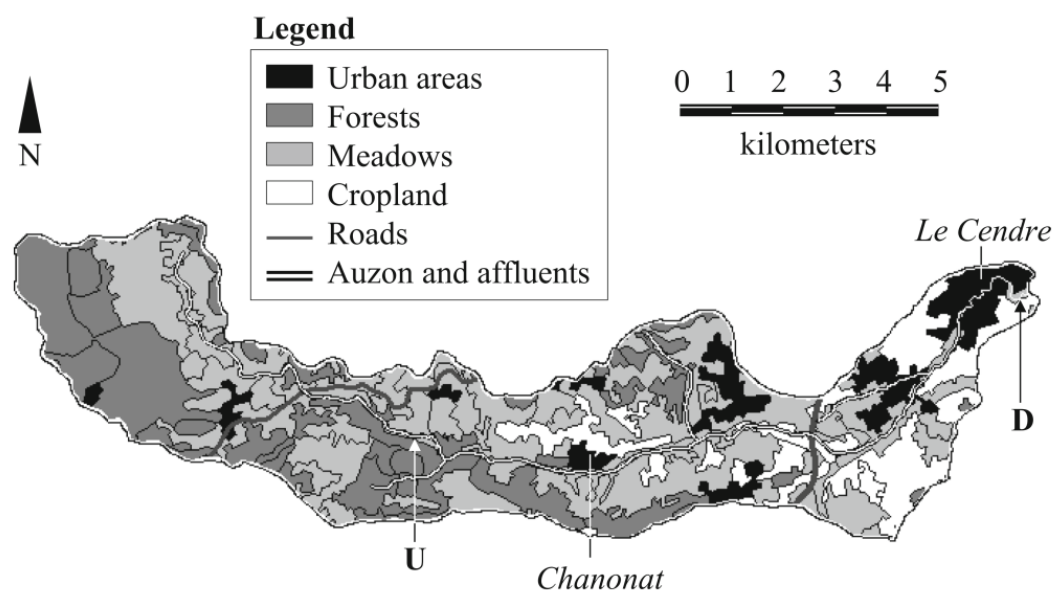


### Microbial communities

Natural microbial communities colonizing *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. leaf species were obtained from the Auzon stream located in the Auvergne's region (Centre France). Leaves of *A. glutinosa* tree species were selected in our experiment since they are a major component of riparian vegetation in the site studied. The Auzon is a fourth-order temperate stream of 18.7 Km in length with a basin surface area of 60.7 Km<sup>2</sup>. Two sites separated by 14.6 Km were selected for *A. glutinosa* leaves colonization during October 2014 (4 weeks), an upstream site (first order) in Chanonat and a downstream in Le Cendre (fourth order) (Fig. 2). In parallel, water samples were taken at weeks 1 and 4 in triplicate from upstream and downstream sites to determine water chemical characteristics (including nutrients, dissolved organic carbon, and pesticide concentrations).

Both sites presented well-developed riparian vegetation composed by alder, ash and hazel tree species and streambeds composed by gravel and cobbles in the most upstream section and sand in the most downstream section. Average discharge, temperature, pH, conductivity, dissolved organic carbon and phosphate concentrations were higher in the downstream site than in the upstream site during microbial community colonization (Table 1, MANOVA,  $P < 0.05$ ). Concerning the pesticide concentrations (Table 1), the herbicide glyphosate and its main degradation product (aminomethylphosphonic acid-AMPA) were present in both sites. However, a large number of herbicide and insecticide molecules were only detected downstream at concentrations ranging 0.13–0.02  $\mu g L^{-1}$ . During our study, the concentrations of mesotrione, S-metolachlor and nicosulfuron were below quantification limits (0.005  $\mu g L^{-1}$  S-metolachlor, 0.01  $\mu g L^{-1}$  nicosulfuron, and mesotrione) of multi residue analyses (Laboratoire de Touraine, France). Nevertheless, historical data on pesticide monitoring in the Auzon stream (period 2012–2013) revealed greater pesticide contamination in the downstream site comparing to the upstream site (SMVVA 2014). Specifically, S-





**Fig. 2.** Map of the Auzon watershed. Upstream (U) and downstream (D) sampling sites are indicated with arrows

metolachlor and nicosulfuron were detected in spring 2014 in the downstream site of the Auzon at  $1.3$  and  $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively (Phyt'eauvergne 2015). Differences in water chemistry between sites converged with strong variations in land use along the stream basin, the upstream section being mostly surrounded by forests and prairies (47% forests, 48% prairies and 5% urban of the basin surface area), and a downstream section essentially devoted to agriculture and urbanization (68% croplands, 17% prairies and 15% urban) (Phyt'eauvergne 2015). Recently fallen *A. glutinosa* leaves from the Auzon's riparian forest were collected and dried at room temperature for 48 h. Six nylon mesh bags (mesh diameter of 0.5 mm) were each filled with 5 grams of dried leaves and immersed to the upstream (three bags corresponding to three replicates) and downstream (three bags) sites. After 4-week colonization, bags containing leaves were retrieved and transported to the laboratory in zip bags at  $4^\circ\text{C}$ .

### Herbicide exposure experiments

We assessed the influence of the (i) study site (upstream versus downstream) and (ii) herbicide (mesotrione, S-metolachlor and nicosulfuron, alone or as a ternary cocktail) on leaves microbial communities structure and their pesticide degradation potential. Each exposure condition was tested in triplicate (24 flasks in total). Flasks were each filled with 25 mL of MSM supplemented (separated or in cocktail) with nominal concentrations of  $25 \text{ mg L}^{-1}$  nicosulfuron,  $25 \text{ mg L}^{-1}$  mesotrione and/or  $35 \text{ mg L}^{-1}$  S-metolachlor, and two leaf disks of 2 cm in diameter directly cut from leaf bags (described above). Herbicide concentrations in our study are

relatively high comparing to those found in streams and rivers, though they were far below  $\text{IC}_{50}$  concentrations ( $\text{mg L}^{-1}$ )

**Table 1.** Physical and chemical water characteristics during the colonization of upstream and downstream leaf-associated microbial communities. The pesticide concentrations (in  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) during the colonization are also represented in the lower part of the table. Values are means ( $n = 12$ ) and standard errors (in parenthesis) of the different descriptors during the 4-week colonization in the Auzon stream

Physicochemical characteristics	Upstream	Downstream
Discharge ( $\text{L s}^{-1}$ )	180 (20.5)	250 (33.6)*
Temperature ( $^\circ\text{C}$ )	6.5 (1.2)	7.9 (0.5)*
pH	7.18 (0.17)	7.94 (0.15)*
Conductivity ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	204.55 (2.77)	552.93 (13.36)*
DOC ( $\text{mg L}^{-1}$ )	14.32 (9.57)	19.71 (8.45)*
Nitrate ( $\text{mg L}^{-1}$ )	2.45 (0.31)	2.67 (0.35)
Phosphate ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0.041 (0.002)	0.065 (0.004)*
Pesticide concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		
AMPA (H)	0.64 (0.56)	0.82 (0.33)
Glyphosate (H)	0.32 (0.07)	0.25 (0.09)
Aminotriazole (H)	–	0.13 (0.03)
Dinoterb (H)	–	0.08 (0.002)
Diuron (H)	–	0.07 (0.01)
Terbutylazine (H)	–	0.05 (0.01)
Mecoprop (H)	–	0.04 (0.003)
Dichloprop (H)	–	0.04 (0.001)
MCPA (H)	–	0.04 (0.01)
Terbumeton (H)	–	0.03 (0.01)
Fipronil (I)	–	0.02 (0.003)
Imidacloprid (I)	–	0.03 (0.005)
Terbutryn (H)	–	0.001 (0.004)

H herbicide, I insecticide

\*Significant differences between sites (MANOVA,  $P < 0.05$ )

described in the literature: S-metolachlor,  $178.4 \pm 22.8$ ; mesotrione,  $43.6 \pm 2.4$ ; and nicosulfuron,  $167.8 \pm 21.8$  (Joly et al. 2013). Three additional flasks per herbicide exposure condition without leaf disks served as abiotic controls.

The flasks were incubated at 28 °C on an orbital shaker at 150 rpm in the darkness to avoid photolysis. The culture media were sampled at days 0, 7, 14, 30 and 40 to determine herbicide degradation (dissipation and/or metabolite production) by HPLC analyses. At the end of the experiment, only nicosulfuron showing significant dissipation was analyzed for adsorption on leaves and for effects on fungal and bacterial community structure.

### Herbicide concentration determination

The quantification of the herbicides in the culture media (dissipation) and adsorbed on leaves (after overnight extraction of one leaf disk in 1 mL of MeOH) was performed by HPLC on an Agilent Series 1100 chromatograph (Courtaboeuf, France). HPLC was equipped with a DAD detector and a reverse phase column (Zorbax Eclipse XDB-C18, 3.5  $\mu\text{m}$ , 75 mm  $\times$  4.6 mm). The mobile phase was composed of acetonitrile (Solvent A) and acidified water ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 0.01% v/v; pH 2.9) (Solvent B) with a flow rate of 1 mL  $\text{min}^{-1}$ , injection volume: 5  $\mu\text{L}$ ,  $\lambda = 220$  and 254 nm. Each sample was analyzed twice. *Mesotrione*: 0–1 min 2%B, 1–8 min 2–70%B, 8–9 min 70–100%B, 9–10 min 100–0%B, 10–11 min 0%B; *Nicosulfuron and metabolites*: 0–2 min 0%B, 2–10 min 0–70%B, 10–11 min 70–100%B, 11–12 min 100–0%B, 12–12.5 min 0%B; *S-Metolachlor*: 0–1 min 2%B, 1–17 min 2–70%B, 17–19 min 70–100%B, 19–21 min 100–2%B, 21–21.5 min 2%B; *Mixture*: 0–5 min 5%B, 5–30 min 5–70%B, 30–32 min 70–100%B, 32–33, 100–5%B; 33–34 min 5%B. The detection limits were 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  for mesotrione, 45  $\mu\text{g L}^{-1}$  for nicosulfuron, and 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  for S-metolachlor. The herbicide dissipation percentages in each biotic condition were calculated by subtracting the dissipation percentage measured in the corresponding abiotic control.

### Analysis of fungal and bacterial communities structure

Genomic DNA from fungal and bacterial communities was extracted from upstream and downstream *A. glutinosa* leaves at the beginning (day 0) and at the end (day 40) of exposure to nicosulfuron in single and cocktail conditions. DNA extraction was performed from one leaf disk per replicate using the Fast DNA SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, USA) following the manufacturer's instructions. Extracted DNA was then amplified by targeting the fungal internal transcribed region (ITS 3 and 4 (White et al. 1990)) and the bacterial 16S rDNA gene (regions V6–V8, (Heuer et al. 1999)) using the primer pairs ITS 3-GC (5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC

GGC CCG CCG CCC CCG CCC CGC ATC GAT GAA GAA - 3') and ITS 4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') for fungi and 968f-GC (5'- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GG G GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC - 3') and 1401r (5'- CGG TGT GTA CAA GGC CC - 3') for bacteria. Polymerase chain reactions (PCR) conditions were: 5 min at 95 °C, followed by 35 steps [30 s at 95 °C, 45 s at 55 °C and 1 min at 72 °C] for fungal communities, and 5 min at 95 °C, followed by 35 steps [45 s at 95 °C, 45 s at 58 °C and 45 s at 72 °C] for bacterial communities. A final elongation step at 72 °C for 7 min for both conditions was performed. The quality of PCR amplicons was checked on 1% (w/v) agarose gel and quantified by spectrophotometry ( $\lambda_{\text{excitation}} = 360$  nm and  $\lambda_{\text{emission}} = 460$  nm) using the DNA quantitation kit, fluorescence assay (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) on fungal and bacterial PCR products were used to assess the structure of microbial communities. A fixed quantity of PCR product (500 ng) was loaded onto 12% (w/v) acrylamide gels containing urea/formamide gradient of 25–48% for fungi and 45–65% for bacteria. Gels were run in 1 $\times$  TAE buffer (pH 8) for 16 h at 59 °C, with a voltage of 90 V (fungi) or 140 V (bacteria), using TTGEK 2401–220 equipment (CBS Scientific, USA). After migration, gels were stained in a bath containing 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Gel Star (Lonza, USA) for 45 min in the dark and digitized using a BioSpectrum® Imaging system™ (UVP, USA). Numerical analysis of digitized gels was performed using Gel ComparII software (Ver. 4.6, Applied Maths, Kortrijk, Belgium) and based on the relative intensity of DNA bands considered as operational taxonomic units (OTUs). The diversity of fungal and bacterial communities was assessed by calculating OTUs richness and diversity (Shannon–Weaver,  $H'$ ) using the Evenness software (MFC Applications, 2007).

### Statistical analyses

The differences in mesotrione, S-metolachlor and nicosulfuron dissipation percentages (single versus cocktail exposures) from upstream and downstream leaf-associated microbial communities were assessed using three-way ANOVA. The sources of variation were estimated for single compound (mesotrione, S-metolachlor, nicosulfuron), mixture of compounds (single versus cocktail) and site (upstream versus downstream) factors, separately, as well as for their interactions. The differences in water physico-chemical characteristics between upstream and downstream sites were assessed using one-way MANOVA. The values were log-transformed prior to ANOVA and MANOVA tests in order to meet assumptions of normality and homogeneity of variances.

Separate post hoc comparisons (Tukey's test,  $P < 0.05$ ) were applied to determine differences in remaining herbicide concentrations between control, upstream and downstream samples, and between sampling times. The statistical analyses were performed using SPSS for Windows Ver 17.0.

Principal component analyses on fungal and bacterial OTUs matrices (square root transformed) were used to reveal ordination trends between microbial communities at the beginning of the experiment (day 0) and after 40 days of exposure to nicosulfuron (single exposure) and to herbicide cocktail (mesotrione + S-metolachlor + nicosulfuron). Post hoc multiple comparisons (Tukey's test,  $P < 0.05$ ) were tested on log-transformed diversity indices (species richness and Shannon-Weaver's diversity) from fungal and bacterial communities, separately, in order to assess for differences between sites and modes of exposure.

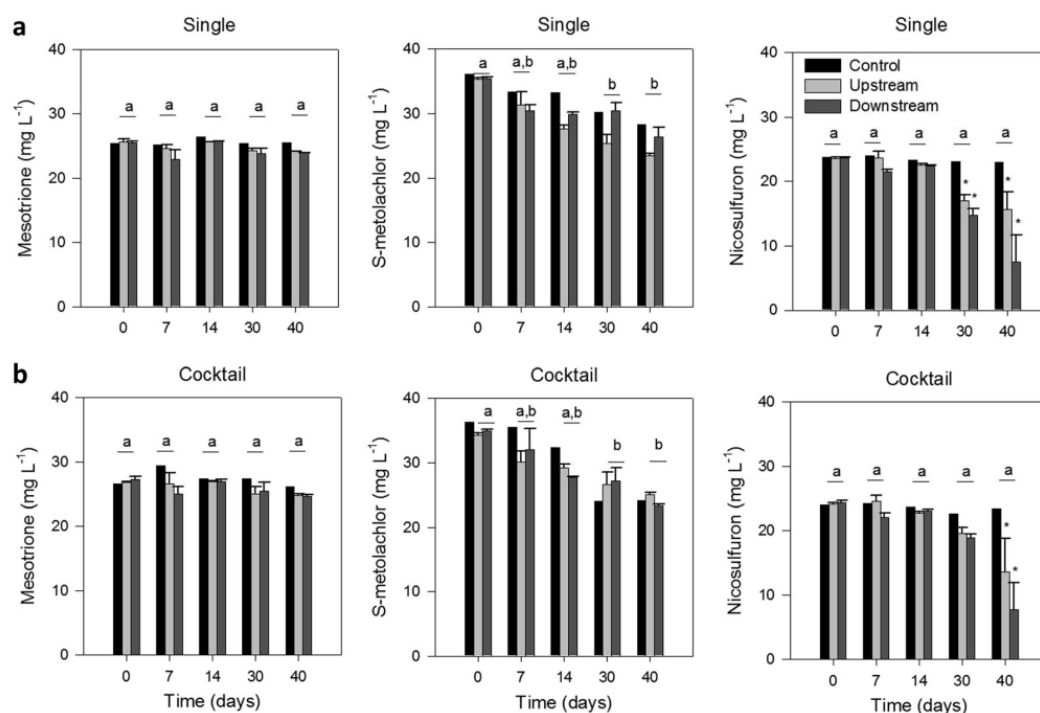
## Results

### Dissipation of herbicides

#### (i) Single herbicide exposure

Leaf-associated microbial communities from upstream and downstream sites, as well as abiotic controls, were exposed separately to mesotrione, S-metolachlor and nicosulfuron. Figure 3a shows the evolution of the herbicide concentration during the incubation of single pesticide. In the abiotic controls, the herbicide concentrations do not change during the 40 days except in the case of S-metolachlor for which a dissipation of  $21.8 \pm 0.9\%$  was observed. This dissipation is probably due to volatilization (Zemolin et al. 2014) since this molecule possesses a relatively high Henry's constant ( $2.2 \cdot 10^{-3} \text{ Pa m}^{-3} \text{ mol}^{-1}$ ). Moreover, a similar dissipation was observed in the presence of microorganisms. In the presence of microbial communities, the dissipation percentages presented in Table 2 are previously corrected by the dissipation measured in abiotic controls.

No significant dissipation of the three molecules was observed after 14 days of exposure (Tukey's test,  $P < 0.05$ ). After a longer time of exposure (30 to 40 days), a significant dissipation of nicosulfuron (ranging from  $29.1 \pm 10.8\%$  (upstream) to  $64.4 \pm 17.4\%$  (downstream) at day 40) was observed in the culture medium containing leaves (Molecule effect, ANOVA,  $P < 0.0001$ ; Tukey's test,  $P < 0.05$ ). No dissipation was observed for mesotrione and as explained above for abiotic controls, the concentration of S-metolachlor tends to decrease



**Fig. 3.** Concentrations of mesotrione, S-metolachlor and nicosulfuron (in  $\text{mg L}^{-1}$ ) in abiotic controls (without leaves), in the culture media of upstream and downstream leaf communities (**a** single and **b** cocktail) during the 40-day experiment. The values are means  $\pm$  standard errors

( $n = 3$ ) of herbicide concentration per condition at days 0, 7, 14, 30 and 40. Significant differences between conditions (in asterisks) and sampling times (in letters  $a > b$ ) are also represented (Tukey's test,  $P < 0.05$ )



**Table 2.** Dissipation percentages (average) and standard errors (in parenthesis) for the three maize herbicides exposed alone or in cocktail in culture medium containing leaf-associated microbial communities from the upstream and downstream sites of the Auzon stream ( $n = 3$ )

Site	Mesotrione		S-metolachlor		Nicosulfuron	
	Single	Cocktail	Single	Cocktail	Single	Cocktail
Upstream	6.1 (1.5)	5.9 (1.2)	11.8 (0.9)	0.6 (0.4)	29.1 (10.8)	40.7 (21.3)
Downstream	6.2 (0.7)	7.7 (0.5)	4.8 (2.4)	0.0 (0.0)	64.4 (17.4)	66 (16.2)

over time irrespectively to the conditions tested (Fig. 3, Table 2), showing no involvement of microbial communities in its dissipation (Molecule effect, ANOVA,  $P < 0.0001$ ; Tukey's test,  $P < 0.05$ ). Moreover, no new peaks on the HPLC chromatograms of samples from mesotrione and S-metolachlor conditions were observed during the incubation, suggesting the absence of metabolite production from these compounds. Conversely, the dissipation of nicosulfuron was significantly different between sites (Site  $\times$  Molecule effect, ANOVA,  $P < 0.05$ ) at day 40, the highest rates being observed in the downstream communities ( $64.4 \pm 17.4\%$  degradation) (Table 2).

(ii) Cocktail herbicide exposure

The exposure of leaf microbial communities to the herbicide cocktail composed of mesotrione, S-metolachlor and nicosulfuron did not modify greatly the dissipation percentages of each molecule (Cocktail effect, ANOVA,  $P = 0.968$ ). Nicosulfuron was the only herbicide exhibiting significant dissipation after 40 days of exposure in cocktails (Fig. 3b, Table 2). Moreover, the nicosulfuron dissipation percentage was again greater in downstream ( $66.0 \pm 16.2\%$ ) than in upstream communities ( $40.7 \pm 21.3\%$ ) though the differences in dissipation between sites are less pronounced for the cocktail (Site  $\times$  Molecule effect, ANOVA,  $P < 0.05$ ).

The nicosulfuron dissipation observed can be due to biodegradation but also to a sorption mechanism on leaves. The proportion of this last process was assessed by extracting nicosulfuron from leaves with methanol at the end of the experiment, after 40-day exposure. No difference was observed between nicosulfuron sorption percentages in single ( $0.36 \pm 0.04\%$  upstream,  $0.24 \pm 0.02\%$  downstream) and cocktail ( $0.18 \pm 0.02\%$  upstream,  $0.25 \pm 0.05\%$  downstream) exposures.

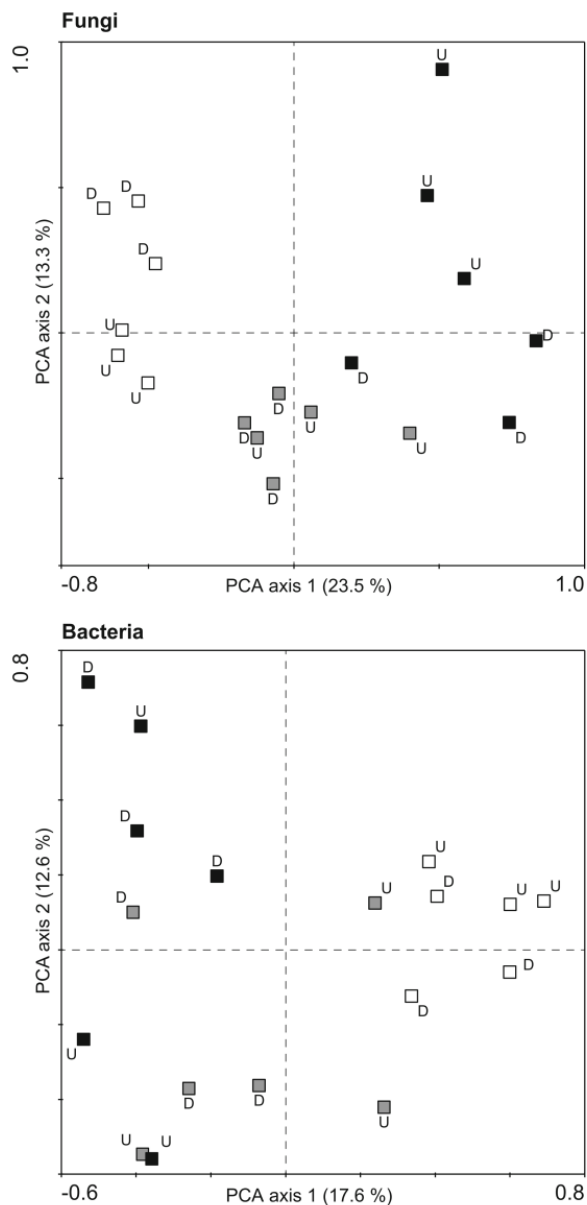
**Degradation of nicosulfuron**

The HPLC chromatograms of samples from both single and cocktail exposures of the leaf-associated microbial communities to nicosulfuron showed the appearance of new peaks during the incubation that could correspond to the production of three metabolites. These peaks are not present in the abiotic

controls. Two of them were assigned as ADMP and ASDM (same retention times and same UV spectra as those obtained with standards), known metabolites coming from hydrolysis of nicosulfuron (Fig. 1). The concentration of ADMP reached  $1.1 \pm 0.6 \text{ mg L}^{-1}$  (upstream),  $3.4 \pm 1.1 \text{ mg L}^{-1}$  (downstream), and  $2.2 \pm 1.3 \text{ mg L}^{-1}$  (upstream),  $3.9 \pm 1.3 \text{ mg L}^{-1}$  (downstream) after 40 days of exposure to nicosulfuron alone and in cocktail, respectively. At the same exposure time, the concentration of ASDM was  $0.3 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$  (upstream),  $0.6 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$  (downstream), and  $0.7 \pm 0.3 \text{ mg L}^{-1}$  (upstream),  $1.2 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$  (downstream) after exposure to nicosulfuron alone and in cocktail, respectively. Overall, the average concentrations of metabolites are greater downstream than upstream, confirming the greater nicosulfuron transformation in the former. The dissipation rate of nicosulfuron and production of ADMP and ASDM were positively correlated as attested by the Pearson correlation coefficients  $r = 0.99$ ,  $P < 0.001$  and  $r = 0.99$ ,  $P < 0.0001$ , respectively (single exposure),  $r = 0.99$ ,  $P < 0.0001$  and  $r = 0.97$ ,  $P < 0.01$ , respectively (cocktail exposure).

**Changes in fungal and bacterial communities' structure**

The effects of nicosulfuron and the herbicide cocktail on leaf-associated microbial communities were investigated. The structure of bacterial communities in *A. glutinosa* leaves was rather similar between upstream and downstream sites at the beginning of the experiment while the fungal ones were different (Fig. 4 and S1). After 40-day exposure to the herbicides, the shifts in microbial community structure were moderate in the case of the single exposure to nicosulfuron and strong in the case of the herbicide cocktail exposure (PC1 Axis explaining 23.5 and 17.6% of the variance in fungal and bacterial communities, respectively; Fig. 4). These shifts were also observed in terms of diversity indices, although the response of fungal and bacterial communities was rather different. While species richness and diversity of fungal communities tend to increase after single and cocktail exposures, the opposite trend was observed in bacterial communities (Tukey's test,  $P < 0.05$ , Table 3). Comparing to microbial communities at day 0, fungal communities increase 1–25 OTUs richness, whereas bacterial communities loss 8–12



**Fig. 4.** Principal component analysis on relative band intensities obtained from fungal (*upper plot*) and bacterial (*lower plot*) communities observed on PCR-DGGE analysis before (day 0, *white square*) and after nicosulfuron-single (*gray square*) and cocktail (*black square*) 40-day exposure. Upstream (*U*) and downstream (*D*) communities are also indicated in the plots

OTUs richness after both single and cocktail exposures to the herbicides.

The site effects were only observed in the structure of fungal communities, and mostly in herbicide cocktail exposure (PC2 Axis explaining 13.3 and 12.6% of the variance in fungal and bacterial communities, respectively; Fig. 4). This site effect was especially evident in the structure of downstream

fungal communities exposed to the herbicide cocktail (Fig. 4). The greatest effects of nicosulfuron (single exposure) were also observed in downstream communities where the highest values of fungal species richness ( $38 \pm 8$  OTUs) and diversity ( $H' = 3.2 \pm 0.1$ ) and the lowest values of bacterial species richness ( $20 \pm 1$  OTUs) and diversity ( $H' = 2.6 \pm 0.1$ ) were recorded (Tukey's test,  $P < 0.05$ , Table 3).

## Discussion

It has been shown for the first time that aquatic microbial communities associated to submerged leaves have the potential to biotransform nicosulfuron (at a very high concentration and in a short time), a herbicide frequently detected in surface (Battaglin et al. 2009; de Lafontaine et al. 2014; Cessna et al. 2015; SOeS 2015) and groundwater (ADES 2016). This is not the case for mesotrione and S-metolachlor. The absence of mesotrione or S-metolachlor biodegradation could be explained by many factors such as (i) the absence of degrading strains, (ii) the sensitivity of degrading strains to the herbicides at the high doses tested, (iii) lag phases  $> 40$  days, or (iv) sub-optimal incubation conditions.

The nicosulfuron dissipation has been attributed to biotransformation processes since adsorption and abiotic degradation were negligible. Moreover, the production of metabolites, such as ADMP and ASDM, coming from hydrolytic reaction, was only observed in the presence of microbial communities, and can be correlated to the disappearance of nicosulfuron. Only 14-day acclimation was required for microbial communities to transform nicosulfuron that corresponds to a rather fast adaptation comparing to some other biological degradation of pesticides described by natural microflora of river water which was characterized by an extended lag phase ranging from 45 to 60 days (El-Dib and Abou-Waly 1998). In the literature, several fungal and bacterial strains, isolated from agricultural and wastewater treatment systems, have been described as able to transform nicosulfuron (Zhang et al. 2012; Lu et al. 2012; Song et al. 2013; Zhao et al. 2015). Although the estimation of the specific contribution of fungi and/or bacteria in nicosulfuron transformation potential is difficult on leaves substratum, the observed increase in fungal species richness and Shannon's diversity and decrease in bacterial community diversity in presence of nicosulfuron would suggest a better adaptation of the former. Indeed, some fungal strains have already been described as nicosulfuron-degraders in waste water treatment plant systems (Lu et al. 2012; Song et al. 2013). Moreover, fungi constitute  $> 90\%$  of microbial biomass in submerged leaves (Hieber and Gessner 2002; Artigas et al. 2012) and possess a large panel of oxidative/hydrolytic enzymes that could participate to pesticide degradation (Baldrian 2006; Artigas et al. 2012). Fungal species associated to submerged

**Table 3.** Species richness and Shannon-Weaver's diversity indices calculated on relative band intensities obtained from PCR-DGGE analysis of fungal and bacterial communities before (day 0) and after (day 40) single exposure to nicosulfuron and to the three-herbicide cocktail. Values are means ( $n = 3$ ) and standard errors (in parenthesis) of diversity indices for the upstream and downstream microbial communities

		Species richness		Shannon-Weaver	
		Fungi	Bacteria	Fungi	Bacteria
Day 0	Upstream	15 (1) <sup>b</sup>	35 (1) <sup>a</sup>	2.1 (0.0) <sup>b</sup>	3.2 (0.0) <sup>a</sup>
Day 40	Upstream single exposure	16 (4) <sup>b</sup>	25 (3) <sup>ab</sup>	2.3 (0.2) <sup>ab</sup>	2.9 (0.1) <sup>ab</sup>
Day 40	Upstream cocktail exposure	24 (4) <sup>ab</sup>	23 (1) <sup>b</sup>	2.7 (0.2) <sup>ab</sup>	2.8 (0.1) <sup>ab</sup>
Day 0	Downstream	13 (2) <sup>b</sup>	28 (1) <sup>ab</sup>	2.1 (0.2) <sup>b</sup>	3.0 (0.1) <sup>ab</sup>
Day 40	Downstream single exposure	38 (8) <sup>a</sup>	20 (1) <sup>b</sup>	3.2 (0.1) <sup>a</sup>	2.6 (0.1) <sup>a</sup>
Day 40	Downstream cocktail exposure	22 (5) <sup>ab</sup>	24 (3) <sup>b</sup>	2.7 (0.2) <sup>ab</sup>	2.8 (0.2) <sup>ab</sup>

Significant differences between conditions are indicated by letters in superscript ( $a > b$ , Tukey's test,  $P < 0.05$ )

leaves could therefore be mostly responsible for the transformation of nicosulfuron. However, the degradation potential of nicosulfuron by fungi described in our study is probably time- and site-specific. Therefore, integrating the influence of environmental conditions (including seasonality, leaf species, sites) will permit to assess the variability of nicosulfuron transformation potential by leaf-associated microbial communities in contaminated streams.

The exposure history of aquatic microbial communities to pesticides (e.g., diuron) and/or metals (e.g., zinc) has been observed to increase their tolerance (Pesce et al. 2010; Tlili et al. 2011). This acquisition of tolerance can be explained by (i) the physiological acclimation during the exposure to a toxicant and/or (ii) the genetic adaptation in populations exposed over generations to a toxic contaminant (Amiard-Triquet et al. 2011). Our study showed that downstream leaf-associated microbial communities (historically exposed to nicosulfuron) exhibit greater transformation potential of nicosulfuron than upstream communities (less polluted site) even if these microbial communities were not exposed to nicosulfuron during colonization experiments (Table 1). It could be also hypothesized that other pesticide molecules with similar degradation pathways (i.e., organophosphorus hydrolysis (Singh and Walker 2006)), and present in stream water during leaves colonization, would promote the enzymatic machinery necessary to transform nicosulfuron. However, this hypothesis remains to be tested.

Single and cocktail exposure of leaf-associated microbial communities to herbicides did not alter biotransformation potential of nicosulfuron although the concentration of the three herbicides in cocktail was high. However, a stronger impact of the cocktail was observed on the microbial community structure (especially fungi). From a functional point of view, similar nicosulfuron dissipation percentages were observed with different fungal community structures (i.e., single versus cocktail exposures in downstream communities), suggesting a certain functional redundancy (Allison and Martiny 2008; Dopheide et al. 2015). However, this functional redundancy

on nicosulfuron transformation was less evident in bacterial communities. Common pesticide degradation pathways have been described for different microbial strains (including fungi and bacteria) which also suggest functional redundancy for pesticide biotransformation (Lu et al. 2012; Song et al. 2013; Sviridov et al. 2015). Besides, the absence of cocktail effects on nicosulfuron transformation potential also reflects the ability of degrading communities to tolerate the other molecules of the cocktail, even at the high concentrations tested. It could also be assumed that S-metolachlor and mesotrione had no effect (inhibition or induction) on microbial capacities to degrade nicosulfuron.

### Conclusion

The present study showed the biotransformation potential of leaf-associated microbial communities for the herbicide nicosulfuron (alone or in cocktail with S-metolachlor and mesotrione). This transformation could be explained by the supply of organic carbon from leaf litter which supports the development of fungal and bacterial communities and prompts microbial co-metabolism of nicosulfuron. This ability was enhanced in the downstream sites, exhibiting greater exposure history to pesticides, and reflecting greater microbial acclimation. The shifts in fungal and bacterial community diversity in response to nicosulfuron exposure were different between single and cocktail exposure.

Nevertheless, leaves are ephemeral/transient substrates in river ecosystems (mostly associated to seasonality) suggesting a discontinuous contribution of these microbial communities able to transform nicosulfuron. Further studies are thus required to better assess the effect of herbicide concentration, environmental factors (i.e., temperature, nutrients, leaf species) and biological interactions (i.e., protozoans) in microbial potential to transform nicosulfuron. Understanding the ecology of leaf-associated microbial communities (i.e., the potential



use of herbicides as additional nutrient sources) can improve assessment of the fate of pesticides in contaminated streams.

**Acknowledgements** This project has been funded by the project EcoBioPest (Agence de l'Eau Loire-Bretagne), the Région Auvergne, the French Ministry for Higher Education and Research and the European Regional Development Fund.

#### Compliance with ethical standards

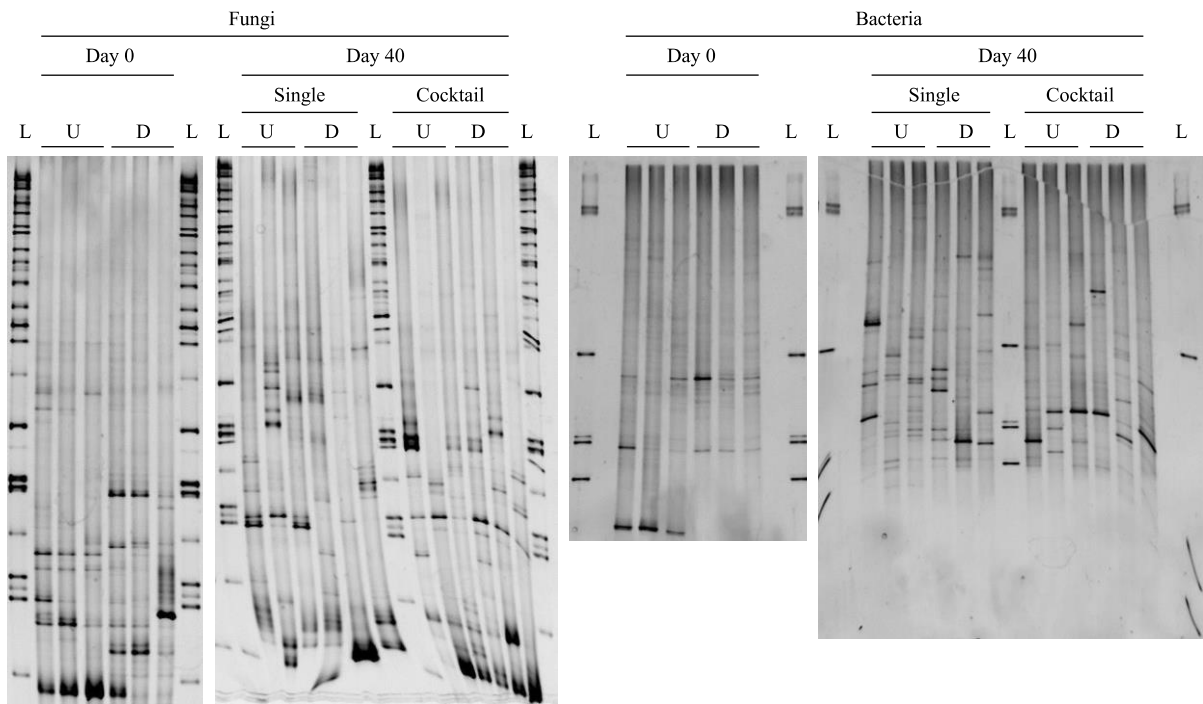
**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- ADES (2016) Portail national d'accès aux données sur les eaux souterraines. <http://www.ades.eaufrance.fr/ExportData.aspx?paramFrance=ok>. Accessed 8 Feb 2016
- Agritox (2016) Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques. <http://www.agritox.anses.fr/php/sa.php?sa=1104>. Accessed 3 Feb 2016
- Alexander M (1994) Growth-linked biodegradation. In: Biodegradation and bioremediation. Academic Press, pp 8–15
- Aliferis KA, Materzok S, Pazioutou GN, Chrysai-Tokousbalides M (2009) *Lemma minor* L. as a model organism for ecotoxicological studies performing  $^1\text{H}$  NMR fingerprinting. *Chemosphere* 76:967–973
- Allison SD, Martiny JB (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci* 105:11512–11519
- Amiard-Triquet C, Rainbow PS, Romeo M (2011) Tolerance to environmental contaminants. CRC Press
- Arthur EL, Anhalt JC, Anderson TA, Coats JR (1997) Enhanced degradation of deethylatrazine in an atrazine-history soil of Iowa 1. *J Environ Sci Health Part B* 32:599–620
- Artigas J, Romani AM, Sabater S (2008) Relating nutrient molar ratios of microbial attached communities to organic matter utilization in a forested stream. *Fundam Appl Limnol Für Hydrobiol* 173:255–264
- Artigas J, Gaudes A, Munoz I et al (2011) Fungal and bacterial colonization of submerged leaf litter in a Mediterranean stream. *Int Rev Hydrobiol* 96:221–234
- Artigas J, Majerholc J, Foulquier A et al (2012) Effects of the fungicide tebuconazole on microbial capacities for litter breakdown in streams. *Aquat Toxicol* 122:197–205
- Augustin T, Schlosser D, Baumbach R et al (2006) Biotransformation of 1-naphthol by a strictly aquatic fungus. *Curr Microbiol* 52:216–220
- Baldrian P (2006) Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* 30:215–242
- Batisson I, Crouzet O, Besse-Hoggan P et al (2009) Isolation and characterization of mesotriene-degrading *Bacillus* sp. from soil. *Environ Pollut* 157:1195–1201
- Battaglin WA, Rice KC, Focazio MJ et al (2009) The occurrence of glyphosate, atrazine, and other pesticides in vernal pools and adjacent streams in Washington, DC, Maryland, Iowa, and Wyoming, 2005–2006. *Environ Monit Assess* 155:281–307
- Berger BM, Wolfe NL (1996) Hydrolysis and biodegradation of sulfonyleurea herbicides in aqueous buffers and anaerobic water-sediment systems: assessing fate pathways using molecular descriptors. *Environ Toxicol Chem* 15:1500–1507
- Cessna AJ, Donald DB, Bailey J, Waiser M (2015) Persistence of the sulfonyleurea herbicides sulfosulfuron, rimsulfuron, and nicosulfuron in farm dugouts (ponds). *J Environ Qual* 44:1948–1955
- Chaabane H, Vulliet E, Calvayrac C et al (2008) Behaviour of sulcotriene and mesotriene in two soils. *Pest Manag Sci* 64:86–93
- Cook ME, Moore PA (2008) The effects of the herbicide metolachlor on agonistic behavior in the crayfish, *Orconectes rusticus*. *Arch Environ Contam Toxicol* 55:94–102
- Davila-Vazquez G, Tinoco R, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R (2005) Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Enzym Microb Technol* 36:223–231
- de Lafontaine Y, Beauvais C, Cessna AJ et al (2014) Sulfonyleurea herbicides in an agricultural catchment basin and its adjacent wetland in the St. Lawrence River basin. *Sci Total Environ* 479:1–10
- de Oliveira TA, dos Santos JB, Camelo GN et al (2009) Effect of sequential nicosulfuron and chlorpyrifos application on seed bank and soil microbial characteristics. *Rev Bras Ciênc Solo* 33:563–570
- Debenest T, Pinelli E, Coste M et al (2009) Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. *Aquat Toxicol* 93: 11–17
- Dopheide A, Lear G, He Z et al (2015) Functional gene composition, diversity and redundancy in microbial stream biofilm communities. *PLoS One* 10:e0123179
- Durand S, Amato P, Sancelme M et al (2006) First isolation and characterization of a bacterial strain that biotransforms the herbicide mesotriene. *Lett Appl Microbiol* 43:222–228
- Dyson JS, Beulke S, Brown CD, Lane MCG (2002) Adsorption and degradation of the weak acid mesotriene in soil and environmental fate implications. *J Environ Qual* 31:613–618
- El-Dib MA, Abou-Waly HF (1998) Biodegradation of some triazines and phenylureas in surface waters. *Water Res* 32:1881–1887
- Elias D, Bernot MJ (2014) Effects of atrazine, metolachlor, carbaryl and chlorothalonil on benthic microbes and their nutrient dynamics. *PLoS One* 9:e109190
- Fort DJ, Rogers R, Copley H et al (1999) Effect of sulfometuron methyl and nicosulfuron on development and metamorphosis in *Xenopus laevis*: impact of purity. *Environ Toxicol Chem* 18:2934–2940
- Gessner MO, Gulis V, Kuehn KA et al (2007) Fungal decomposers of plant litter in aquatic ecosystems. *Environ Microb Relatsh* 4:301–324
- Gulis V, Suberkropp K (2003) Effect of inorganic nutrients on relative contributions of fungi and bacteria to carbon flow from submerged decomposing leaf litter. *Microb Ecol* 45:11–19
- Heuer H, Hartung K, Wieland G et al (1999) Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Appl Environ Microbiol* 65:1045–1049
- Hieber M, Gessner MO (2002) Contribution of stream detritivores, fungi, and bacteria to leaf breakdown based on biomass estimates. *Ecology* 83:1026–1038
- Joly P, Besse-Hoggan P, Bonnemoy F et al (2012) Impact of maize formulated herbicides mesotriene and S-metolachlor, applied alone and in mixture, on soil microbial communities. *ISRN Ecol* 2012:1–9
- Joly P, Bonnemoy F, Charvy J-C et al (2013) Toxicity assessment of the maize herbicides S-metolachlor, benoxacor, mesotriene and nicosulfuron, and their corresponding commercial formulations, alone and in mixtures, using the Microtox® test. *Chemosphere* 93(10):2444–2450
- Joly P, Misson B, Perrière F et al (2014) Soil surface colonization by phototrophic indigenous organisms, in two contrasted soils treated by formulated maize herbicide mixtures. *Ecotoxicology* 23:1648–1658
- Joly P, Bonnemoy F, Besse-Hoggan P et al (2015) Responses of limagne “clay/organic matter-rich” soil microbial communities to realistic formulated herbicide mixtures, including S-metolachlor, mesotriene, and nicosulfuron. *Water Air Soil Pollut* 226:1–15

- Junghanns C, Moeder M, Krauss G et al (2005) Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology* 151:45–57
- Karpouzias DG, Kandeler E, Bru D et al (2014a) A tiered assessment approach based on standardized methods to estimate the impact of nicosulfuron on the abundance and function of the soil microbial community. *Soil Biol Biochem* 75:282–291
- Karpouzias DG, Papadopoulou E, Ipsilantis I et al (2014b) Effects of nicosulfuron on the abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi used as indicators of pesticide soil microbial toxicity. *Ecol Indic* 39:44–53
- Kaushik NKK, Hynes HBN (1971) Fate of the dead leaves that fall into streams. *Arch Hydrobiol* 68:465–515
- Krauss G-J, Solé M, Krauss G et al (2011) Fungi in freshwaters: ecology, physiology and biochemical potential. *FEMS Microbiol Rev* 35: 620–651
- Kreutz LC, Barcellos LJJ, Silva TO et al (2008) Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. *Ciênc Rural* 38:1050–1055
- Liu D, Maguire RJ, Lau YL et al (2000) Factors affecting chemical biodegradation. *Environ Toxicol* 15:476–483
- Liu J, Chen S, Ding J et al (2015) Sugar cane bagasse as support for immobilization of *Bacillus pumilus* HZ-2 and its use in bioremediation of mesotriene-contaminated soils. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:10839–10851
- Lu XH, Kang ZH, Tao B et al (2012) Degradation of nicosulfuron by *Bacillus subtilis* YB1 and *Aspergillus niger* YF1. *Appl Biochem Microbiol* 48:460–466
- Martin C, Corvini PF, Vinken R et al (2009) Quantification of the influence of extracellular laccase and intracellular reactions on the isomer-specific biotransformation of the xenoestrogen technical nonylphenol by the aquatic hyphomycete *Clavariopsis aquatica*. *Appl Environ Microbiol* 75:4398–4409
- Martins PF, Martinez CO, de Carvalho G et al (2007) Selection of microorganisms degrading S-metolachlor herbicide. *Braz Arch Biol Technol* 50:153–159
- Mayer AM, Staples RC (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60:551–565
- Nélieu S, Perreau F, Guichon R et al (2005) Monitoring and effects of nicosulfuron in aquatic mesocosms: development of a simple analytical procedure and evidence for low toxicity to phytoplankton communities. *Anal Bioanal Chem* 382:108–114
- Neves M, Castro BB, Vidal T et al (2015) Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecol Indic* 53:220–230
- Ni Y, Lai J, Wan J, Chen L (2014) Photosynthetic responses and accumulation of mesotriene in two freshwater algae. *Environ Sci Process Impacts* 16:2288–2294
- Oliveira RS, Koskinen WC, Ferreira FA (2001) Sorption and leaching potential of herbicides on Brazilian soils. *Weed Res* 41:97–110
- Pesce S, Margoum C, Montuelle B (2010) *In situ* relationships between spatio-temporal variations in diuron concentrations and phototrophic biofilm tolerance in a contaminated river. *Water Res* 44:1941–1949
- Petric I, Karpouzias DG, Bru D et al (2016) Nicosulfuron application in agricultural soils drives the selection towards NS-tolerant microorganisms harboring various levels of sensitivity to nicosulfuron. *Environ Sci Pollut Res* 23:4320–4333
- Phyt'auvergne (2015) Groupe régional d'action contre les pollutions par les produits phytosanitaires. [http://www.fredon-auvergne.fr/phyteauvergne/carto\\_web/Fiche\\_ESU/Auzon\\_fiche.html](http://www.fredon-auvergne.fr/phyteauvergne/carto_web/Fiche_ESU/Auzon_fiche.html). Accessed 11 Dec 2015
- Pileggi M, Pileggi SAV, Olchanheski LR et al (2012) Isolation of mesotriene-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil. *Chemosphere* 86:1127–1132
- Prenafeta-Boldu FX, Summerbell R, De Hoog GS (2006) Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? *FEMS Microbiol Rev* 30:109–130
- Providenti MA, Lee H, Trevors JT (1993) Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *J Ind Microbiol* 12:379–395
- Romdhane S, Devers-Lamrani M, Martin-Laurent F et al (2015) Isolation and characterization of *Bradyrhizobium* sp. SR1 degrading two  $\beta$ -triketone herbicides. *Environ Sci Pollut Res* 23:4138–4148
- Saglio P, Bretaud S, Rivot E, Olsén KH (2003) Chemobehavioral changes induced by short-term exposures to prochloraz, nicosulfuron, and carbofuran in goldfish. *Arch Environ Contam Toxicol* 45:515–524
- Šantrčić L, Radivojević L, Stanković-Kalezić R, Đorđević S (2004) Microbiological activity of soil treated with nicosulfuron. *Pestic Fitomedicina* 19:55–60
- Sarmah AK, Sabadie J (2002) Hydrolysis of sulfonylurea herbicides in soils and aqueous solutions: a review. *J Agric Food Chem* 50:6253–6265
- Seguin F, Leboulanger C, Rimet F et al (2001) Effects of atrazine and nicosulfuron on phytoplankton in systems of increasing complexity. *Arch Environ Contam Toxicol* 40:198–208
- Singh BK, Walker A (2006) Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol Rev* 30:428–471
- SMVVA (2014) Contrat territorial de la vallée de l'Auzon - Bilan imparcours. 39–43
- SOeS (2013) Ministère de l'environnement, de l'énergie et de la mer. <http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/lessentiel/ar/246/211/contamination-globale-cours-deau-pesticides.html>. Accessed 27 Mar 2016
- SOeS (2015) Liste des pesticides recherchés dans les cours d'eau de France métropolitaine en 2013. [www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/fileadmin/documents/Produits\\_editoriaux/L\\_essentiel\\_sur/Environnement/Eau/Les\\_pesticides\\_dans\\_les\\_eaux/2016/pesticides1c-2016-b.xls](http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/fileadmin/documents/Produits_editoriaux/L_essentiel_sur/Environnement/Eau/Les_pesticides_dans_les_eaux/2016/pesticides1c-2016-b.xls). Accessed 20 May 2016
- Song J, Gu J, Zhai Y et al (2013) Biodegradation of nicosulfuron by a *Talaromyces flavus* LZM1. *Bioresour Technol* 140:243–248
- Sviridov AV, Shushkova TV, Ermakova IT et al (2015) Microbial degradation of glyphosate herbicides (review). *Appl Biochem Microbiol* 51:188–195
- Tlili A, Corcoll N, Bonet B et al (2011) *In situ* spatio-temporal changes in pollution-induced community tolerance to zinc in autotrophic and heterotrophic biofilm communities. *Ecotoxicology* 20:1823–1839
- Topp E, Tessier L, Gregorich EG (1996) Dairy manure incorporation stimulates rapid atrazine mineralization in an agricultural soil. *Can J Soil Sci* 76:403–409
- Valiente Moro C, Bricheux G, Portelli C, Bohatier J (2012) Comparative effects of the herbicides chlortoluron and mesotriene on freshwater microalgae. *Environ Toxicol Chem* 31:778–786
- van der Meer JR (1994) Genetic adaptation of bacteria to chlorinated aromatic compounds. *FEMS Microbiol Rev* 15:239–249
- Whaley CM, Armel GR, Wilson HP, Hines TE (2006) Comparison of mesotriene combinations with standard weed control programs in corn. *Weed Technol* 20:605–611
- White TJ, Bruns T, Lee S et al (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protoc Guide Methods Appl* 18:315–322
- Youness M (2013) Impact de la formulation et du mélange de deux pesticides (mésotriene et tébuconazole) sur leur biodégradation et la croissance de microorganismes. Thesis, DU2378, University Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France
- Zemolin CR, Avila LA, Cassol GV et al (2014) Environmental fate of S-metolachlor: a review. *Planta Daninha* 32:655–664
- Zhang H, Mu W, Hou Z et al (2012) Biodegradation of nicosulfuron by the bacterium *Serratia marcescens* N80. *J Environ Sci Health Part B* 47:153–160
- Zhao W, Wang C, Xu L et al (2015) Biodegradation of nicosulfuron by a novel *Alcaligenes faecalis* strain ZWS11. *J Environ Sci* 35:151–162





**Fig. S1.** Fungal and bacterial community structures analysed by DGGE with the fungal internal transcribed region (ITS 3 and 4) and the bacterial 16S rDNA gene (regions V6-V8), respectively, at Day 0 and at the end of the experiment (Day 40). Microbial communities exposed to nicosulfuron alone (Single) or nicosulfuron + mesotrione + S-metolachlor (Cocktail). U, upstream site, D, downstream site. L: ladder (Hyper ladder I + II (Fungi) or I (Bacteria), Bioline).

## Annexe II

Article publié dans la revue *Environmental Pollution*





Contents lists available at ScienceDirect

## Environmental Pollution

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/envpol](http://www.elsevier.com/locate/envpol)

## How the edaphic *Bacillus megaterium* strain Mes11 adapts its metabolism to the herbicide mesotrione pressure



Corinne Bardot<sup>a, b</sup>, Pascale Besse-Hoggan<sup>c, d</sup>, Louis Carles<sup>a, b</sup>, Morgane Le Gall<sup>e, f</sup>,  
 Guilhem Clary<sup>e, f</sup>, Philippe Chafey<sup>e, f</sup>, Christian Federici<sup>e, f</sup>, Cédric Broussard<sup>e, f</sup>,  
 Isabelle Batisson<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, LMGE, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup> CNRS, UMR 6023, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, F-63177 Aubière, France

<sup>c</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, ICCF, F-63000 Clermont Ferrand, France

<sup>d</sup> CNRS, UMR 6296, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 80026, F-63171 Aubière Cedex, France

<sup>e</sup> Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR 8104, Université Paris Descartes, Paris, France

<sup>f</sup> Plate-forme Protéomique 3PS, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 28 July 2014

Received in revised form

23 December 2014

Accepted 24 January 2015

Available online

## Keywords:

Physiological responses

Differential proteomic

2D-DIGE

Pesticides

Soil bacteria

## ABSTRACT

Toxicity of pesticides towards microorganisms can have a major impact on ecosystem function. Nevertheless, some microorganisms are able to respond quickly to this stress by degrading these molecules. The edaphic *Bacillus megaterium* strain Mes11 can degrade the herbicide mesotrione. In order to gain insight into the cellular response involved, the intracellular proteome of Mes11 exposed to mesotrione was analyzed using the two-dimensional differential in-gel electrophoresis (2D-DIGE) approach coupled with mass spectrometry. The results showed an average of 1820 protein spots being detected. The gel profile analyses revealed 32 protein spots whose abundance is modified after treatment with mesotrione. Twenty spots could be identified, leading to 17 non redundant proteins, mainly involved in stress, metabolic and storage mechanisms. These findings clarify the pathways used by *B. megaterium* strain Mes11 to resist and adapt to the presence of mesotrione.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

In their natural habitat, microorganisms have to cope with a variety of toxic and antimicrobial compounds released by natural processes, industrial contaminations or agricultural inputs. To survive in these ecosystems, cells are able to respond quickly to a precise environmental stimulus by the expression of specific proteins that are involved in detoxification, adaptation to the stressor or repair of cellular damage. Among the xenobiotic compounds encountered in soil, pesticides have been shown to elicit toxic effects. Although transformations of such compounds and their specific toxic effects on biological systems have been studied extensively (Bunemann et al., 2006; Damalas and Eleftherohorinos, 2011), their possible activities on the whole metabolism of the organisms involved in the degradation of these molecules have not been studied so far.

Two-dimensional (2D) electrophoresis proteomic approaches have been used to address physiological issues towards contaminant stress responses (Hecker et al., 2008). To gain deeper insight the resolution of the protein analyses, a two-dimensional differential in-gel electrophoresis (2D-DIGE) approach was developed but was mainly used in the medical field until now (Marouga et al., 2005) and only a few applications in environment were reported despite the benefit of this method in the understanding of microbial metabolisms under stress exposure (Maaty et al., 2009; Gallo et al., 2012; Missous et al., 2012).

We focused our work on mesotrione, a selective herbicide belonging to the triketone family used in maize cultures. Mesotrione, chemically derived from a natural phytotoxin produced by the bottlebrush plant *Callistemon citrinus* (Mitchell et al., 2001), was developed to minimize adverse effects on the environment. Since mesotrione was marketed in 2003, few microorganisms have been reported to catabolize it (Durand et al., 2006; Batisson et al., 2009; Pileggi et al., 2012; Olchanheski et al., 2014). The detailed biodegradative pathway of mesotrione was only established with some of these microorganisms (Durand et al., 2010; Pileggi et al.,

\* Corresponding author. CNRS, UMR 6023, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, F-63177 Aubière, France.

E-mail address: [isabelle.batisson@univ-bpclermont.fr](mailto:isabelle.batisson@univ-bpclermont.fr) (I. Batisson).

2012). *Bacillus megaterium* strain Mes11, isolated from soil, was able to completely and rapidly biotransform mesotrione leading to the accumulation of 2-amino-4-methylsulfonylbenzoic acid (AMBA) in the culture medium as the final product (Batisson et al., 2009). A new hitherto unidentified intermediate metabolite was also highlighted. Furthermore, several other *Bacillus* strains which biotransform mesotrione have been isolated from soil (data not shown), suggesting that these strains are able to adapt their metabolism to respond to mesotrione pressure. Thus, the members of this genus could fulfill a crucial role in mesotrione degradation in the natural environment. However, very scarce information exists on overall physiological response of bacteria exposed to applications of mesotrione and on microbial catabolic genes and enzymes involved in mesotrione degradation (Olchanheski et al., 2014).

In this study, we have chosen to use the high resolution 2D-DIGE approach to answer to this question by characterizing the proteomic responses of the mesotrione-degrading *B. megaterium* strain Mes11 isolated from soil (Batisson et al., 2009) as a reference strain adapted to mesotrione exposure.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Chemicals, bacterial strain and cultivation conditions

Mesotrione was purchased from Sigma (Fluka, PESTANAL<sup>®</sup>, analytical standard). The pure standards AMBA and MNBA were graciously provided by Syngenta Crop Protection. Mesotrione was diluted in Volvic<sup>®</sup> mineral water (1 mM) and the pH of the solution was adjusted to 7. The solution was filtered onto 0.1 µm pore-size Millex Filter Units (DURAPORE (PVDF) filters, Millipore) before being used as the culture medium for degradation tests.

To ensure enough bacterial biomass and protein amounts, the edaphic *B. megaterium* strain Mes11 (Batisson et al., 2009) was first cultivated in 500 mL of tryptic-soy broth (Fluka<sup>®</sup>) in 1 L flasks overnight at 30 °C under orbital agitation (200 rpm). Cells were centrifuged (4500 × g, 10 min, 4 °C) and pellet was washed once with NaCl solution (8 g L<sup>-1</sup>) and once with Tris/HCl 50 mM pH 7. Resting cells were resuspended in 70 mL of Volvic<sup>®</sup> mineral water (control culture = C) or 1 mM mesotrione solution (mesotrione treated culture = M) and were incubated at 28 °C under agitation (200 rpm) and dark conditions. Samples (1 mL for biodegradation experiments and 15 mL for protein extractions) were taken directly from the *B. megaterium* resting-cells suspension at T 0, 3, 5, 9 and 24 h.

Abundance, viability and activity of cells were measured by flow cytometry, plating on LB plates and ATP measurements (Amato and Christner, 2009), respectively. Three independent cultures were carried out.

### 2.2. Kinetics and metabolic pathway of mesotrione degradation by the *B. megaterium* strain

The different samples taken regularly from the *B. megaterium* resting-cells suspension were centrifuged at 10,000 × g for 5 min. The supernatants were frozen until HPLC and NMR analyses. The HPLC analyses were performed as already described and allowed mesotrione quantification (Batisson et al., 2009).

The metabolites present in the combined supernatant of the 3 cultures were quantified by <sup>1</sup>H NMR performed at 25 °C at 500 MHz on an Avance 500 Bruker spectrometer (Bruker Biospin, Wissembourg, France) equipped with a triple-resonance (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N) inverse probe with 5-mm-diameter tubes containing 600 µL of sample (540 µL of sample and 60 µL of a 5 mM TSP-d<sub>4</sub> solution in D<sub>2</sub>O), with water being suppressed by a classical two phase-shifted pulse saturation sequence according to (Durand et al., 2010). TSP-d<sub>4</sub>

constituted a reference for chemical shifts (0 ppm) and quantification. The metabolite concentration was calculated as follows:  $[m] = (9A_0 \times [TSPd_4]) / (b \times A_{ref}) \times 1.1$ , where  $[m]$  is the concentration of metabolite m,  $A_0$  is the area of metabolite m resonance in the <sup>1</sup>H NMR spectrum  $[TSPd_4]$  is the concentration of the reference,  $A_{ref}$  is the area of reference resonance in the <sup>1</sup>H NMR spectrum, b is the number of protons of metabolite m in the signal integrated, and 9 is the number of protons resonating at 0 ppm. The factor of 1.1 corresponds to the dilution factor of the supernatant with the solution of TSP-d<sub>4</sub>.

### 2.3. Preparation of intracellular protein samples

The samples taken regularly from the *B. megaterium* resting-cells suspension were centrifuged (4500 × g, 10 min, 4 °C). Pellets were resuspended in 5 mL of UTC lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 50 mM DTT, 4% (w/v) CHAPS) with a protease inhibitors cocktail (Complete Mini EDTA-free tablets, Roche Applied Science). Cell suspensions were passed through a One Shot Cell disrupter (Constants Systems LTD) 3 times under 2.6 KBar pressure. Cell debris were eliminated by centrifugation (20,000 × g, 1 h, 4 °C). Supernatants were treated with 2D Clean-Up kit (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. The resultant dry pellets were resuspended into UTC lysis buffer without DTT, and the pH was set to 8.5 with 1.5 M Tris-base. Homogenates were centrifuged (20,000 × g, 15 min, 4 °C). Supernatants were frozen at -80 °C until proteomic analysis. Protein concentration was estimated according to the manufacturer's instructions using a commercial Bradford reagent (Quick Start Bradford protein assay, Bio-Rad).

### 2.4. 2D-DIGE proteomic analysis

We analyzed 2 groups [*B. megaterium* incubated for 5 h without (C) or with (M) 1 mM of mesotrione in Volvic<sup>®</sup>] with 3 independent samples per group (C1, C2, C3, M1, M2 and M3). Samples were labeled with cyanine dyes as previously described (Tonge et al., 2001). Fifty micrograms from each sample were labeled with 400 pmol of either Cy3 or Cy5. In the same way, internal standard IS (pooled from an equal amount of all samples) was labeled with Cy2. Labeling reactions were carried out on ice in the dark for 30 min and stopped by an excess of lysine for 10 min. These labeled samples were then combined for 2D-DIGE analysis: Mix1 = C1<sub>Cy3</sub> + M2<sub>Cy5</sub> + IS<sub>Cy2</sub>, Mix2 = M3<sub>Cy3</sub> + C2<sub>Cy5</sub> + IS<sub>Cy2</sub>, Mix3 = C3<sub>Cy3</sub> + M1<sub>Cy5</sub> + IS<sub>Cy2</sub>.

Two-dimensional gel electrophoresis was performed as described previously (Gorg et al., 2000). Briefly, pH 4–7 immobilized pH gradient (IPG) strips 18 cm (GE Healthcare) were overnight rehydrated with 350 µL of rehydration buffer [7 M urea, 2 M thiourea, 10 mM DTT, 2% (w/v) CHAPS, 1.2% (v/v) pH 4–7 IPG buffer and trace of bromophenol blue] containing a total of 150 µg of proteins (Mix1, Mix2 or Mix3). Isoelectric focusing was performed at 20 °C using IPGphor (GE Healthcare) for a total of 80 kV h. The IPG strips were equilibrated (15 min, room temperature) with gentle agitation in equilibration buffer containing 6 M Urea, 2% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 50 mM Tris–HCl pH 8.6 and 1% (w/v) DTT and subsequently for 15 min in the same buffer containing 4.7% (w/v) iodoacetamide instead of DTT. Equilibrated IPG strips were rinsed with running buffer [25 mM Tris, 192 mM glycine and 0.1% (w/v) SDS], placed onto 8–18 % SDS-PAGE gels and overlaid with agarose solution [0.5% low-melting agarose and trace of bromophenol blue in running buffer]. Gels were run at 12 °C in the EttanDalt II system (GE Healthcare) at 2.5 W/gel O/N (until the bromophenol blue dye front reached the bottom of the gel). All electrophoresis procedures were performed in the dark. Two-

dimensional gels were scanned with appropriate wavelengths for excitation and emission by using a Typhoon 9400 (GE Healthcare) and analyzed with DeCyder™ 7.0 software (GE Healthcare). A spot was considered as differentially expressed, between *B. megaterium* cultivated without or with mesotrione, if *t*-test *p*-value < 0.05 and fold change of protein spot abundance was  $\geq +1.5$  or  $\leq -1.5$ . The DeCyder Extended Data Analysis module was used to perform principal component analysis.

Semi-preparative 2D gels were made as described above, except that IPG strips were rehydrated with 400  $\mu\text{g}$  of protein samples. After electrophoresis, the gel was fixed in a solution containing 30% (v/v) ethanol and 2% (v/v) phosphoric acid for  $2 \times 30$  min, fixed O/N with the same solution, washed  $3 \times 10$  min with 2% (v/v) phosphoric acid and stained for 72 h with 0.01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 12% (w/v) ammonium sulfate, 18% (v/v) ethanol and 2% (v/v) phosphoric acid. Semi-preparative gels were then washed in Milli-Q water and two-dimensional images were then washed in Milli-Q water and two-dimensional images were then washed in Milli-Q water and two-dimensional images were then washed in Milli-Q water and two-dimensional images were then washed in Milli-Q water. The image of the semi-preparative gel was matched to those of analytical DIGE gels, and the spots of interest were manually excised.

### 2.5. Mass spectrometry: in-gel tryptic cleavage and protein identification

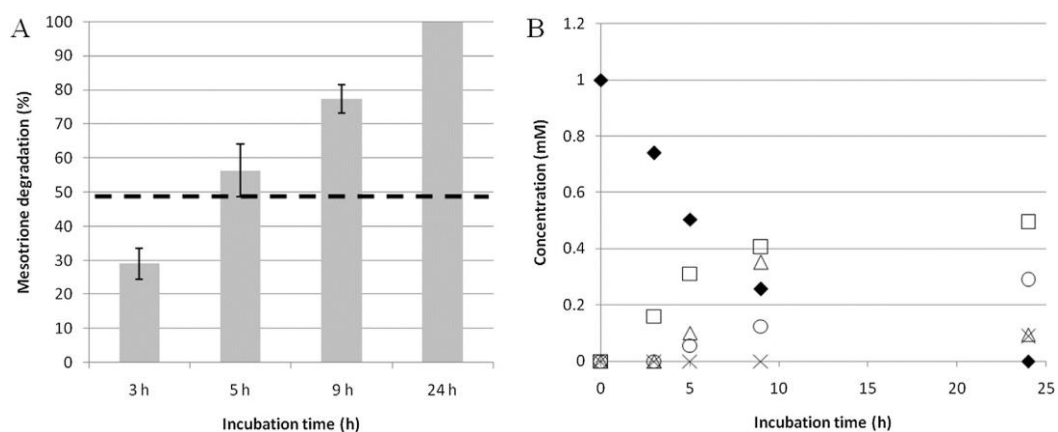
In-gel digestion was carried out with trypsin as described by (Shevchenko et al., 2001) with minor modifications and using for all steps a Freedom EVO 100 digester/spotter robot (Tecan, Switzerland). Spots were first destained two times with a mixture of 100 mM ammonium bicarbonate (ABC) and 50% (v/v) acetonitrile (ACN) (45 min, 22 °C) and dried using 100% ACN (15 min). Protein spots were then reduced with 25 mM ABC containing 10 mM DTT (1 h, 60 °C) and alkylated with 55 mM iodoacetamide in 25 mM ABC for 30 min in the dark at 22 °C. Gel pieces were washed twice with 25 mM ABC and finally shrunk two times with 100% ACN (15 min) and dried using 100% ACN (10 min). Bands were finally completely dehydrated after 1 h at 60 °C. Gel pieces were incubated with 13  $\mu\text{L}$  of sequencing grade modified trypsin (Promega, USA; 12.5  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$  in 40 mM ABC with 10% ACN, pH 8.0) overnight at 40 °C. After digestion, peptides were washed with 30  $\mu\text{L}$  of 25 mM ABC, shrunk with 100% ACN and extracted twice with a mixture of 50% ACN–5% formic acid. Extracts were dried using a vacuum centrifuge

Concentrator plus (Eppendorf).

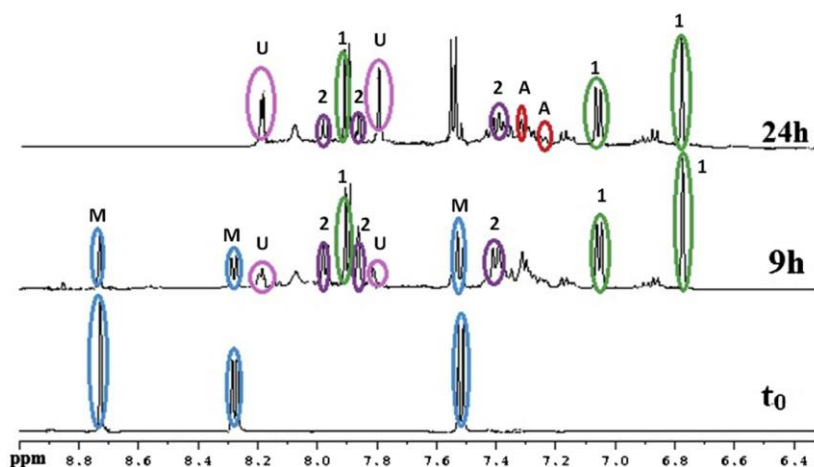
For MS and MS/MS analysis, peptides were redissolved in 4  $\mu\text{L}$  of  $\alpha\text{-CHCA}$  (2.5  $\text{mg}\text{mL}^{-1}$  in 70% ACN–0.1% trifluoroacetic acid). Then, 1.5  $\mu\text{L}$  of each sample were spotted directly onto a MALDI plate (ABSciex, USA). Droplets were allowed to dry at room temperature. Sample analysis was performed using a MALDI-TOF-TOF 4800 mass spectrometer (ABSciex). Spectra acquisition and processing were performed using the 4000 series explorer software (ABI) version 3.5.28193 in positive reflectron mode at fixed laser fluency with a low mass gate and delayed extraction. External plate calibration was performed using 4 calibration points spotted onto the 4 corners of the plate using a mixture of five external standards (PepMix 1; LaserBio Labs, France). Peptide masses were acquired by steps of 50 spectra in the range of 900–4000 Da. MS spectra were summed from 500 laser shots from an Nd-YAG laser operating at 355 nm and 200 Hz. After filtering tryptic, keratin and matrix contaminant peaks up to 15 parent ions were selected for subsequent MS/MS fragmentation according to mass range, signal intensity, signal to noise ratio, and absence of neighboring masses in the MS spectrum. MS/MS spectra were acquired in 1 kV positive mode and 1000 shots were summed by steps of 50. Database searches were carried out using Mascot version 2.2 (MatrixScience, London, UK) via GPS explorer software (ABSciex) version 3.6 combining MS and MS/MS inquiries on *B. megaterium* QM B1551 proteins from NCBI nr databank containing 5612 sequences (January 2012) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The search parameters were as follows: carbamidomethylation as a variable modification for cysteines and oxidation as a variable modification for methionines. Up to 1 missed tryptic cleavage was permitted and mass accuracy tolerance of 30 ppm for precursors and 0.3 Da for fragments were used for all tryptic mass searches. Positive identification was based on a Mascot score above the significance level (i.e. <5%). The reported proteins were always those with the highest number of peptide matches. Under our identification criteria, no result was found to match to multiple members of a protein family.

### 2.6. Determination of potential protein interaction (string)

STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes) is a database of known and predicted protein interactions including direct (physical) and indirect (functional) associations. STRING



**Fig. 1.** Kinetics of mesotrione degradation by *Bacillus megaterium* strain Mes11. (A) Percentages of 1 mM mesotrione degradation at 3 h, 5 h, 9 h and 24 h of culture. Data shown are average values of three independent culture experiments. Standard deviations are indicated. Dotted line represents 50% of mesotrione degradation. (B) Time courses of mesotrione (1 mM,  $\blacklozenge$ ) and its metabolites ( $\square$ : hydroxylamine (1);  $\triangle$ : benzosoxazol-3-ol (2);  $\times$ : AMBA;  $\circ$ : unidentified metabolite) during biodegradation by *Bacillus megaterium* on the combined supernatants of the 3 cultures.



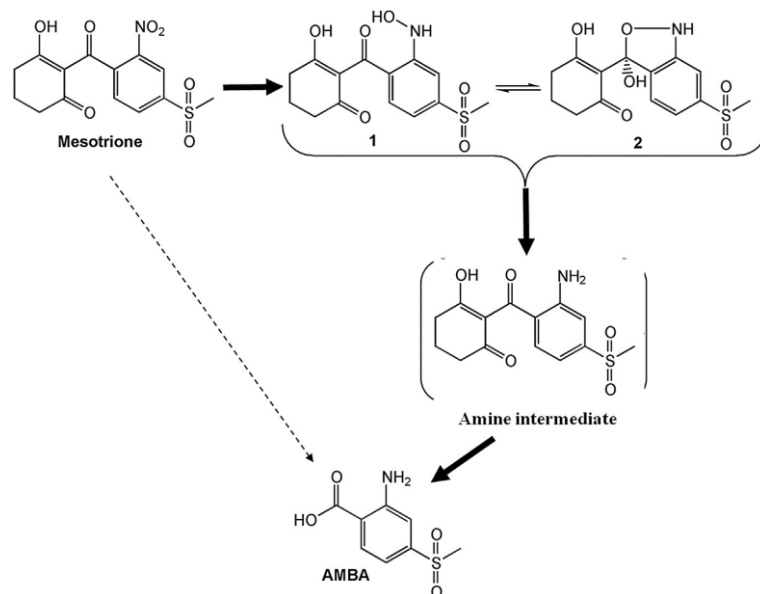
**Fig. 2.** Aromatic region of the  $^1\text{H}$  NMR spectra recorded on the combined supernatant of the three independent cultures during the biodegradation of 1 mM mesotrione by *Bacillus megaterium* strain Mes11. Mesotrione (blue, M); hydroxylamine 1 (green); benzoxazol-3-ol 2 (purple); AMBA (red, A); unidentified metabolite (pink, U). The other signals are present in the control. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

quantitatively integrates interaction data from genomic context, high-throughput experiments and co-expression for a large number of organisms, and transfers information between these organisms where applicable. Version 9.0 of STRING can be reached at <http://string-db.org> (Szklarczyk et al., 2010). As *B. megaterium* proteome was not included in the STRING database, we have chosen to use, for the retrieval of interacting proteins, the well-studied model organism, *Bacillus subtilis*, which is the best characterized Gram-positive bacterium with a genome already completely sequenced in 1997 and a comprehensive proteomic analysis since this time accomplished. Despite some specific processes allocated to *B. megaterium* (Eppinger et al., 2011), strains from both *Bacillus* species have the capacity to degrade mesotrione with a similar kinetic (personal data).

### 3. Results and discussion

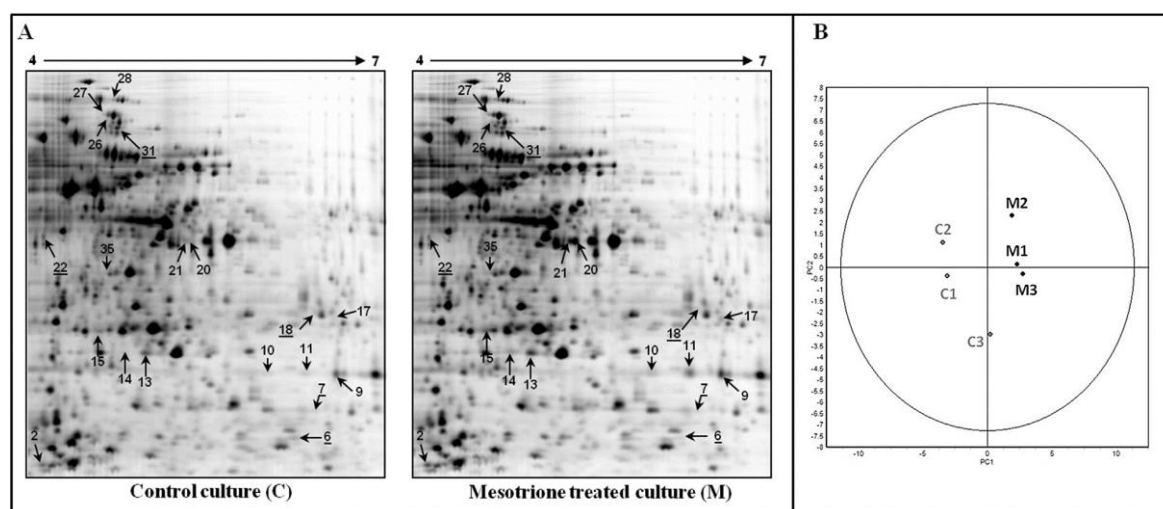
#### 3.1. Kinetics and metabolic pathway of mesotrione degradation by *B. megaterium* strain Mes11

The mesotrione-degrading strain Mes11 was incubated in the same degrading conditions as those described before (Batisson et al., 2009) to perform differential proteomic analyses during exposure to mesotrione (M) or not (C = control). Samples were taken at different incubation times during the three independent culture experiments to follow the mesotrione degradation by HPLC. The point at which 50–60 % of the original mesotrione concentration was degraded was used in subsequent experiments (Fig. 1A). The three cultures gave similar results and the samplings realized



**Fig. 3.** Proposed scheme of mesotrione biodegradation by *Bacillus megaterium*. 1: hydroxylamine; 2: benzoxazol-3-ol; AMBA: 2-amino-4-methylsulfonylbenzoic acid. The thick and dotted arrows show the main and the minor pathways leading to AMBA formation, respectively.





**Fig. 4.** 2D-DIGE maps and PCA analysis of the control and mesotrione-treated cultures of *Bacillus megaterium*. (A) Intracellular protein profiles of *Bacillus megaterium* cultivated for 5 h without (C) or with (M) 1 mM of mesotrione in Volvic®. The arrows indicate the differentially expressed and identified proteins spots. Underlined or not numbers are proteins down- and up-regulated, respectively. (B) DeCyder analysis. Two-dimensional view of a principal component analysis (PCA) performed from the 1820 protein spots. The score plot shows an overview of the spot maps.

after 5 h of incubation in Volvic® mineral water, supplemented (M) or not (C) with mesotrione, were used for protein extraction. Abundance and viable number of cells were quite similar ( $2.5 \cdot 10^8$  and  $3.5 \cdot 10^8$  bacteria  $\text{mL}^{-1}$  in C and M flasks, respectively) and stable in both incubation conditions all along the experiment, indicating that no cell lysis or death, due to the resting-cell experimental conditions, occurs during the short incubation time chosen (5 h). Furthermore, the mesotrione and control cultures showed similar and constant intracellular ATP concentrations until proteins were recovered, suggesting that the cells maintained their activity whatever the experimental conditions (data not shown). A detailed analysis of the metabolites formed was monitored on the combined supernatant of the three independent experiments, using  $^1\text{H}$  NMR, for each incubation time (Fig. 2). Four metabolites were clearly detected. Three were identified by comparison with

our previous studies (Fig. 3) as metabolites coming from the reduction of the nitro function of mesotrione leading to hydroxylamine derivatives **1** and **2**, and from hydrolysis reactions (AMBA) (Batisson et al., 2009; Durand et al., 2010). They were quantified by integrating each of their  $^1\text{H}$  NMR signals and comparing the values obtained with that of the reference TSP- $d_4$  as described in the Material and Methods section (Fig. 1B). The intermediate unidentified metabolite was quantified supposing that it has a similar structure than **1** and **2** (same number of protons).

### 3.2. Overall results of *B. megaterium* physiological response to the mesotrione exposure

As mesotrione degradation activity was ascribed to intracellular proteins of *Bacillus* (data not shown), the 2D-DIGE gels were

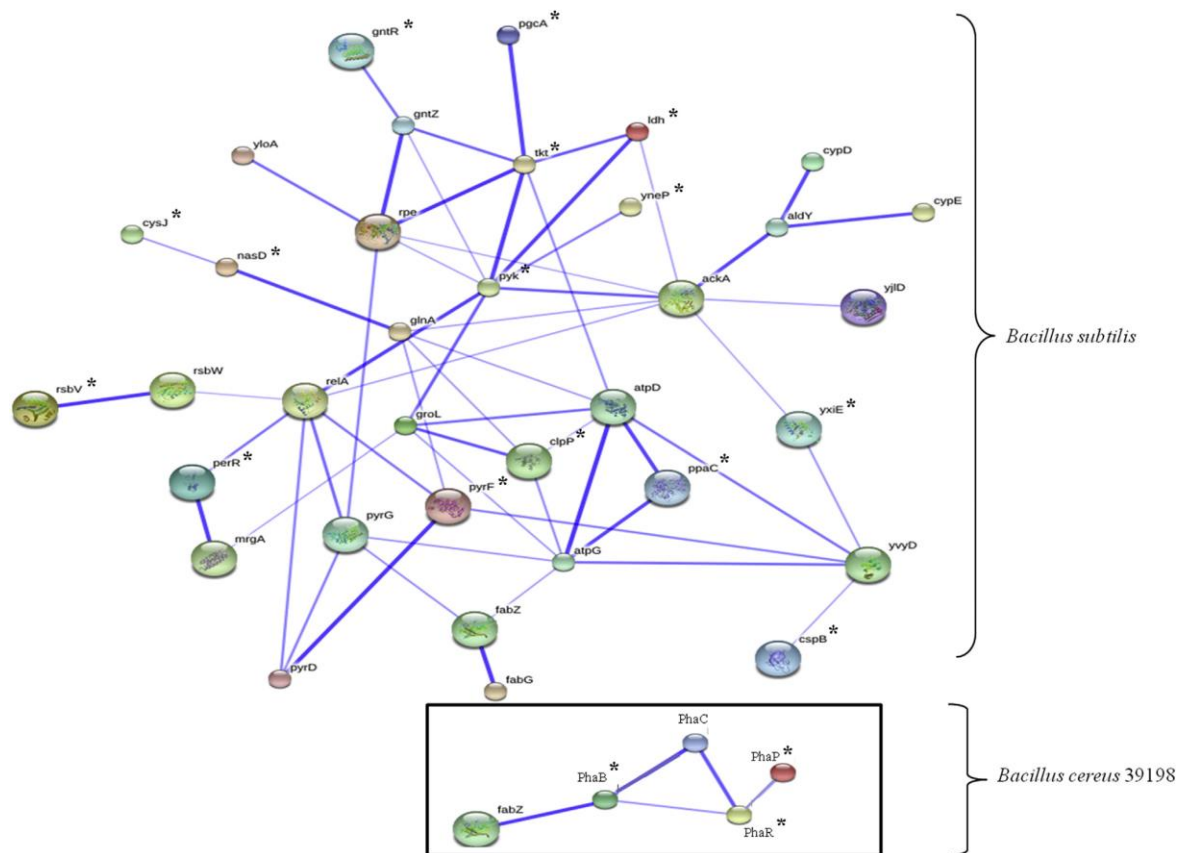
**Table 1**  
Identified proteins differentially expressed under mesotrione treatment.<sup>a</sup>

Spot N°	Protein name	Accessing number NCBI nr	Fc <sup>b</sup>	t-test p-value
17	acetoacetyl-CoA reductase [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	PhaB gi 294497997	2.8	3.2E-05
31	alpha-phosphoglucomutase [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	PgcA gi 294497324	-1.5	3.1E-03
6	anti-sigma B factor antagonist [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	RsbV gi 294497068	-2.0	8.7E-03
2	cold shock protein [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	CspB gi 294499936	2.1	3.0E-02
35	fructose-1,6-bisphosphate aldolase [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	FbaA gi 294501887	1.9	1.2E-03
18	GntR family transcriptional regulator [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	GntR gi 294500271	-1.6	1.7E-02
20	L-lactate dehydrogenase [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	Ldh gi 294497312	5.0	1.2E-05
21	L-lactate dehydrogenase [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	Ldh gi 294497312	2.1	9.0E-03
22	manganese-dependent inorganic pyrophosphatase [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	PpaC gi 294499268	-1.6	1.8E-02
15	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 2 [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	ClpP gi 294501768	1.6	1.0E-02
28	nitrite reductase [NAD(P)H], large subunit [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	NasD gi 294497920	1.9	1.2E-04
7	Peroxide operon regulator [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	PerR gi 294497231	-1.7	1.8E-03
13	polyhydroxyalkanoic acid inclusion protein PhaP [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	PhaP gi 294497993	1.5	1.5E-02
14	polyhydroxyalkanoic acid inclusion protein PhaP [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	PhaP gi 294497993	2.8	7.2E-05
26	pyruvate kinase [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	Pyk gi 294501510	1.7	2.8E-02
10	thioesterase family protein [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	Ynep gi 294498300	1.8	2.7E-03
27	transketolase [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	Tkt gi 294500834	2.1	1.9E-02
9	universal stress protein family domain-containing protein [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	Yxie gi 294498634	1.8	1.8E-03
11	universal stress protein family domain-containing protein [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	Yxie gi 294498634	4.6	9.4E-05
25	sulfite reductase [NADPH] flavoprotein, alpha-component [ <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551]	CysJ gi 294499853	1.5	6.5E-04

<sup>a</sup> Complementary informations about proteins are included in Supplemental material (Fig. S1 and Table S1).

<sup>b</sup> Fc, Fold change of corresponding spot volumes in control cells group compared to mesotrione-treated cells group.





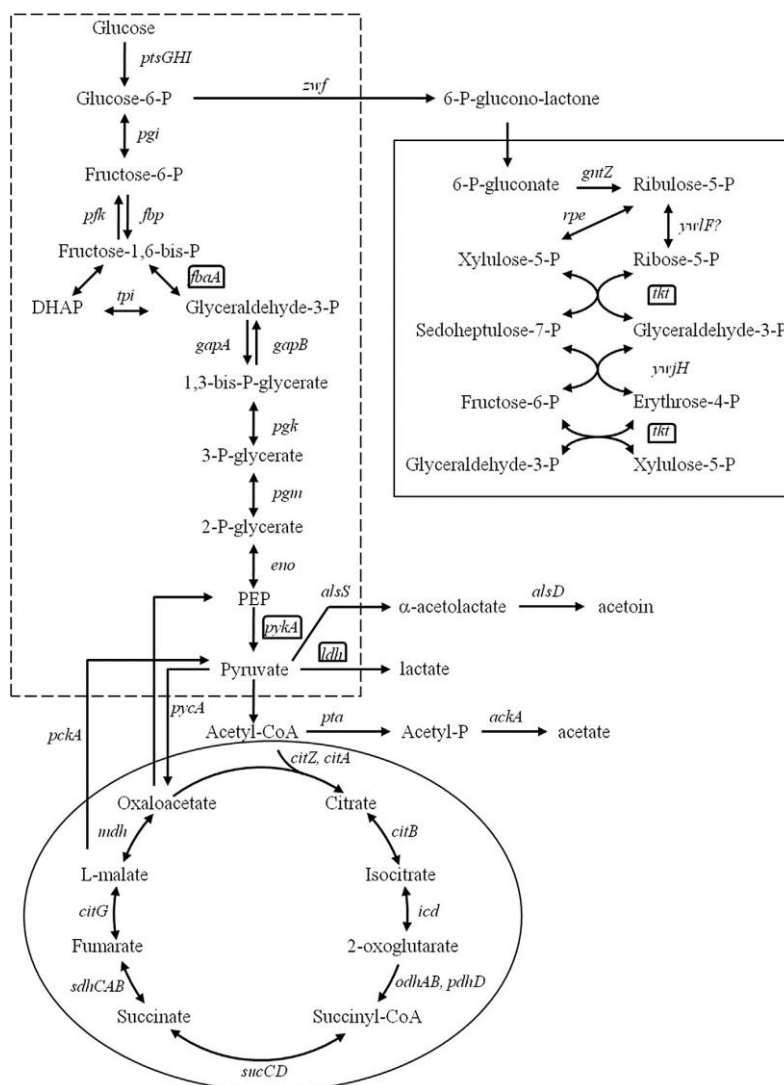
**Fig. 5.** The confidence view of the network generated by STRING software, based on 2D-DIGE results. The differential expressed proteins identified in *Bacillus megaterium* strain after exposure to mesotrione herbicide (Table 1) are marked with an asterisk (\*). The box represents the phasin network in *Bacillus cereus*, also observed in *Bacillus megaterium*, but absent in *Bacillus subtilis* which shows an homologous network with FabG being assimilated to PhaB (McCool and Cannon, 1999; Han et al., 2009). In this view, the color saturation of the edges represents the confidence score of a functional association. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

realized from samples of this compartment both in control and mesotrione treated cultures (Fig. 4A). Using a pH gradient 4–7 (Mao et al., 2011; Wenzel et al., 2012; Baysal et al., 2013), a total of 1820 different protein spots were observed. This pI gradient was chosen because we first hypothesized, from metabolites produced by *B. megaterium*, that an intracellular protein nitroreductase (pI around 5.7) could be involved, *inter alia*, in the first step of mesotrione degradation. However, we cannot exclude that proteins of interest could be outside that range. Principal component analysis (PCA) of the 1820 protein spots revealed patterns that clearly segregated the control and mesotrione treated cultures (Fig. 4B). Using the DeCyder Biological Variation Analysis (BVA) module, 32 spots differentially expressed between the two groups were identified, using a threshold of 1.5 fold change and  $p$ -value < 0.05. This result agrees with the mean number of differential protein spots observed in other studies (Tomas-Gallardo et al., 2006; Petrak et al., 2008; Colquhoun et al., 2012). Among these 32 spots, 22 spots were up-regulated and 10 spots down-regulated in mesotrione treated cultures. Twenty six spots could be localized on semi-preparative gels and were analyzed by MS/MS. Fig. 4A and Table 1 summarize the 20 identified proteins spots, leading finally to 17 non-redundant proteins.

### 3.2.1. Up- and down-regulation of stress related proteins in *B. megaterium* exposed to mesotrione

As observed in other studies (Breugelmanns et al., 2010; Bers et al., 2011), the mesotrione induces a stress situation for the *B. megaterium* strain compared to the control. Some of proteins were up regulated in the mesotrione treated condition (Table 1) such as cold shock protein (CspB, spot 2; Graumann and Marahiel, 1997) and universal stress protein family (Yxie, spots 9, 11; Kvint et al., 2003) that were also shown to be stimulated by different other stress (e.g. Lupi et al., 1995; Graumann and Marahiel, 1999; Kvint et al., 2003).

Conversely, as already observed after exposure of bacteria to herbicides (Breugelmanns et al., 2010), some other proteins involved in the general stress were decreased in strain Mes11. For example, the peroxide operon regulator (PerR, spot 7; Mongkolsuk and Helmann, 2002), a metalloprotein that functions as a peroxide sensitive repressor, was identified as the major regulator of the inducible peroxide stress response in *B. subtilis* (Mongkolsuk and Helmann, 2002). PerR was also shown to interact with proteins involved in aromatic compound degradation (see below). The peroxide present or generated in the medium could be used to degrade mesotrione or its primary metabolites, as shown in the case of Fenton process for example (Zhang et al., 2012) and then be



**Fig. 6.** Overview on glycolysis (dotted box), pentose phosphate shunt (square box), tricarboxylic acid cycle (circle box) and their interconnections in *Bacillus*. Differentially expressed enzymes revealed after exposure to mesotrione and directly involved in these cycles are surrounded ( $\square$ ). PEP, phosphoenolpyruvate; DHAP, dihydroxy-acetone phosphate (modified from Blencke et al., 2003).

less active toward the cells leading to a modification of the PerR expression (Table 1). Furthermore, the cyclohexane derivative moiety obtained from mesotrione transformation could be degraded by the Cyp protein shown to be involved in cyclohexane molecule degradation (Senler et al., 1985; Kawakami et al., 2011). Indeed, this protein is included in the web combining the differentially expressed proteins in *B. megaterium* exposed to mesotrione (Fig. 5), suggesting that it could play an important role during the mesotrione degradation. In all the metabolites identified, the cyclohexane moiety has disappeared showing that this structure is easily degradable.

Furthermore, it was also shown that general stress proteins protect *B. subtilis* cells against a variety of environmental insults (Price, 2000; Hecker and Volker, 2001). This adaptive response is

particularly important for non-growing cells (as in our resting cell conditions), to which it confers a multiple, nonspecific, and preemptive stress resistance. Such general stress proteins as the ATP-dependent Clp protease (ClpP; Bernhardt et al., 1997; Hecker and Volker, 1998) were shown to be up-regulated in presence of mesotrione (spot 15). In addition to the transcriptional repressor PerR, the reprogramming that occurs in response to peroxide stress is also carried out by the alternative transcription sigma B factor ( $\sigma^B$ ) (Helmann et al., 2003; Giedroc, 2009), whose activity is controlled by a partner switching mechanism that involves the anti-sigma factor, RsbW, and the antagonist protein, RsbV (spot 6; van Schaik et al., 2005; Dufour and Haldenwang, 1994). In unstressed conditions,  $\sigma^B$  is coupled to RsbW factor and is in inactive form. In most cases, under environmental stress conditions, the formation

of the RsbW–RsbV complex occurs leading to the subsequent release of active  $\sigma$ B. However, in our case, when mesotrione stress is applied to strain Mes11, the RsbV factor is down-regulated suggesting that the RsbV–RsbW complex formation is reduced and that the induction of  $\sigma$ B regulon, leading to production of general stress proteins, does not depend on RsbV protein. This phenomenon has already been observed under other stress stimuli (Brigulla et al., 2003; Holtmann et al., 2004).

Thus, the pattern of protein rearrangement observed with the mesotrione stress is not unexpected and probably reflects the need for an initial rapid adaptation to protect the cell against the damaging influence of the stress. These modifications are coupled to a functional metabolic enhancement during which the proteins expressed modulate metabolism under the altered chemical conditions imposed.

### 3.2.2. Up- and down-regulation of proteins related to carbohydrate, nitrogen and sulfur metabolisms

3.2.2.1. Carbohydrate metabolism. *Bacillus* strains can use numerous carbohydrates as the sole source of carbon and energy.

They involve glycolysis and the pentose phosphate shunt as well as the tricarboxylic acid cycle (Fig. 6) to provide energy and carbon backbones for anabolism. As shown in Table 1, when the strain Mes11 is exposed to mesotrione, further enzymes involved in these pathways showed a tight and coordinated induction such as fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FbaA, spot 35), transketolase (Tkt, spot 27), pyruvate kinase (Pyk, spot 26) or lactate dehydrogenase (Ldh, spots 20, 21).

The expression of FbaA has already been shown to increase in the presence of other xenobiotics (Tomas et al., 2004) whereas the glucose metabolism was decreased. This could be explained by the fact that FbaA is a reversible glycolytic enzyme involved in both glycolysis and gluconeogenesis (Roumelioti et al., 2010). Indeed, it was shown that, for growth on organic acids, *B. subtilis* needs to perform gluconeogenesis. Also, the utilization of this pathway by *B. megaterium* strain to degrade mesotrione could explain the induction of FbaA observed during incubation with mesotrione as the sole carbon source (Furch et al., 2007).

Pyruvate kinase is the major regulatory enzyme that converts PEP into pyruvate and ATP. As no glucose was present in the culture

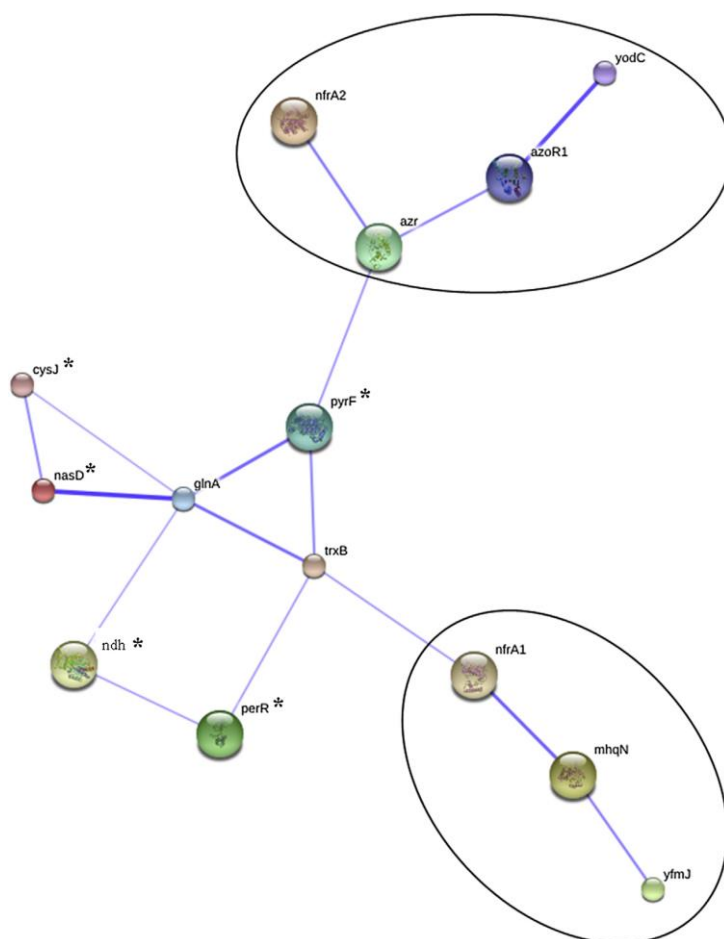


Fig. 7. Network generated by STRING software, focusing on nitroreductases involved in aromatic compound degradation. The differentially expressed proteins identified in *Bacillus megaterium* strain after exposure to mesotrione herbicide (Table 1) are marked with an asterisk (\*). The nitroreductases and associated proteins involved in aromatic compound degradation are surrounded. In this scheme, the color saturation of the edges represents the confidence score of a functional association. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

medium, we can assume that the PEP is produced via gluconeogenesis. Up-regulation of PykA in mesotrione treated *Bacillus* (Table 1) is in agreement with the maintenance of cell activity estimated by ATP measurement (data not shown).

Surprisingly, although flasks were incubated under agitation, the subsequently formed pyruvate could be specifically catabolized to lactate since the lactate dehydrogenase is strongly induced (Table 1). The Ldh is also regulated by the fructose 1,6-bisphosphate in microorganisms (Clarke et al., 1986). Thus, by using the gluconeogenesis pathway to biotransform mesotrione, *B. megaterium* could be able to produce fructose 1,6-bisphosphate leading to activation of Ldh (Table 1, spots 20, 21).

Then, a part of the fructose 1,6-bisphosphate produced could lead to the production of glucose-6-phosphate which enters into the pentose phosphate pathway (Fig. 6). Indeed, the GntR protein, a transcriptional repressor of the gluconate operon in *Bacillus*, is under expressed during mesotrione exposure (Table 1: spot 18). Furthermore, the gluconate and glucono- $\beta$ -lactone are inducers for this operon (Miwa and Fujita, 1988). Thus, the *gnt* operon, responsible for the gluconate metabolism, can be expressed. This activates the pentose phosphate pathway and could explain the over expression of the transketolase protein (Table 1; spot 27), a key enzyme able to create a bridge between glycolysis/gluconeogenesis and the pentose phosphate pathway (Fig. 6).

Furthermore, during growth of *Bacillus* in unstressed conditions, Glucose 6-P undergoes glycolysis on one hand, yielding energy and reducing power, and on the other hand, it is isomerized by *pgcA*-encoded  $\alpha$ -phosphoglucomutase into  $\alpha$ -Glucose 1-P, the precursor of UDP-Glucose. In *Bacillus*, UDP-glucose has a central role as a metabolite for the synthesis of cell wall envelope polymers (Lazarevic et al., 2005; Grundling and Schneewind, 2007). However, when exposed to mesotrione, the  $\alpha$ -phosphoglucomutase is under-expressed (*PgcA*; Table 1; spot 31), suggesting that the strain Mes11 has an altered membrane glycolipid synthesis as recently observed for *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  strain exposed to mesotrione (Olchanheski et al., 2014).

**3.2.2.2. Nitrogen metabolism.** The main degradation route of mesotrione in our *B. megaterium* strain was shown to be initiated by direct nitro-reduction of mesotrione, leading to an intermediate reactive hydroxylamine derivative **1** that can be cyclized into **2** or be reduced into an amine intermediate before being cleaved into AMBA (Fig. 3). Other intermediate metabolites can be also present either in very low concentrations, or in the intracellular content. The formation of these metabolites could release nitro groups in the medium, as proposed by Youness (2013) after NMR analyses of the unidentified metabolite. This could explain the increased expression of the nitrite reductase enzyme Nas D (Table 1; spot 28) when *B. megaterium* is incubated in presence of mesotrione. This also suggests that some degradation products could be used as a source of nitrogen by the bacterium. Indeed, Nas D reductase functions as both a dissimilatory and an assimilatory enzyme (Nakano et al., 1998; Shao et al., 2011), thus contributing to the ability of the strain to grow efficiently, as previously observed (e.g. Ye, 2004; Caballero et al., 2005; Ju and Parales, 2010).

We were not able to highlight a nitroreductase, which is assumed to be induced and involved in the first step of mesotrione degradation as already observed for other nitro pesticides (Yang et al., 2007; Roldan et al., 2008). The involvement of such an enzyme is reinforced by the fact that nitroreductases involved in nitro aromatic compound degradation are tightly linked to proteins revealed in this study as potentially correlated with the mesotrione stress response (NfrA, MhqN, YodC, ...; Fig. 7). Moreover, we cannot exclude that nitroreductase could be represented by one of the proteins which has not been identified.

After nitroreductase activity on mesotrione, the amino intermediate produced could be degraded by the same way as observed for a *Bacillus stearothermophilus*-like strain during the catabolism of aminobenzoate compounds which leads to the formation of various CoA thioester metabolites (Gescher et al., 2002). A thioesterase protein is required to cleave the thioesters of the dead-end products leading thus to the production of the corresponding acid (5-hydroxy-2-aminobenzoate). When *B. megaterium* is exposed to mesotrione, we can assume that a similar pathway could be used since our results showed (i) an increase of the thioesterase family protein expression (Ynep; Table 1; spot 10), (ii) the production of acids such as 4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoic acid (MNBA) and 2-amino-4-methylsulfonylbenzoic acid (AMBA) (Batisson et al., 2009; Durand et al., 2010) and (iii) no detection of catechol intermediates, as already observed for *Bacillus* strains that are able to degrade aromatic compounds without production of catechol or protocatechuate intermediates (Kiemer et al., 1996).

**3.2.2.3. Sulfur metabolism.** As shown in *B. subtilis* (Guillouard et al., 2002), the assimilation of sulfate and the biosynthesis of cysteine may occur via similar pathways. Sulfate is first reduced to sulfide by a series of enzymatic steps involving a sulfite reductase in the last step. Subsequently, sulfides are condensed with O-acetylserine to form cysteine. We can thus make the hypothesis that the increase of sulfite reductase  $\alpha$ -component CysJ expression in *B. megaterium* after exposure to mesotrione (Table 1; spot 25) could be due to the release of the sulfonyl groups from some intermediate metabolites as shown by Pileggi et al. (2012) and to the utilization of the sulfate moiety of the mesotrione as sulfur source. We can also suppose that CysJ could function to provide, via its NADPH:flavin reductase activity, the reducing equivalents needed for the base analog detoxification (Kozmin et al., 2010). Indeed, mutagenic and cytotoxic base analogs can be produced by chemical factors, such as alkylating agents, or be formed *in vivo* under oxidative stress (Simandan et al., 1998). It is thus probable that the mesotrione containing alkyl groups and inducing an oxidative stress (as shown by modification of expression of the PerR regulon) could lead to the formation of toxic and mutagenic N-hydroxylated nucleobases and that their removing is partially ensured by CysJ.

### 3.3. Could mesotrione be used as carbon storage by *B. megaterium*?

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are aliphatic polyesters that are accumulated as carbon and energy storage materials in numerous bacteria under conditions in which nutrient sources other than carbon are scarce (Anderson and Dawes, 1990; Lee, 1996). PHA are synthesized when more carbon sources are available than can be consumed by the bacteria (Uchino et al., 2007). PHAs are reutilized during times of starvation and greatly enhance the survival of bacteria and stress resistance in the absence of a suitable exogenous carbon source (Ruiz et al., 2001).

During the PHA biosynthetic pathway, acetyl coenzyme A (acetyl-CoA) is synthesized from acetate and CoA, and then two molecules of acetyl-CoA are condensed by  $\beta$ -ketothiolase (PhaA) to synthesize acetoacetyl-CoA, which is subsequently selectively reduced by an NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase (PhaB, also called FabG; McCool and Cannon, 1999; Han et al., 2009) to form (R)-3-hydroxybutyryl-CoA (3HBCoA) (McCool and Cannon, 1999; Satoh et al., 2003). When exposed to mesotrione, an increase of PhaB protein (Table 1; spot 17) was observed, suggesting that PHAs were produced and that the amount of 1 mM of mesotrione used for incubation of strain Mes11 is higher than the needs for its metabolism under stationary conditions. These results are comforted by the simultaneous increase of PhaP (Table 1; spots 13, 14). PhaP is a storage protein localized to inclusion bodies in the living



cells that plays important roles in PHA production and granule formation (McCool and Cannon, 1999; Lee et al., 2004).

PHA inclusion bodies are not only a source of carbon, energy, and reducing equivalents but are also a source of amino acids when storage proteins are degraded (McCool and Cannon, 1999). Hence, our results suggest that, in case of excess, the mesotrione could be stored as granules until environmental conditions become unfavorable for bacterial metabolic activities.

#### 4. Conclusions

In this study, we present the first results regarding the proteomic responses of a *B. megaterium* strain after exposure to a triketone herbicide. The data presented here help us to provide a comprehensive picture of the physiological responses of *B. megaterium* that ensure tolerance and adaptability towards mesotrione stress. They mainly showed the involvement of stress proteins, metabolic enzymes and storage proteins. The highlighted proteins implicated in carbon, nitrogen or sulfur metabolism suggest that *B. megaterium* could use the mesotrione as a part of energy and nutrient sources additionally to those available in the environmental compartments. The mesotrione being weakly adsorbed on soil, it represents a pool of bioavailable organic matter that could then facilitate the maintenance and growth of *B. megaterium* strains in agricultural fields.

In addition to the inherent importance of gaining an understanding in response to mesotrione-induced stress in the biological systems, this subject has important implications for biological waste treatment and bioremediation since it could also allow the identification of mesotrione-degrading proteins. These results obtained on overall metabolism shifts under mesotrione pressure will allow targeting potential candidates of degrading proteins. Indeed, some proteins highlighted in this study are closely linked to proteins shown to be involved in aromatic compounds degradation. We can thus assume these proteins to be involved in degradation of this herbicide and to target these enzymes for further investigation.

#### Acknowledgments

This work was supported by the ANR-13-CESA-0002. TRICETOX grant (Program CESA). The authors acknowledge also the Région Auvergne, the French Ministry for Higher Education and Research and the European Regional Development Fund. The authors thank Catherine Texier for her help in proteomic analyses, Jonathan Colombet for enumeration of bacteria, Pierre Amato for ATP measurements, Frédérique Bonnemoy and Olivier Bardot for discussions.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.029>.

#### References

- Amato, P., Christner, B.C., 2009. Energy metabolism response to low-temperature and frozen conditions in *Psychrobacter cryohalolentis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 711–718.
- Anderson, A.J., Dawes, E.A., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54, 450–472.
- Batissou, L., Crouzet, O., Besse-Hoggan, P., Sancelme, M., Mangot, J.F., Mallet, C., Bohatier, J., 2009. Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp. from soil. *Environ. Pollut.* 157, 1195–1201.
- Baysal, O., Lai, D., Xu, H.H., Siragusa, M., Caliskan, M., Carimi, F., da Silva, J.A., Tor, M., 2013. A proteomic approach provides new insights into the control of soil-borne plant pathogens by *Bacillus* species. *PLoS One* 8, e53182.
- Bernhardt, J., Volker, U., Volker, A., Antelmann, H., Schmid, R., Mach, H., Hecker, M., 1997. Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis*—a two-dimensional

- protein electrophoresis study. *Microbiology* 143, 999–1017.
- Bers, K., Leroy, B., Breugelmanns, P., Albers, P., Lavigne, R., Sorensen, S.R., Aamand, J., De Mot, R., Wattiez, R., Springael, D., 2011. A novel hydrolase identified by genomic-proteomic analysis of phenylurea herbicide mineralization by *Variovorax* sp. strain SRS16. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8754–8764.
- Blencke, H.M., Homuth, G., Ludwig, H., Mader, U., Hecker, M., Stulke, J., 2003. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metab. Eng.* 5, 133–149.
- Breugelmanns, P., Leroy, B., Bers, K., Dejonghe, W., Wattiez, R., De Mot, R., Springael, D., 2010. Proteomic study of linuron and 3,4-dichloroaniline degradation by *Variovorax* sp. WDL1: evidence for the involvement of an aniline dioxygenase-related multicomponent protein. *Res. Microbiol.* 161, 208–218.
- Brigulla, M., Hoffmann, T., Krisp, A., Volker, A., Bremer, E., Volker, U., 2003. Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *J. Bacteriol.* 185, 4305–4314.
- Bunemann, E.K., Schwenke, G.D., Van Zwieten, L., 2006. Impact of agricultural inputs on soil organisms - a review. *Aust. J. Soil Res.* 44, 379–406.
- Caballero, A., Esteve-Nunez, A., Zylstra, G.J., Ramos, J.L., 2005. Assimilation of nitrogen from nitrite and trinitrotoluene in *Pseudomonas putida* JLR11. *J. Bacteriol.* 187, 396–399.
- Clarke, A.R., Evington, J.R.N., Dunn, C.R., Atkinson, T., Holbrook, J.J., 1986. The molecular pathway by which fructose 1,6-bisphosphate induces the assembly of a bacterial lactate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Protein Struct. Mol. Enzym.* 870, 112–126.
- Colquhoun, D.R., Hartmann, E.M., Halden, R.U., 2012. Proteomic profiling of the dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas wittichii* RW1. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 408690.
- Damalas, C.A., Eleftherohorinos, I.G., 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 1402–1419.
- Dufour, A., Haldenwang, W.G., 1994. Interactions between a *Bacillus subtilis* anti-sigma factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *J. Bacteriol.* 176, 1813–1820.
- Durand, S., Legeret, B., Martin, A.S., Sancelme, M., Delort, A.M., Besse-Hoggan, P., Combourieu, B., 2006. Biotransformation of the triketone herbicide mesotrione by a *Bacillus* strain. Metabolite profiling using liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 2603–2613.
- Durand, S., Sancelme, M., Besse-Hoggan, P., Combourieu, B., 2010. Biodegradation pathway of mesotrione: complementarities of NMR, LC-NMR and LC-MS for qualitative and quantitative metabolic profiling. *Chemosphere* 81, 372–380.
- Eppinger, M., Bunk, B., Johns, M.A., Edirisinghe, J.N., Kutumbaka, K.K., Koening, S.S., Creasy, H.H., Rosovitz, M.J., Riley, D.R., Daugherty, S., Martin, M., Elbourne, L.D., Paulsen, I., Biedendieck, R., Braun, C., Grayburn, S., Dhingra, S., Lukyanchuk, V., Ball, B., Ul-Qamar, R., Seibel, J., Bremer, E., Jahn, D., Ravel, J., Vary, P.S., 2011. Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* strains QM B1551 and DSM319. *J. Bacteriol.* 193, 4199–4213.
- Furch, T., Wittmann, C., Wang, W., Franco-Lara, E., Jahn, D., Deckwer, W.D., 2007. Effect of different carbon sources on central metabolic fluxes and the recombinant production of a hydrolase from *Thermobifida fusca* in *Bacillus megaterium*. *J. Biotechnol.* 132, 385–394.
- Gallo, G., Lo Piccolo, L., Renzone, G., La Rosa, R., Scaloni, A., Quatrini, P., Puglia, A.M., 2012. Differential proteomic analysis of an engineered *Streptomyces coelicolor* strain reveals metabolic pathways supporting growth on n-hexadecane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 1289–1301.
- Gescher, J., Zaar, A., Mohamed, M., Schagger, H., Fuchs, G., 2002. Genes coding for a new pathway of aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*. *J. Bacteriol.* 184, 6301–6315.
- Giedroc, D.P., 2009. Hydrogen peroxide sensing in *Bacillus subtilis*: it is all about the (metal)regulator. *Mol. Microbiol.* 73, 1–4.
- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W., 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037–1053.
- Graumann, P., Marahiel, M.A., 1997. Effects of heterologous expression of CspB, the major cold shock protein of *Bacillus subtilis*, on protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 253, 745–752.
- Graumann, P.L., Marahiel, M.A., 1999. Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Arch. Microbiol.* 171, 135–138.
- Grundling, A., Schneewind, O., 2007. Genes required for glycolipid synthesis and lipoteichoic acid anchoring in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189, 2521–2530.
- Guillouard, I., Auger, S., Hullo, M.F., Chetouani, F., Danchin, A., Martin-Verstraete, I., 2002. Identification of *Bacillus subtilis* CysI, a regulator of the *cysJI* operon, which encodes sulfite reductase. *J. Bacteriol.* 184, 4681–4689.
- Han, J., Lu, Q., Zhou, L., Liu, H., Xiang, H., 2009. Identification of the polyhydroxyalkanoate (PHA)-specific acetoacetyl coenzyme A reductase among multiple FabG paralogs in *Haloarcula hispanica* and reconstruction of the PHA biosynthetic pathway in *Haloferax volcanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6168–6175.
- Hecker, M., Antelmann, H., Buttner, K., Bernhardt, J., 2008. Gel-based proteomics of Gram-positive bacteria: a powerful tool to address physiological questions. *Proteomics* 8, 4958–4975.
- Hecker, M., Volker, U., 1998. Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the sigmaB regulon. *Mol. Microbiol.* 29, 1129–1136.
- Hecker, M., Volker, U., 2001. General stress response of *Bacillus subtilis* and other

- bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 44, 35–91.
- Helmann, J.D., Wu, M.F., Gaballa, A., Kobel, P.A., Morshedi, M.M., Fawcett, P., Paddon, C., 2003. The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors. *J. Bacteriol.* 185, 243–253.
- Holtmann, G., Brigulla, M., Steil, L., Schutz, A., Barnekow, K., Volker, U., Bremer, E., 2004. RsbV-independent induction of the SigB-dependent general stress regulon of *Bacillus subtilis* during growth at high temperature. *J. Bacteriol.* 186, 6150–6158.
- Ju, K.S., Parales, R.E., 2010. Nitroaromatic compounds, from synthesis to biodegradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 250–272.
- Kawakami, N., Shoji, O., Watanabe, Y., 2011. Use of perfluorocarboxylic acids to trick cytochrome P450BM3 into initiating the hydroxylation of gaseous alkanes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 50, 5315–5318.
- Kiemer, P., Tshisuka, B., Fetzner, S., Lingens, F., 1996. Degradation of benzoate via benzoyl-coenzyme A and gentisate by *Bacillus stearothermophilus* PK 1, and purification of gentisate 1,2-dioxygenase. *Biol. Fertil. Soils* 23, 307–313.
- Kozmin, S.G., Wang, J., Schaaper, R.M., 2010. Role for CysJ flavin reductase in molybdenum cofactor-dependent resistance of *Escherichia coli* to 6-N-hydroxylaminopurine. *J. Bacteriol.* 192, 2026–2033.
- Kvint, K., Nachin, L., Diez, A., Nyström, T., 2003. The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 140–145.
- Lazarevic, V., Soldo, B., Medico, N., Pooley, H., Bron, S., Karamata, D., 2005. *Bacillus subtilis* alpha-phosphoglucomutase is required for normal cell morphology and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 39–45.
- Lee, S.Y., 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 1–14.
- Lee, T.R., Lin, J.S., Wang, S.S., Shaw, G.C., 2004. PhaQ, a new class of poly-beta-hydroxybutyrate (phb)-responsive repressor, regulates phaQ and phaP (phasin) expression in *Bacillus megaterium* through interaction with PHB. *J. Bacteriol.* 186, 3015–3021.
- Lupi, C.G., Colangelo, T., Mason, C.A., 1995. Two-dimensional gel electrophoresis analysis of the response of *Pseudomonas putida* KT2442 to 2-Chlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2863–2872.
- Maaty, W.S., Wiedenheft, B., Barlykov, P., Schaff, N., Heinemann, J., Robison-Cox, J., Valenzuela, J., Dougherty, A., Blum, P., Lawrence, C.M., Douglas, T., Young, M.J., Bothner, B., 2009. Something old, something new, something borrowed; how the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* responds to oxidative stress. *PLoS One* 4, e6964.
- Mao, L., Jiang, S., Wang, B., Chen, L., Yao, Q., Chen, K., 2011. Protein profile of *Bacillus subtilis* spore. *Curr. Microbiol.* 63, 198–205.
- Marouga, R., David, S., Hawkins, E., 2005. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 669–678.
- McCool, G.J., Cannon, M.C., 1999. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 181, 585–592.
- Missous, G., Thammavongs, B., Dieuleveux, V., Houssin, M., Henry, J., Panoff, J., 2012. Proteomic expression of microfungus ripening starter *Geotrichum candidum* submitted to cold stress is strain-dependent: studies using 2d-dige technology and samespots software analysis. *Cryo Lett.* 33, 289–298.
- Mitchell, G., Bartlett, D.W., Fraser, T.E., Hawkes, T.R., Holt, D.C., Townson, J.K., Wichert, R.A., 2001. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Manag. Sci.* 57, 120–128.
- Miwa, Y., Fujita, Y., 1988. Purification and characterization of a repressor for the *Bacillus subtilis* gnt operon. *J. Biol. Chem.* 263, 13252–13257.
- Mongkolsuk, S., Helmman, J.D., 2002. Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol. Microbiol.* 45, 9–15.
- Nakano, M.M., Hoffmann, T., Zhu, Y., Jahn, D., 1998. Nitrogen and oxygen regulation of *Bacillus subtilis* nasDEF encoding NADH-dependent nitrite reductase by TnrA and ResDE. *J. Bacteriol.* 180, 5344–5350.
- Olchanheski, L.R., Dourado, M.N., Beltrame, F.L., Zielinski, A.A., Demiate, I.M., Pileggi, S.A., Azevedo, R.A., Sadowsky, M.J., Pileggi, M., 2014. Mechanisms of tolerance and high degradation capacity of the herbicide mesotrione by *Escherichia coli* strain DH5-alpha. *PLoS One* 9, e99960.
- Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., Cmejlova, J., Vyoral, D., Zivny, J., Vulpe, C.D., 2008. Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 8, 1744–1749.
- Pileggi, M., Pileggi, S.A., Olchanheski, L.R., da Silva, P.A., Munoz Gonzalez, A.M., Koskinen, W.C., Barber, B., Sadowsky, M.J., 2012. Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil. *Chemosphere* 86, 1127–1132.
- Price, C.W., 2000. Protective function and regulation of the general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. In: Storz, G., Hengge-Aronis, R. (Eds.). ASM Press, Washington, D.C.
- Roldan, M.D., Perez-Reinado, E., Castillo, E., Moreno-Vivian, C., 2008. Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 474–500.
- Roumelioti, K., Vangelatos, I., Sophianopoulou, V., 2010. A cryptic role of a glycolytic-gluconeogenic enzyme (aldolase) in amino acid transporter turnover in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 47, 254–267.
- Ruiz, J.A., Lopez, N.I., Fernandez, R.O., Mendez, B.S., 2001. Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 225–230.
- Satoh, Y., Tajima, K., Tannai, H., Muneke, M., 2003. Enzyme-catalyzed poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from acetate with CoA recycling and NADPH regeneration in vitro. *J. Biosci. Bioeng.* 95, 335–341.
- Senler, T.L., Dean, W.L., Murray, L.F., Wittliff, J.L., 1985. Quantification of cytochrome P-450-dependent cyclohexane hydroxylase activity in normal and neoplastic reproductive tissues. *Biochem. J.* 227, 379–387.
- Shao, Z., Gao, J., Ding, X., Wang, J., Chiao, J., Zhao, G., 2011. Identification and functional analysis of a nitrate assimilation operon nasACKBDEF from *Amycolopsis mediterranei* U32. *Arch. Microbiol.* 193, 463–477.
- Shevchenko, A., Loboda, A., Ens, W., Schraven, B., Standing, K.G., 2001. Archived polyacrylamide gels as a resource for proteome characterization by mass spectrometry. *Electrophoresis* 22, 1194–1203.
- Simandan, T., Sun, J., Dix, T.A., 1998. Oxidation of DNA bases, deoxyribonucleosides and homopolymers by peroxyl radicals. *Biochem. J.* 335 (Pt 2), 233–240.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Minguez, P., Doerks, T., Stark, M., Müller, J., Bork, P., Jensen, L.J., von Mering, C., 2010. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res.* 39, D561–D568.
- Tomas-Gallardo, L., Canosa, I., Santero, E., Camafeite, E., Calvo, E., Lopez, J.A., Floriano, B., 2006. Proteomic and transcriptional characterization of aromatic degradation pathways in *Rhodococcus* sp. strain TFB. *Proteomics* 6 (Suppl. 1), S119–S132.
- Tomas, C.A., Beamish, J., Papoutsakis, E.T., 2004. Transcriptional analysis of butanol stress and tolerance in *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* 186, 2006–2018.
- Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I., Davison, M., 2001. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 1, 377–396.
- Uchino, K., Saito, T., Gebauer, B., Jendrossek, D., 2007. Isolated poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme A (CoA) and degradation of PHB to acetyl-CoA. *J. Bacteriol.* 189, 8250–8256.
- van Schaik, W., Tempelaars, M.H., Zwietering, M.H., de Vos, W.M., Abee, T., 2005. Analysis of the role of RsbV, RsbW, and RsbY in regulating  $\sigma$ B activity in *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 187, 5846–5851.
- Wenzel, M., Kohl, B., Munch, D., Raatschen, N., Albada, H.B., Hamoen, L., Metzler-Nolte, N., Sahl, H.G., Bandow, J.E., 2012. Proteomic response of *Bacillus subtilis* to antibiotics reflects differences in interaction with the cytoplasmic membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 5749–5757.
- Yang, C., Dong, M., Yuan, Y., Huang, Y., Guo, X., Qiao, C., 2007. Reductive transformation of parathion and methyl parathion by *Bacillus* sp. *Biotechnol. Lett.* 29, 487–493.
- Ye, J., Singh, Ajay, Ward, Owen P., 2004. Biodegradation of nitroaromatics and other nitrogen-containing xenobiotics. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 117–135.
- Youness, M., 2013. Impact de la formulation et du mélange de deux pesticides (mésotrione et tébuconazole) sur leur biodégradation et la croissance de microorganismes. Thesis. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand. N° DU 2378. [http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/92/68/95/PDF/YOUNESS\\_2013CLF22378.pdf](http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/92/68/95/PDF/YOUNESS_2013CLF22378.pdf).
- Zhang, T., Ding, Y., Li, T., Wan, Y., Li, W., Chen, H., Zhou, R., 2012. A Fur-like protein PerR regulates two oxidative stress response related operons dpr and metJ in *Streptococcus suis*. *BMC Microbiol.* 12, 85.

**Figure S1**

**A.**

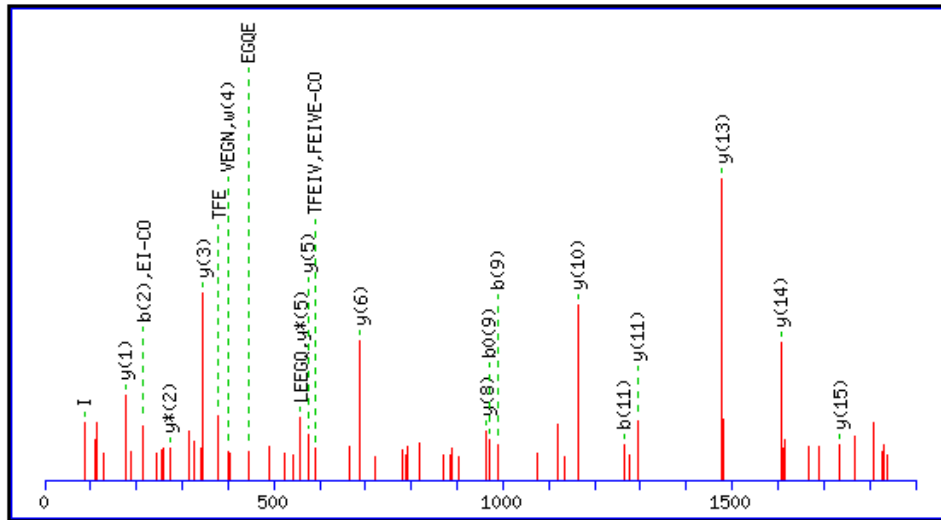
Precursor  $m/z=1948.945$  MS/MS results  
(protein ID 2 - cold shock protein [Bacillus megaterium QM B1551])

**Protein sequence coverage: 26%**

Matched peptides shown in **bold**.

1 MLQGKVKWFN AEKGFGEIV EGQDDVVFHF SAIQGEGFKT **LEEGQEVTFE**  
51 **IVEGNRGPQA** ANVQK

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
40-56	1949,952	1948,945	1948,938	3,71	0	K.TLEEGQEVTFEIVEGNR.G



(Ions score 67)

**Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc):** 1948.938

**Ions Score:** 67 **Expect:** 5.8e-07

**Matches :** 29/308 fragment ions using 33 most intense peaks ([help](#))

#	b	Seq.	y	#
1	102,055	T		17
2	215,139	L	1848,897	16
3	344,182	E	<b>1735,813</b>	15
4	473,224	E	<b>1606,771</b>	14
5	530,246	G	<b>1477,728</b>	13
6	658,304	Q	1420,707	12
7	787,347	E	<b>1292,648</b>	11
8	886,415	V	<b>1163,606</b>	10
9	987,463	T	1064,537	9
10	1134,531	F	<b>963,489</b>	8
11	<b>1263,574</b>	E	816,421	7
12	1376,658	I	<b>687,378</b>	6
13	1475,726	V	<b>574,294</b>	5
14	1604,769	E	475,226	4
15	1661,79	G	<b>346,183</b>	3
16	1775,833	N	289,162	2
17		R	<b>175,119</b>	1

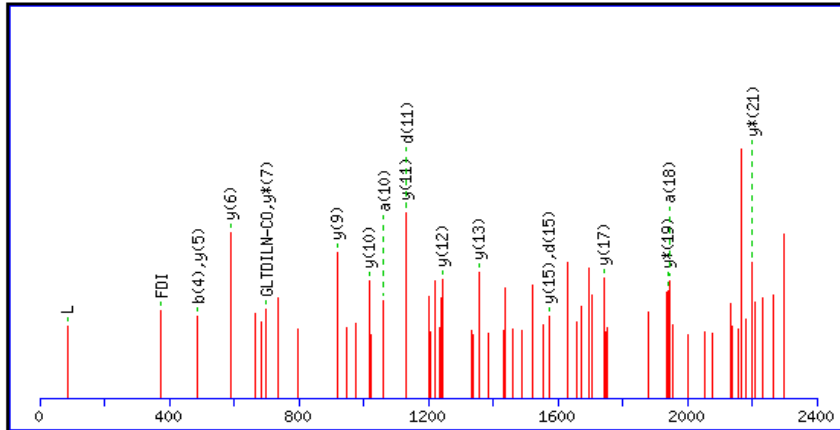
Precursor  $m/z=2331.229$  MS/MS results  
 (protein ID 6 - anti-sigma B factor antagonist [Bacillus megaterium QM B1551])

Protein sequence coverage: 20%

Matched peptides shown in **bold**.

1 MNLKIDIQKD GQAYRIKLAG EIDAYTAPKL KEKFMEITEH TEPEIIVDLT  
 51 DVSYMDSTGL GVFIALLKAN KKNNGSLKFV GVSERIKRLF **DITGLTDILN**  
 101 **VNSQVEGGVK**

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
89-110	2332,236	2331,229	2331,232	-0,004	0	<b>R.LFDITGLTDILNVNSQVEGGVK</b>



(Ions score 37)

Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 2331.232  
 Ions Score: 37 Expect: 0.0022  
 Matches : 26/420 fragment ions using 36 most intense peaks ([help](#))

#	b	Seq.	y	#
1	114,091	L		22
2	261,16	F	2219,155	21
3	376,187	D	2072,087	20
4	489,271	I	1957,06	19
5	590,318	T	1843,976	18
6	647,34	G	<b>1742,928</b>	17
7	760,424	L	1685,907	16
8	861,472	T	<b>1572,823</b>	15
9	976,499	D	1471,775	14
10	1089,583	I	<b>1356,748</b>	13
11	1202,667	L	<b>1243,664</b>	12
12	1316,71	N	<b>1130,58</b>	11
13	1415,778	V	<b>1016,537</b>	10
14	1529,821	N	<b>917,469</b>	9
15	1616,853	S	803,426	8
16	1744,912	Q	716,394	7
17	1843,98	V	<b>588,335</b>	6
18	1973,023	E	<b>489,267</b>	5
19	2030,044	G	360,224	4
20	2087,066	G	303,203	3
21	2186,134	V	246,181	2
22		K	147,113	1



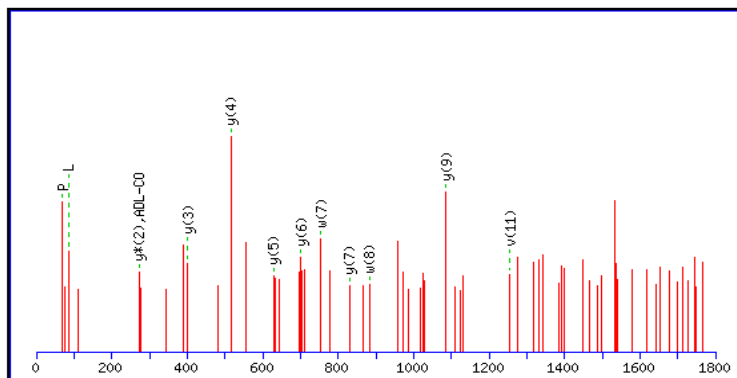
Precursor  $m/z=1842.928$  MS/MS results  
 (protein ID 25 - sulfite reductase [NADPH] flavoprotein, alpha-component [Bacillus megaterium QM B1551])

Protein sequence coverage: 2%

Matched peptides shown in **bold**.

1	MLK <b>VVNSPF</b>	<b>NQEQADLLNR</b>	LLPTLTEAQK	MWLSGYLTAS	QSTS AEGTPD
51	VSTAAPAQTK	QTVSKDVTIL	YGSQTGNAQG	LAENTGKTLE	AKDFNVTVSS
101	MNDFKPNLK	KLELLIVVS	THGEGEPDN	ALSFHEFLHG	RRAPKLENFR
151	FSVLSLGDSS	YEFFCQTGKE	FDVRLAELGG	ERLYPRVDCD	LDFEEPANKW
201	LKGVLDLSE	AKGHSASAAV	PAEAPAGTSP	YSRTNPFKAE	VLENLNLNGR
251	GSNKETRHLE	LSLEGSLTY	EPGDSLGIYP	ENDPELVDLL	LNEFKWDASE
301	NVTVNKEGET	RPLREALISN	FEITVLTKPL	LKQAAELTGN	DKLKALVENR
351	EELKAYTQGR	DVIDLVRDFG	PWNVSAQEFV	AILRKMPARL	YSIASSLSAN
401	PDEVHLTIGA	VRVEAHGRER	KGVCVLCSE	RLQPGDTIPV	YLQSNKNFKL
451	PQDQETPIIM	VGPGTGVAPF	RSFMQEREET	GAKGKSWMFF	GDQHFVTDFL
501	YQTEWQKWLK	DGVLTKMDVA	FSRDTEEKVY	VQNRMLEHSK	ELFQWLEEGA
551	SFYVCGDKTN	MARDVHMLV	EIIETEGKMS	REQAEGYLAE	MKKQKRYQRD
601	VY				

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
5-20	1843.935	1842.928	1842.922	2.99	0	<b>K.VVNSPFNQEQADLLNR.L</b>



(Ions score 17)

Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1842.922  
 Ions Score: 17 Expect: 0.053  
 Matches : 14/284 fragment ions using 31 most intense peaks ([help](#))

#	b	Seq.	y	#
1	100.076	V		16
2	199.144	V	1744.861	15
3	313.187	N	1645.793	14
4	400.219	S	1531.75	13
5	497.272	P	1444.718	12
6	644.34	F	1347.665	11
7	758.383	N	1200.597	10
8	886.442	Q	<b>1086.554</b>	9
9	1015.484	E	958.495	8
10	1143.543	Q	<b>829.453</b>	7
11	1214.58	A	<b>701.394</b>	6
12	1329.607	D	<b>630.357</b>	5
13	1442.691	L	<b>515.33</b>	4
14	1555.775	L	<b>402.246</b>	3
15	1669.818	N	289.162	2
16		R	175.119	1

## B.

Peptide mass fingerprinting of the spot 25  
(sulfite reductase [NADPH] flavoprotein, alpha-component [Bacillus megaterium QM B1551])

Protein sequence coverage: 19%

Matched peptides shown in **bold**.

1	<b>MLQKVVNSPF</b>	<b>NQEQADLLNR</b>	LLPTLTEAQK	MWLSGYLTAS	QSTSAEGTPD
51	VSTAAPAQTK	<b>QTVSKDVTIL</b>	<b>YGSQTGNAQG</b>	<b>LAENTGKTL</b>	<b>AKDFNVTVSS</b>
101	MNDFKPNNLK	KLELLIVVS	THGEGEPPDN	ALSFHEFLHG	RRAPKLENFR
151	FSVLSLGDSS	YEFFCQTGKE	FDVRLAELGG	<b>ERLYPRVDCD</b>	<b>LDFEEPANKW</b>
201	LKGVIDGLSE	AKGHSASAAV	PAEAPAGTSP	YSRTNPFKAE	VLENLNLNGR
251	GSNKETRHL	LSLEGSGLTY	EPGDSLGIYP	ENDPELVDLL	LNEFKWDASE
301	NVTVNKEGET	RPLREALISN	FEITVLTKPL	LKQAAELTGN	DKLKALVENR
351	EELKAYTQGR	DVIDLVRDFG	<b>PWNVSAQEFV</b>	<b>AILRKMPARL</b>	YSIASSLSAN
401	PDEVHLTIGA	VRYEAHGRER	KGVCVLCSE	RLQPGDTIPV	YLSNKNFKL
451	PQDQETPIIM	VGPGTGVAPF	RSFMQEREET	GAKGKSWMFF	GDQHFVTDLF
501	YQTEWQKWLK	DGVLTKMDVA	FSRDTEEKVY	VQNRMLEHSK	<b>ELFQWLEEGA</b>
551	<b>SFYVCGDKTN</b>	<b>MARDVHNMLV</b>	<b>EIIETEGKMS</b>	REQAEGYLAE	MKKQKRYQRD
601	VY				

**Fig. S1** : Mass data of proteins identified with a single peptide. A: MS/MS data of the spots 2, 6 and 25; B: Peptide mass fingerprinting (PMF) of the spot 25.

Table S1: Identified proteins differentially expressed under mesotrione treatment.

spot N <sup>o</sup>	Protein name	Accessing number NCBInr	Total ion score	Best ion score	Number of unique identified peptides	Theoretical		Experimental		Sequence coverage %	F <sub>c</sub> <sup>1</sup>	t-test p-value
						pI	Mw (kDa)	pI	Mw (kDa)			
17	acetoacetyl-CoA reductase [Bacillus megaterium QM B1551]	PhaB_gli294497997	153	119	2	6.9	2.6	6.2	22	10	2.8	3.2E-05
31	alpha-phosphoglucosyltransferase [Bacillus megaterium QM B1551]	PgcA_gli294497324	773	125	10	5.0	64	5.1	67	25	-1.5	3.1E-03
6	anti-sigma B factor antagonist [Bacillus megaterium QM B1551]	RsbV_gli294497068	37	37	1	5.8	1.2	5.8	10	20	-2.0	8.7E-03
2	cold shock protein [Bacillus megaterium QM B1551]	CspB_gli294499936	67	67	1	4.6	7	4.7	9	26	2.1	3.0E-02
35	fructose-1,6-bisphosphate aldolase [Bacillus megaterium QM B1551]	FbaA_gli294501887	120	86	2	5.0	30	5	30	10	1.9	1.2E-03
18	GntR family transcriptional regulator [Bacillus megaterium QM B1551]	GntR_gli294500271	48	26	2	6.0	2.6	6.1	23	9	-1.6	1.7E-02
20	L-lactate dehydrogenase [Bacillus megaterium QM B1551]	Ldh_gli294497312	635	136	8	5.5	3.5	5.5	35	33	5.0	1.2E-05
21	L-lactate dehydrogenase [Bacillus megaterium QM B1551]	Ldh_gli294497312	601	140	8	5.5	3.5	5.4	35	36	2.1	9.0E-03
22	manganese-dependent inorganic pyrophosphatase [Bacillus megaterium QM B1551]	PpaC_gli294499268	541	158	7	4.5	3.3	4.7	35	30	-1.6	1.8E-02
15	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 2 [Bacillus megaterium QM B1551]	ClpP_gli294501768	241	66	5	5.2	2.1	4.9	25	24	1.6	1.0E-02
28	nitrite reductase [NAD(P)H], large subunit [Bacillus megaterium QM B1551]	NasD_gli294497920	560	106	10	5.1	88	5.1	90	17	1.9	1.2E-04
7	Peroxide operon regulator [Bacillus megaterium QM B1551]	PerR_gli294497231	121	69	2	5.9	16	6.1	13	19	-1.7	1.8E-03
13	polyhydroxyalkanoic acid inclusion protein PhaP [Bacillus megaterium QM B1551]	PhaP_gli294497993	415	111	5	5.3	2.0	5.2	18	42	1.5	1.5E-02
14	polyhydroxyalkanoic acid inclusion protein PhaP [Bacillus megaterium QM B1551]	PhaP_gli294497993	309	74	5	5.3	2.0	5.3	20	42	2.8	7.2E-05
26	pyruvate kinase [Bacillus megaterium QM B1551]	Pyk_gli294501510	751	134	9	5.0	6.2	5	60	23	1.7	2.8E-02
10	thioesterase family protein [Bacillus megaterium QM B1551]	Ynep_gli294498300	210	62	5	5.7	1.8	5.9	16	33	1.8	2.7E-03
27	transketolase [Bacillus megaterium QM B1551]	Tkt_gli294500834	414	98	7	4.9	7.2	4.9	70	12	2.1	1.9E-02
9	universal stress protein family domain-containing protein [Bacillus megaterium QM B1551]	Yxie_gli294498634	281	85	4	6.5	1.8	6.2	16	36	1.8	1.8E-03
11	universal stress protein family domain-containing protein [Bacillus megaterium QM B1551]	Yxie_gli294498634	419	113	5	6.5	1.8	6.1	16	43	4.6	9.4E-05
25	sulfite reductase [NADPH] flavoprotein, alpha-component [Bacillus megaterium QM B1551]	CysJ_gli294499853	17	17	1	5.1	6.7	5.2	67	2	1.5	6.5E-04

<sup>1</sup>F<sub>c</sub>, Fold change of corresponding spot volumes in control cells group compared to mesotrione-treated cells group

## Annexe III

### Valorisation des travaux de thèse – Activités annexes

#### Publications

Bardot C, Besse-Hoggan P, **Carles L**, Le Gall M, Clary G, Chafey P, Federici C, Broussard C, Batisson I (2015). How the edaphic *Bacillus megaterium* strain Mes11 adapts its metabolism to the herbicide mesotrione pressure. *Environmental Pollution*, 199: 198 – 208.

DOI: 10.1016/j.envpol.2015.01.029

**Carles L**, Besse-Hoggan P, Joly M, Vigouroux A, Moréra S, Batisson I (2016). Functional and structural characterization of two *Bacillus megaterium* nitroreductases biotransforming the herbicide mesotrione. *Biochemical Journal*, 473(10): 1443 – 1453.

DOI: 10.1042/BJ20151366

**Carles L**, Rossi F, Joly M, Besse-Hoggan P, Batisson I, Artigas J (2016). Biotransformation of maize herbicides by aquatic microbial communities associated to submerged leaves. *Environmental Science and Pollution Research*, in press.

DOI: 10.1007/s11356-016-8035-9

**Carles L**, Joly M, Bonnemoy F, Leremboure M, Batisson I, Besse-Hoggan P (2017). Identification of sulfonylurea biodegradation pathways enabled by a novel nicosulfuron-transforming strain *Pseudomonas fluorescens* SG-1: toxicity assessment and effect of formulation. *Journal of Hazardous Materials*, 324: 184 – 193.

DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.10.048

**Carles L**, Joly M, Bonnemoy F, Leremboure M, Donnadiou F, Batisson I, Besse-Hoggan P. Potential environmental risk assessment (Biodegradation, Toxicity) of a herbicide mixture of mesotrione, nicosulfuron and S-metolachlor.

Article en préparation.

**Carles L**, Martin-Laurent F, Besse-Hoggan P, Batisson I. Bioprophylaxis - How to reduce pesticide contamination in agricultural soils.

Article en préparation.

**Carles L**, Besse-Hoggan P, Batisson I. Complete genome sequence of the mesotrione-degrading strain *Bacillus megaterium* Mes11.

Article en préparation.

## Congrès

### Communications orales

- **Carles L**, Besse-Hoggan P, Joly M, Bonnemoy F, Batissou I. Herbicide mixture: biotransformation pathway and toxicity. 9<sup>th</sup> European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment, 15<sup>th</sup> Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides, 4-7 October 2016, Santiago de Compostela, Spain.
- **Carles L**, Besse-Hoggan P, Joly M, Vigouroux A, Moréra S, Batissou I. NfsA-FRP nitroreductase enzyme family: a new tool to link biotransformation pathways and environmental contamination by mesotrione, a beta-triketone herbicide. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 22-26 May 2016, Nantes, France.
- **Carles L**, Besse-Hoggan P, Joly M, Vigouroux A, Moréra S, Bonnemoy F, Batissou I. Biotransformation et toxicité de mélanges de pesticides. 3<sup>èmes</sup> Journées d'Ecotoxicologie microbienne (Ecotoxicomic), 16-18 mars 2016, Valence TGV, France.
- **Carles L**, Besse-Hoggan P, Joly M, Batissou I. Première description d'enzymes impliquées dans la biodégradation de l'herbicide mésotrione : les nitroréductases NfrA1 et NfrA2 de *Bacillus megaterium* Mes11. 7<sup>ème</sup> colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne (AFEM), 3-6 novembre 2015, Anglet, France.
- **Carles L**, Besse-Hoggan P, Joly M, Batissou I. Identification des gènes et enzymes impliqués dans la dégradation de l'herbicide mésotrione chez *Bacillus megaterium* Mes11. 45<sup>ème</sup> congrès du Groupe Français des Pesticides (GFP), 27-29 mai 2015, Versailles, France.

### Posters

- **Carles L**, Besse-Hoggan P, Batissou I. Reduction of pesticide contamination in agricultural soils: a bioprophylactic approach. 9<sup>th</sup> European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment, 15<sup>th</sup> Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides, 4-7 October 2016, Santiago de Compostela, Spain.
- **Carles L**, Besse-Hoggan P, Batissou I. Bioprophylaxis - How to reduce pesticide contamination in agricultural soils. 16<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology. International Society for Microbial Ecology (ISME), 21-26 August 2016, Montreal, Canada.
- **Carles L**, Besse-Hoggan P, Joly M, Vigouroux A, Moréra S, Bonnemoy F, Batissou I. Mélanges d'herbicides : étude des voies de biotransformation et détermination de la toxicité des métabolites. 46<sup>ème</sup> congrès du Groupe Français des Pesticides (GFP), 17-19 mai 2016, Versailles, France.

- **Carles L**, Rossi F, Joly M, Besse-Hoggan P, Batisson I, Artigas J. Biotransformation of three maize herbicides by aquatic microbial communities associated to submerged leaf litter. 4<sup>th</sup> Biofilm Workshop, 7-8 April 2016, Girona, Spain.
- **Carles L**, Besse-Hoggan P, Joly M, Batisson I. New insights into the biodegradation of  $\beta$ -triketone herbicides: role of nitroreductase enzymes in mesotrione transformation. 15<sup>th</sup> EuCheMS International Conference on Chemistry and the Environment (ICCE), 20-24 September 2015, Leipzig, Germany.
- **Carles L**, Besse-Hoggan P, Joly M, Batisson I. Complementary chemical and biological approaches to study mesotrione biodegradation pathway by the edaphic *Bacillus megaterium* strain Mes11: first identification and characterization of degrading enzymes. 15<sup>th</sup> Pesticide Symposium on Pesticide Chemistry, 2-4 September 2015, Piacenza, Italy.
- Calvayrac C, Rocaboy-Faquet E, Romdhane S, Devers-Lamrani M, Martin-Laurent F, **Carles L**, Joly M, Batisson I, Mallet C, Bertrand C, Cooper JF, Besse-Hoggan P, Dayan FE, Blanchard C, Nogue T, Barthelmebs L. TRICETOX : Etude de l'impact environnemental des herbicides  $\beta$ -tricétones synthétiques et naturels. 45<sup>ème</sup> congrès du Groupe Français des Pesticides (GFP), 27-29 mai 2015, Versailles, France.
- **Carles L**, Besse-Hoggan P, Bardot C, Batisson I. Identification of genes and enzymes involved in mesotrione biodegradation by *Bacillus megaterium*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 3-7 May 2015, Barcelona, Spain.
- **Carles L**, Besse-Hoggan P, Batisson I. Identification des gènes et enzymes impliqués dans la dégradation de la mésotrione chez *Bacillus megaterium*. 2<sup>èmes</sup> Journées d'Ecotoxicologie microbienne. 5<sup>èmes</sup> journées thématiques de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne (AFEM), 21-23 mai 2014, Banyuls sur Mer, France.

### **Activités d'enseignement**

Monitorat dans le cadre du contrat doctoral (années 2013-2014 et 2015-2016)

- TP de Bactériologie générale (niveau L2, 32 h)
- TD de Techniques de laboratoire (niveau L1, 3 h)
- TP de Méthodologie du travail universitaire (niveau L1, 69 h)
- TP d'Ecologie et métabolismes bactériens (Niveau L3, 24 h)

### **Responsabilités et animations scientifiques**

- Participation active aux Conseils Scientifiques du LMGE (UMR CNRS 6023), du Département de Biologie de l'Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand) et de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement (Clermont-Ferrand), 2013 – 2016.
- Membre du Réseau Thématique Pluridisciplinaire d'Écotoxicologie Microbienne (RTP EcotoxicoMic) depuis 2015.
- Participation à l'organisation des Journées de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement (Clermont-Ferrand), 2015.
- Participation à l'organisation de la Journée des Doctorants du LMGE (UMR CNRS 6023), 2015.

**Résumé.** Les pesticides de nouvelle génération sont le plus souvent épanchés à de faibles doses et en mélange. Peu d'études se sont intéressées jusqu'à présent à l'effet de ces mélanges sur la biodégradation et la toxicité de chaque pesticide et/ou métabolite. Le but de ces travaux de thèse était d'étudier les voies de biotransformation de chacun des trois herbicides d'un mélange constitué de mésotrione ( $\beta$ -tricétone), nicosulfuron (sulfonylurée) et *S*-métolachlore (chloroacétanilide) utilisé sur les cultures de maïs, ainsi que la toxicité (test Microtox<sup>®</sup>) des herbicides et de leurs métabolites, seuls et en mélanges. L'identification des métabolites de la mésotrione chez la souche *Bacillus megaterium* Mes11 et une étude de protéomique différentielle ont suggéré l'implication de nitroréductases dans la première étape de la biotransformation de cet herbicide, rôle confirmé ensuite par la caractérisation structurale et fonctionnelle de deux enzymes capables de transformer la mésotrione : les nitroréductases NfrA1 et NfrA2, appartenant à la sous-famille NfsA-FRP des Nitro-FMN réductases. La voie de biotransformation du nicosulfuron a, quant à elle, été étudiée chez la souche *Pseudomonas fluorescens* SG-1 isolée à partir de sol agricole, capable de transformer cet herbicide par co-métabolisme. Cette biotransformation conduit à la formation de deux métabolites majoritaires issus du clivage de la liaison sulfonylurée du nicosulfuron, l'un d'eux (l'ADMP, 2-amino-4,6-diméthoxypyrimidine) présentant une toxicité 20 fois supérieure à celle de la molécule mère. Nous avons également étudié qualitativement et quantitativement la biotransformation de la mésotrione et du nicosulfuron par la souche Mes11 séparément ou en mélange, et en présence ou non de *S*-métolachlore. Les résultats ont montré un effet négatif de la mésotrione sur la biotransformation du nicosulfuron et un effet positif du *S*-métolachlore sur la biotransformation de la mésotrione. Tous les mélanges d'herbicides testés ont montré des effets synergiques pour la toxicité vis-à-vis de *A. fischeri*, tandis que les mélanges de métabolites (avec ou sans *S*-métolachlore) étaient majoritairement synergiques ou antagonistes. La dernière partie des travaux de thèse est focalisée sur le développement d'une technique préventive de traitement de la pollution par les pesticides d'origine agricole (bioprophylaxie). Nous avons fait la preuve de concept de cette technique par une étude en microcosmes de sol. L'épandage simultané de l'herbicide 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) et de la souche *Cupriavidus necator* JMP134 capable de le minéraliser a en effet permis de réduire le temps de demi-vie de ce composé d'un facteur 3, tout en conservant son activité herbicide.

**Mots-clés :** Mélange de pesticides ; Mésotrione ; Nicosulfuron ; *S*-métolachlore ; Biotransformation ; Microorganismes ; Métabolites ; Toxicité des mélanges ; Bioprophylaxie

**Abstract.** The new-generation pesticides are often sprayed at low dosages and in mixtures. Up to now, a few studies focused on the effect of these mixtures on the biodegradation and the toxicity of each pesticide and/or metabolite. The aim of this Ph.D. work was to study the biotransformation of each herbicide of a mixture composed of mesotrione ( $\beta$ -triketone), nicosulfuron (sulfonylurea) and *S*-metolachlor (chloroacetanilide) applied on maize crops, as well as the toxicity (Microtox<sup>®</sup> test) of the herbicides/metabolites alone or in mixture. The identification of mesotrione metabolites by the strain *Bacillus megaterium* Mes11 and a differential proteomic approach suggested the role of nitroreductases in the first step of mesotrione biotransformation. This was confirmed by the structural and functional characterization of two enzymes able to biotransform mesotrione: the NfrA1 and NfrA2 nitroreductases, belonging to the NfsA-FRP sub-family of Nitro-FMN reductases. The biotransformation pathway of nicosulfuron has been elucidated for the strain *Pseudomonas fluorescens* SG-1 isolated from an agricultural soil and able to co-metabolically biotransform nicosulfuron. Two major metabolites resulting from the cleavage of the sulfonylurea bridge were identified, one of them (ADMP, 2-amino-4,6-dimethoxypyrimidine) presenting a 20-fold higher toxicity than the parent compound. The simultaneous biotransformation of mesotrione and nicosulfuron by the strain Mes11 was also qualitatively and quantitatively studied, showing a negative effect of mesotrione on nicosulfuron biotransformation, and a positive effect of *S*-metolachlor on mesotrione biotransformation. All parent compound mixtures tested resulted in synergistic effects towards *A. fischeri*, while metabolite mixtures (with or without *S*-metolachlor) were mostly synergistic or antagonistic. The last part of the PhD work was devoted to the development of a preventive technique for the treatment of pollutions caused by agricultural pesticides (bioprophylaxis). We made the proof of concept of this method by using a soil microcosm study. The simultaneous spreading of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide and the strain *Cupriavidus necator* JMP134 able to mineralize it allowed a 3-fold reduction of 2,4-D half-life in soil, while preserving its herbicide activity.

**Keywords:** Pesticide mixture; Mesotrione; Nicosulfuron; *S*-metolachlor; Biotransformation; Microorganisms; Metabolites; Mixture toxicity; Bioprophylaxis